



UNIVERSIDAD DE GRANADA

Programa de Doctorado en Biomedicina

**ESTUDIO DE FACTORES GENÉTICOS,
INMUNOLÓGICOS Y DEL MICROAMBIENTE
MEDULAR EN LA PROGRESIÓN DEL SÍNDROME
MIELODISPLÁSICO**

TESIS DOCTORAL

Autor: Paola Montes Ramos

Directores:

Francisco Ruiz-Cabello Osuna

Mónica Bernal Sánchez

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Paola Montes Ramos
ISBN: 978-84-1306-453-6
URI: <http://hdl.handle.net/10481/59920>

Departamento de Bioquímica, Biología Molecular III e
Inmunología



UNIVERSIDAD DE GRANADA

Programa de Doctorado en Biomedicina (B11.56.1)

**ESTUDIO DE FACTORES GENÉTICOS,
INMUNOLÓGICOS Y DEL MICROAMBIENTE
MEDULAR EN LA PROGRESIÓN DEL SÍNDROME
MIELODISPLÁSICO**

PAOLA MONTES RAMOS

GRANADA, 2019

Los resultados de este trabajo han sido presentados a congresos nacionales e internacionales y finalmente han sido publicados en revistas internacionales:

Publicaciones internacionales

- Montes P, Kerick M, Bernal M, Hernández F, Jiménez P, Garrido P, Márquez A, Jurado M, Martín J, Garrido F, Ruiz-Cabello F. **Genomic loss of HLA alleles may affect the clinical outcome in low-risk myelodysplastic syndrome patients.** 2018. *Oncotarget*, 9 (97): 36929-36944. doi:10.18632/oncotarget.26405.
- Montes P, Bernal M, Campo L.N, González A.R, Jiménez P, Garrido P, Jurado M, Garrido F, Ruiz-Cabello F, Hernández F. (In press). **Tumor genetic alterations and features of immune microenvironment drive MDS escape and progression.** *Cancer Immunol Immunother*. doi: 10.1007/s00262-019-02420-x.

Congresos internacionales

- Hernández F, Montes P, Maroto S, Espinosa de los Monteros E, Jurado M, Ruiz-Cabello F, Jiménez P, Cruz A. **Monuclear myeloid-derived suppressor cells (Mo-MDSC) expansion and progression in myelodysplastic syndromes.** *Haematologica*. 21st Congress European Hematology Association, 9-12 June 2016, Copenhagen.
- Montes P, Bernal M, Campo L.N, Jiménez P, Ruiz-Cabello F, Jurado M, Hernández F. **Myelodysplastic Syndrome: A study of mutational profile and the medullar microenvironment related to the progression of the disease.** *Leukemia Research*, Volume 55, Supplement 1, ISSN 0145-2126. 14th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes (MDS), 3-6 May 2017, Valencia.
- Hernández F, Bernal M, Montes P, Expósito M, Ruiz-Cabello F, Jurado M. **Mutational profile of hyperplastic versus hypoplastic myelodysplastic syndromes WHO 2016 classification.** *Leukemia Research*, Volume 55, Supplement 1, ISSN 0145-2126. 14th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes (MDS), 3-6 May 2017, Valencia.
- Hernández F, Montes P, Bernal M, Jiménez P, Corzo M, González A.R, Jurado M, Ruiz-Cabello F. **Myelodysplastic Syndromes: Mechanisms involved in the transformation to Acute myeloid Leukemia (AML).** *HemaSphere*, Volume 2, Supplement 1, ISSN: 2572-9241. 23rd Congress of the European Hematology Association, 14-17 June 2018, Estocolmo.

- Hernández F, Badiola J, Cornejo E, Bernal M, Montes P, Ruiz-Cabello F, González A.R, Jurado M. **Differences in mutational profile and clonal architecture of myelodysplastic syndromes with isolated deletion of 5q, hyperplastic and hypoplastic syndromes.** *HemaSphere*, Volume 2, Supplement 1, ISSN: 2572-9241. 23st Congress European Hematology Association (EHA), 14-17 June 2018, Estocolmo.
- Hernández F, Alarcón-Payer C, Bernal M, Montes P, Mora E, Romero S, Sanz G, Contento A, López B, Brunet S, González A.R, Molero A, Pomares H, Arnan M, Jurado M. **Long-term benefits after discontinuation of lenalidomide due to adverse events in patients with del (5q) myelodysplastic syndromes.** 15th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes, 8-11 May 2019, Copenhagen, Dinamarca.
- Hernández F, Solé F, Bernal M, Palomo L, Fuster F, Montes P, Mesa Z, Alarcón C, Cornejo E, Badiola J, Expósito M, Jurado M. **Clinical and mutational profiles differentiate hypoplastic from hyperplastic myelodysplastic syndrome and myelodysplastic syndrome with isolated deletion of 5q.** 15th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes, 8-11 May 2019, Copenhagen, Dinamarca.

Congresos Nacionales

- Montes P, Maroto S, Jiménez P, Hernández F, Perea F.J, Ruiz-Cabello F. **CD14⁺ HLA-DR^{low/-} expression is associated with increased blast cells in peripheral blood and risk of myelodysplastic syndrome.** 39 Congreso SEI, 5-7 May 2016, Alicante, España.
- Montes P, Campo L.N, Bernal M, Jiménez P, Jurado M, Garrido P, Hernández F, Ruiz-Cabello F. **Myelodysplastic syndrome: abnormalities in the tumor microenvironment in relation to the progression of the disease.** 40 Congreso SEI, 25-27 May 2017, Zaragoza, España.
- Montes P, Bernal M, Kerick M, Hernández F, Jiménez P, Garrido P, Jurado M, Martín J, F. Garrido F, Ruiz-Cabello F. **Genomic loss of HLA alleles changes the clinical outcome in low-risk myelodysplastic syndrome patients.** 41 Congreso SEI, 30 May-1 June 2019, Sevilla, España.

Otros méritos

- Montes P, Bernal M., Campo L.N, Jiménez P, Ruiz Cabello F, Jurado M, Hernández F. **Síndrome Mielodisplásico: Estudio del perfil mutacional y del microambiente tumoral en relación con la progresión de la enfermedad.** 2º premio Jornada de Investigación en Hematología en Andalucía, 10 Febrero 2017, Córdoba, España.

- Montes P, Hernández F, Bernal M, Jiménez P, Corzo M, González A. R, Jurado M, Ruiz Cabello F. **Síndromes Mielodisplásicos: Mecanismos implicados en la transformación a Leucemia Mieloide Aguda.** 1º premio Jornadas Hematológicas Andaluzas de Síndromes Mielodisplásicos, 22-23 Febrero 2018, Granada, España.

“Solo triunfa en el mundo quien se levanta y busca a las circunstancias, creándolas si no las encuentra”

George Bernard Shaw

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi director de tesis, el Dr. Francisco Ruiz-Cabello, por su disposición a dirigirme este trabajo, dándome la oportunidad de introducirme en el ámbito de la investigación clínica. Su conocimiento, dedicación y orientación en este proyecto han sido vitales para la consecución de esta tesis. Trabajar a su lado me ha hecho crecer personal y profesionalmente. Además de ser una excelente persona, he aprendido mucho de su forma de trabajo y experiencia. Gracias por confiar en mí y por estar ahí cada vez que lo he necesitado.

A la Dra. Mónica Bernal, por su dedicación, tiempo y rigor, en la que, en los momentos más difíciles del camino, he encontrado una guía clara y eficaz. Además de ser la codirectora de esta tesis doctoral, donde destaco su profesionalidad y conocimiento, ha sido una auténtica amiga que me ha acompañado durante este largo camino. Por ello, tienes todo mi respeto, admiración y mi amistad.

A la Dra. Francisca Hernández, por su apoyo, compromiso y plena colaboración con nuestro grupo de investigación. Su profesionalidad y conocimiento clínico-hematológicos han sido vitales para el desarrollo de esta tesis. Gracias por confiar en nosotros.

Al Dr. Federico Garrido, por mostrarme su confianza y ofrecerme la oportunidad de continuar con este proyecto. Por el asesoramiento y ayuda brindadas cada vez que lo hemos necesitado, y por hacerme formar parte de este gran equipo.

A la Dra. Pilar Jiménez, por la ayuda y el apoyo prestado en todo momento. Por su excelente trabajo como tutora durante la residencia, por fomentar siempre nuestra curiosidad, y por enseñarnos, con nuestras innumerables sesiones clínicas, todos los nuevos avances que se han ido desarrollando en el campo de la inmunología.

A Amanda Rocío González, un ejemplo de dominio en uno de los aspectos más difíciles para mí, la estadística. Gracias por el asesoramiento, paciencia y dedicación recibidos desde el principio; y que nos ha proporcionado siempre que lo hemos necesitado.

Gracias a todas aquellas personas que han colaborado en la realización de este proyecto. A la Dra. Pilar Garrido, al Dr. Javier Marín, al Dr. Martin Kerick, a la Dra. Ana Márquez, y a algunos compañeros de laboratorio: Toñi, Vicky, María, y en especial, a mi compañera de batalla, Laura Campo, por todas esas innumerables horas a mi lado.

A mis compañeros de especialidad, Esther, Andrea, Nerea, que me dieron ánimos y apoyo en los momentos más bajos, y que, a la misma vez, compartieron conmigo aquellos momentos de progreso y felicidad. En especial, a ti, Laura Cabo, por ser una verdadera compañera y amiga.

También me gustaría también agradecer a otras personas que han formado parte de esta experiencia y a las que le tengo un gran aprecio. A Pilar González, por su alegría, apoyo y por hacerme sentir parte de su familia; a Fran, Teresilla., y general, al servicio de Inmunología del Hospital Virgen de las Nieves, quienes han visto nacer y crecer este trabajo, y que, de una forma u otra, han sido partícipes y han vivido conmigo esta experiencia.

A los pacientes de Síndrome Mielodisplásico, quiénes generosamente, han donado sus muestras para formar parte de este estudio. En estas líneas, me gustaría felicitar al Grupo Andaluz y al Grupo Español de Síndrome Mielodisplásico (GASMD y GESMD) por la impresionante labor que ejercen, y a su vez, agradecerles todo el apoyo brindado en esta investigación.

A mi familia, por su confianza, consejos y comprensión. Por ser uno de los pilares básicos en mi vida. Por darme la oportunidad de estar donde me encuentro ahora mismo.

No quiero finalizar estos agradecimientos sin recordar también a una persona muy especial para mí. A ti..., por estar a mi lado, por escucharme y aconsejarme; pero sobretodo, por haberme devuelto la alegría y por haberme dado siempre los ánimos suficientes para continuar en el camino.

Esta investigación ha sido posible gracias al Instituto de Salud Carlos III (PI17/00197, PI16/00752), a la Unión Europea (FEDER, Fondo Europeo de Desarrollo Regional) (RETIC RD 06/020, RD09/0076/00165,) a la Junta de Andalucía (Grupos CTS-143, CTS-695, CTS-3952, CVI-4740, PI09/0382), al Grupo Andaluz y al Grupo Español de Síndrome Mielodisplásico (GASMD/GESMD), y a las empresas Abbott, Becton Dickinson y Beckman Coulter.

INDICE

INDICE

ABREVIATURAS	I
LISTA DE FIGURAS	II
LISTA DE TABLAS	III
RESUMEN	IV

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Concepto y antecedentes históricos	2
1.2. Epidemiología	2
1.3. Etiología	3
1.4. Diagnóstico	3
1.5. Clasificación e índices pronósticos	4
1.5.1. Clasificación FAB.....	4
1.5.2. Clasificación OMS.....	4
1.5.3. Clasificación de los SMD en relación con el pronóstico	6
1.5.3.1. <i>International Prognostic Scoring System (IPSS)</i>	6
1.5.3.2. IPSS-Revisado (IPSS-R).....	7
1.5.4. SMD Hipoplásicos vs. Hiperplásicos	9
1.6. Fisiopatología del Síndrome Mielodisplásico	10
1.6.1. Alteraciones epigenéticas en el SMD	10
1.6.2. Alteraciones citogenéticas en el SMD	10
1.6.3. Mutaciones somáticas en el SMD.....	12
1.6.4. Arquitectura clonal del SMD.....	19
1.6.5. Papel de la respuesta inmunitaria en la fisiopatología del SMD.....	22
1.6.5.1. Microambiente medular	22
1.6.5.2. Células de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa.....	23
1.6.5.2.1. SMD Bajo Riesgo vs. Alto Riesgo según IPSS	23
1.6.5.2.2. SMD Hipoplásico vs. Hiperplásico.....	25
1.7. Tratamiento en el Síndrome Mielodisplásico	26
1.7.1. Estrategias de tratamientos convencionales.....	26
1.7.2. Trasplante de Precursores Hematopoyéticos (TPH).....	28
1.7.2.1. Aloreactividad de células NK	29
1.8. Reconocimiento inmunológico del cáncer	
1.8.1. Teoría de la inmunovigilancia frente al desarrollo de tumores: inmunovigilancia, inmunoedición y escape tumoral	30
1.9. Mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria en cáncer	33
1.9.1. Inmunotolerancia dentro del microambiente tumoral	33
1.9.2. Alteración de la expresión de antígenos de histocompatibilidad en tumores	35
1.9.2.1. HLA en neoplasias hematológicas	38

1.9.3. Células de la inmunidad innata y adaptativa en el microambiente tumoral.....	40
1.9.3.1. Células Mieloides Supresoras (MDSCs).....	40
1.9.3.2. Células Natural Killer (NK).....	42
1.9.3.3. Linfocitos T citotóxicos (CTLs).....	49
1.9.3.4. Células T reguladoras (Treg).....	49
1.9.3.5. Células T helper (Th1, Th17, Th22).....	51
1.9.3.6. Linfocitos T con expresión CD39.....	51
1.9.4. Otros mecanismos que contribuyen al escape tumoral	
1.9.4.1. Vía PD-1/PD-L1.....	52
2. HIPÓTESIS E OBJETIVOS.....	56
3. MATERIAL Y MÉTODOS	
3.1. Grupo de estudio.....	60
3.2. Estudio inmunofenotípico del microambiente tumoral.....	61
3.2.1. Procesamiento de las muestras.....	61
3.2.2. Análisis mediante Citometría de Flujo Multiparamétrica.....	63
3.3. Aislamiento de células CD34⁺ y células T CD3⁺.....	72
3.4. Extracción y Cuantificación del ADN.....	72
3.5. Estudio del perfil mutacional.....	74
3.6. Pérdida de heterocigosidad (LOH) y fenómenos de disomía uniparental adquirida (aUPD) en el cromosoma 6.....	75
3.7. Tipaje genómico HLA.....	76
3.7.1. Tipaje Luminex.....	76
3.7.2. Secuenciación Sanger.....	76
3.8. Estudios citogenéticos.....	77
3.9. Análisis Estadístico.....	77
4. RESULTADOS	
4.1. Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio.....	80
4.1.1. Características demográficas.....	80
4.1.2. Clasificación OMS 2017.....	80
4.1.3. Clasificación según <i>scores</i> IPSS/IPSS-R.....	81
4.1.4. Clasificación según riesgo citogenético.....	82
4.2. Estudio del microambiente tumoral.....	83
4.2.1. Estudio de poblaciones leucocitarias en sangre periférica de pacientes diagnosticados con SMD.....	83
4.2.2. Estudio funcional de poblaciones leucocitarias en pacientes con SMD en sangre periférica.....	87
4.2.3. Diferencias en la composición de poblaciones leucocitarias entre muestras de médula ósea y sangre periférica.....	91
4.2.4. Distribución de las poblaciones leucocitarias en las distintas entidades clínicas OMS 2017.....	93
4.2.5. Impacto del microambiente tumoral en pacientes con SMD sobre la progresión de la enfermedad.....	95

4.2.6. Estudio de las poblaciones leucocitarias en relación a marcadores pronósticos (IPSS e IPSS-R), y riesgo citogenético	97
4.2.7. Estudio de las poblaciones leucocitarias en SMD Hipoplásicos e Hiperplásicos	100
4.3. Estudio del perfil mutacional	101
4.3.1. Mutaciones somáticas en pacientes con SMD	101
4.3.2. Estudio del perfil mutacional en relación con la progresión de la enfermedad	103
4.3.3. Estudio del perfil mutacional en relación con <i>score</i> pronóstico IPSS-R y Riesgo Citogenético.....	105
4.4. Relación entre el microambiente tumoral y el perfil mutacional en pacientes con SMD	107
4.4.1. Relación entre el microambiente tumoral y el número total de mutaciones somáticas	108
4.4.2. Relación entre el microambiente tumoral y la presencia de mutaciones en genes de Alto Riesgo Molecular (<i>High Molecular Risk, HMR</i>).....	109
4.4.3. Relación entre el microambiente tumoral y los valores de Frecuencia Alélica de la Variante (<i>Variant Allele Frequency, VAF</i>).....	110
4.5. Cambios intrínsecos que afectan a la inmunogenicidad de la célula tumoral e impacto en la progresión de la enfermedad	110
4.5.1. Estudio de la expresión HLA-I y PD-L1 en la célula tumoral.....	110
4.5.2. Estudio de la pérdida de heterocigosidad (LOH) en la región HLA.....	116
4.5.2.2. Grupos HLA-C y HLA-Bw en relación a receptores KIR en los pacientes con LOH	135
4.5.3. Estudio de LOH en el CRM 15.....	137
5. DISCUSIÓN.....	142
5.1. Cambios en la composición inmunitaria del microambiente tumoral	143
5.2. Mutaciones somáticas en el SMD	147
5.3. Cambios intrínsecos que afectan a la inmunogenicidad de la célula tumoral	149
6. CONCLUSIONES.....	158
7. ANEXO	162
8. BIBLIOGRAFÍA.....	180

ABREVIATURAS

AA	Anemia Aplásica
AcMo	Anticuerpo Monoclonal
aGCH	Hibridación Genómica Comparativa
Arg1	Arginasa-1
ATG	Globulina Antitimocítica
APM	Maquinaria de Procesamiento Antigénico
AR	Anemia Refractaria
AREB	Anemia Refractaria con Exceso de Blastos
ARSA	Anemia Refractaria con Sideroblastos en Anillo
aUPD	Disomía uniparental adquirida
β2m	β2-microglobulina
CsA	Ciclosporina
CDs	Células Dendríticas
CBF	Core Binding Factor
CHIP	Hematopoyesis clonal con potencial indeterminado
CN	Número de copias (del inglés, <i>Copy Number</i>)
CN-LOH	Pérdida de Heterocigosidad sin alteración en el número de copias (del inglés, <i>Copy Neutral Loss of Heterocigosity</i>)
CPA	Célula presentadora de antígeno
CRM	Cromosoma
CRDU	Citopenia Refractaria con displasia Unilínea
CRDM	Citopenia Refractaria con Displasia Multilínea
CRDM-SA	Citopenia Refractaria con Displasia Multilínea y Sideroblastos en anillo
CTLs	Linfocitos T CD8 ⁺ citotóxicos
DLBCL	Linfoma difuso de células B grandes
DNMT	ADN metiltransferasa
FAB	French-American-British
FSC	Medida proporcional al tamaño celular (del inglés, <i>Foward Scatter</i>)
FISH	Hibridación in Situ Fluorescente
GESMD	Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos
GCECGH	Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
EICH	Enfermedad de Injerto contra Huésped
Epo	Eritropoyetina
HLA	Antígeno leucocitario Humano (del inglés, <i>Human Leukocyte Antigen</i>)
HSC	Célula madre hematopoyética (del inglés, <i>Hematopoyetic Stem Cell</i>)
HMA	Agente Hipometilante
HMR	Mutaciones en genes de alto riesgo molecular (del inglés, <i>High Molecular Risk</i>)
HPN	Hemoglobinuria Paroxística Nocturna
IPSS	Sistema Pronóstico Internacional (del inglés, <i>International Prognostic Score System</i>)
IFN-γ	Interferón-γ
IDO	Indolamina 2,3-dioxigenasa
IL	Interleucina

IMF	Intensidad media de Fluorescencia
IMID	Agente inmunomodulador
INF-γ	Interferón- γ
iNOS	Óxido Nítrico Sintasa inducible
IST	Terapia Inmunosupresora
KIR	Receptores de células NK pertenecientes a la familia de las Inmunoglobulinas (del inglés, <i>Killer Immunoglobuline-like receptors</i>)
LOH	Pérdida de Heterocigosidad (del inglés, <i>Loss of Heterocigosity</i>)
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LLC	Leucemia Linfática Crónica
LMAs	Leucemia Mieloide Aguda secundaria a SMD
LMMC	Leucemia Mielomonocítica Crónica
LOH	Loss of Heterocigosity
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad (del inglés, <i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MSCs	Células mesenquimales estromales (del inglés, <i>Mesenchymal Stromal Cells</i>)
NCR	Receptores de citotoxicidad natural (del inglés, <i>Natural Cytotoxicity Receptors</i>)
NGS	Secuenciación masiva (del inglés, <i>Next Generation Sequencing</i>)
NK	Célula asesina natural (del inglés, <i>Natural Killer</i>)
NO	Óxido Nítrico
NR	Neutropenia Refractaria
OMS	Organización Mundial de la Salud
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
SG	Supervivencia Global
SSC-A	Medida proporcional a la complejidad de la estructura interna de la célula (del inglés, <i>Side Scatter</i>)
TAP	Transportador asociado al procesamiento antigénico
Th	Linfocito T colaborador (del inglés, <i>T helper</i>)
TGF-β	Factor de crecimiento transformante- β
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral (del inglés, <i>Tumor Necrosis Factor- α</i>)
TPH	Trasplante de Precursores Hematopoyéticos
TR	Trombopenia Refractaria
Treg	Linfocito T regulador
sMICA	MICA soluble en suero
SMD	Síndromes Mielodisplásicos
SMD-DU	Síndrome Mielodisplásico con Displasia Unilínea
SMD-DM	Síndrome Mielodisplásico con Displasia Multilínea
SMD-EB	Síndrome Mielodisplásico con Exceso de Blastos
SMD-NH	Síndrome Mielodisplásico Normo/Hiperclulares
SMD-h	Síndrome Mielodisplásico Hipoplásico
SMD-U	Síndrome Mielodisplásico Inclasificable
SNP-Array	Single-Nucleotide Polimorfism array
MDSCs	Células Mieloides Supresoras (del inglés, <i>Myeloid Derived Suppressor Cells</i>)
PD-1	Receptor de muerte programada 1 (del inglés, <i>Programmed Death-ligand 1</i>)
VAF	Frecuencia Alélica de la Variante (del inglés, <i>Variant Allele Frequency</i>)
VEGF	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular
5-AZA	5-azacitidina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia y pronóstico de las anomalías cromosómicas más frecuentes en el SMD.

Figura 2. Distribución de las mutaciones somáticas recurrentes (según las diferentes categorías biológicas, y su frecuencia mutacional (%)) y de las alteraciones citogenéticas en el SMD.

Figura 3. Vías celulares funcionales y genes implicados en el SMD.

Figura 4. Expansión clonal en el SMD.

Figura 5. Perfiles genéticos de LMA definidos por el tipo de mutaciones somáticas subyacentes.

Figura 6. Citoquinas, Vías de Señalización celular y células del sistema inmunitario del microambiente medular en el SMD de Alto y Bajo Riesgo según *score* IPSS.

Figura 7. Papel terapéutico de células NK aloreactivas en la prevención de la recaída leucémica en el TPH haploidéntico.

Figura 8. Representación esquemática del proceso de inmunoección.

Figura 9. Mecanismos de inmunoevasión en tumores.

Figura 10. Fenotipo HLA normal y fenotipos HLA alterados en tumores.

Figura 11. Mecanismos llevados a cabo por las MDSCs que contribuyen al inmunoescape.

Figura 12. Caracterización fenotípica de células NK en SP.

Figura 13. Especificidades HLA pertenecientes a los diferentes grupos de ligandos de receptores KIR.

Figura 14. Representación esquemática de la inhibición e activación de las células NK del donante en el alotrasplante a través de la interacción entre sus receptores KIR y los ligandos, HLA-C1, C2 y ligandos Bw4, expresados por la célula tumoral.

Figura 15. Tubo-1: diseñado para analizar las diferentes subpoblaciones de linfocitos T-CD4⁺ helper.

Figura 16. Tubo-2: diseñado para el análisis de los linfocitos T-reguladores con fenotipo CD4⁺ CD25⁺CD127⁻.

Figura 17. Tubo-2: diseñado para analizar la expresión del marcador CD39 sobre células T-CD4⁺ y T-CD8⁺.

Figura 18. Tubo-3: diseñado para analizar la expresión del receptor PD-1 sobre linfocitos T CD3⁺ CD4⁺ y CD3⁺ CD8⁺.

Figura 19. Tubo-4: caracterización de las diferentes subpoblaciones de células NK en base a la expresión de los marcadores de superficie CD56 y CD16.

Figura 20. Tubo-4: diseñado para analizar la expresión de receptores NKG2D, NKp46 y CD161 en células NK CD3⁻CD56⁺.

Figura 21. Tubo-5: caracterización de la expresión de los diferentes receptores KIR (KIR2DL1, KIR2DS1, KIR2DL2, KIR2DS2 y KIR2DL3) sobre células NK CD3⁻CD56⁺.

Figura 22. Tubo-6: Caracterización de la población de células Mo-MDSC.

Figura 23. Tubo-7: Caracterización de la población de células PMN-MDSC.

Figura 24. Tubo-8: Análisis de los niveles de IMF de moléculas HLA-I sobre la célula tumoral CD34⁺ y sobre diferentes estadios de maduración mieloide.

Figura 25. Tubo-3: diseñado para analizar la expresión de receptor CD274 sobre blastos CD34⁺.

Figura 26. Protocolo para la cuantificación de ADN por fluorimetría Qubit® 2.0 Fluorometer.

Figura 27. Esquema de los cromosomas humanos, tomada de <http://atlasgeneticsoncology.org>. Esquema del cromosoma 6, según ISCN 2009.

Figura 28. Distribución de los pacientes con SMD en función del Riesgo Citogenético.

Figura 29. Porcentaje y valor absoluto de linfocitos T en SP de los grupos SMD y LMAs, y en el grupo control.

Figura 30. Porcentaje y valor absoluto de células NK en SP de los grupos SMD y LMAs, y en el grupo control.

Figura 31. Porcentaje de células NK (CD56⁺) en SP de los grupos SMD y LMAs, y grupo control.

Figura 32. Gráficos en los que se representan las frecuencias de diferentes poblaciones celulares en SP, en función de la progresión de la enfermedad (fase temprana SMD, fase avanzada SMD y LMAs).

Figura 33. Frecuencia de mutación en los genes analizados en el grupo de pacientes con SMD y LMAs en función de la vía celular en la que participan.

Figura 34. Distribución de los pacientes con SMD en función del perfil mutacional en los diferentes grupos de la enfermedad (Fase temprana SMD, Fase avanzada SMD, LMAs).

Figura 35. Distribución de las mutaciones somáticas en el grupo de pacientes con SMD en función del grupo de riesgo IPSS-R: Bajo Riesgo IPSS-R y Alto Riesgo IPSS-R.

Figura 36. Distribución de las mutaciones somáticas en el grupo de pacientes con SMD en función del grupo de riesgo citogenético: Favorable, Intermedio, Pobre.

Figura 37. Distribución de los 50 pacientes con SMD previamente clasificados de acuerdo con el estado de progresión de la enfermedad (Estado Temprano vs. Estado avanzado) en función de las características del perfil mutacional.

Figura 38. Gráficos en los que se representan las frecuencias de diferentes poblaciones celulares en SP, en función del perfil mutacional (ausencia/presencia de mutaciones en genes HMR).

Figura 39. Media±EEM de los niveles de IMF de HLA en blastos CD34⁺ en muestras de MO de los grupos control, SMD, y LMAs.

Figura 40. Caracterización de los diferentes estadios de diferenciación mieloide durante la mielopoyesis.

Figura 41. Band Dot plots en los que se representa los niveles de IMF del marcador CD11b a lo largo de los distintos estadios de maduración de la serie granulocítica.

Figura 42. Band Dot plots en los que se representa los niveles de IMF del marcador CD13 a lo largo de los distintos estadios de maduración de la serie granulocítica.

Figura 43. Análisis de la expresión HLA (IMF) en la célula tumoral CD34⁺ y en los diferentes estadios durante el proceso de diferenciación mieloide.

Figura 44. Media±EEM de los niveles de IMF de la expresión HLA-I en los linfocitos T CD3⁺, en muestras de MO de los grupos control, SMD y LMAs.

Figura 45. Plots en los que se representa la expresión de HLA en la célula tumoral CD34⁺ y linfocitos T CD3⁺ autólogos.

Figura 46. Representación gráfica de la progresión clínica del paciente 12.

Figura 47. Imágenes del programa Interactive Genome Viewer (IGV) en el que se visualiza la variante patogénica en SF3B1 detectada en el paciente 12.

Figura 48. Resultados del SNP-Array del CRM 6 del paciente 12.

Figura 49. Fragmentos del electroferograma de la secuenciación del exón 2 (codon 42 a codon 48) del locus HLA-B obtenido tras la segunda recaída post-TPH (22% blastos MO) del paciente 12.

Figura 50. Representación gráfica de la progresión clínica del paciente 11.

Figura 51. Resultados del SNP-Array del CRM 6 del paciente 11.

Figura 52. Resultados de la secuenciación HLA Sanger y Tipaje HLA Luminex del paciente 11.

Figura 53. Representación gráfica de la progresión clínica del paciente 28.

Figura 54. Resultados del SNP-Array del CRM 6 y secuenciación HLA Sanger del paciente 28.

Figura 55. Resultados del SNP-Array del CRM 6 del paciente 22 (LMAs), obtenidos en diferentes momentos del proceso de transformación leucémica.

Figura 56. Resultados del SNP-Array del CRM 15 en el paciente 12 (SMD del(5q)).

Figura 57. Resultados del SNP-Array del CRM 15 en una línea tumoral de melanoma.

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Clasificación diagnóstica de los SMD propuesta por la OMS en 2008 con las modificaciones más relevantes propuestas en 2017.
- Tabla 2.** Variables del IPSS.
- Tabla 3.** Grupos pronósticos IPSS y resultados clínicos.
- Tabla 4.** Variables consideradas en sistema IPSS-R.
- Tabla 5.** Categorías de riesgo citogenético que establece el grupo de Schanz y en los que se basa el IPSS-R.
- Tabla 6.** Grupos pronósticos IPSS-R y resultados clínicos.
- Tabla 7.** Diferentes receptores expresados sobre las células NK y sus correspondientes ligados.
- Tabla 8.** Panel de estudio de inmunofenotipo para la caracterización de los diferentes marcadores de superficie.
- Tabla 9.** Anticuerpos monoclonales (AcMo) utilizados en citometría de Flujo Multiparamétrica.
- Tabla 10.** Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio.
- Tabla 11.** Clasificación de los pacientes con SMD en base a la clasificación OMS 2017.
- Tabla 12.** Clasificación de los pacientes con SMD según índices pronósticos IPSS e IPSS-R.
- Tabla 13.** Clasificación de los pacientes con SMD según el riesgo citogenético.
- Tabla 14.** Valores absolutos (media±EEM), de linfocitos T, linfocitos B y células NK en SP.
- Tabla 15.** Porcentajes (media±EEM) de linfocitos T, linfocitos B y células NK en SP.
- Tabla 16.** Porcentajes (media±EEM) de las diferentes poblaciones celulares y características inmunogénicas de la célula tumoral (PD-L1) en pacientes con SMD y LMAs, y en muestras control, en SP.
- Tabla 17.** Porcentajes (media ±EEM) de las diferentes subpoblaciones linfocitarias en pacientes con SMD, en muestras de MO y SP.
- Tabla 18.** Porcentajes (media±EEM) de células MDSC (PMN-MDSC) y (Mo-MDSC) en SP en los grupos: SMD, LMAs, LMMC y LMA *de novo*.
- Tabla 19.** Porcentajes (media±EEM) de células CD34⁺, MDSCs y NKs NKG2D⁺ en muestras de SP, en la fase temprana SMD, fase tardía SMD y LMAs.
- Tabla 20.** Porcentajes (media±EEM) de células CD34⁺, MDSCs, Treg y Th1; y NKs NKG2D⁺ en SP, de pacientes con SMD con Alto Riesgo y Bajo Riesgo de progresión según *score* IPSS.
- Tabla 21.** Porcentajes (media±EEM) de células CD34⁺ y MDSCs en muestras de SP, de pacientes con SMD de Alto y Bajo Riesgo de progresión según *score* IPSS-R.
- Tabla 22.** Porcentajes (media±EEM) de células CD34⁺, Mo-MDSCs y NKs NKG2D⁺ y KIR2DL1⁺ en muestras de SP en base al riesgo citogenético.
- Tabla 23.** Carga tumoral por gen mutado (promedio, y rango) en el grupo de pacientes con SMD y LMAs.
- Tabla 24.** Características de los 36 pacientes incluidos en el estudio SNP-Array.
- Tabla 25.** Descripción del cariotipo y del perfil mutacional de los 36 pacientes incluidos en el estudio con SNP-Array.
- Tabla 26.** Tipaje HLA genómico de los 36 pacientes incorporados en el estudio de SNP-Array.
- Tabla 27.** Caracterización de los grupos HLA C1/C2 en los 36 pacientes incluidos en el SNP-Array.
- Tabla 28.** Caracterización de los grupos HLA-Bw en los 3 pacientes en los que se detectó CN-LOH HLA mediante SNP-Array.

Tabla Suplementaria 1. Porcentajes (media±EEM) de las diferentes poblaciones celulares y receptores antigénicos en muestras de MO en pacientes con SMD de Alto Riesgo y Bajo Riesgo de progresión según *score* IPSS.

Tabla Suplementaria 2. Porcentajes (media±EEM) de las diferentes poblaciones celulares y receptores antigénicos en muestras de SP en pacientes con SMD de Alto Riesgo y Bajo Riesgo de progresión según *score* IPSS.

Tabla Suplementaria 3. Porcentajes (media±EEM) de las diferentes poblaciones celulares y receptores antigénicos en muestras de MO en pacientes con SMD de Alto Riesgo y Bajo Riesgo de progresión según *score* IPSS-R.

Tabla Suplementaria 4. Porcentajes (media±EEM) de las diferentes poblaciones celulares y receptores antigénicos en muestras de SP en pacientes con SMD de Alto Riesgo y Bajo Riesgo de progresión según *score* IPSS-R.

Tabla Suplementaria 5. Media±EEM de las diferentes poblaciones celulares y receptores antigénicos en muestras de MO en pacientes con SMD, con riesgo citogenético: Favorable, Intermedio y Pobre.

Tabla Suplementaria 6. Media±EEM de las diferentes poblaciones celulares y receptores antigénicos en muestras de MO en pacientes con SMD, con riesgo citogenético: Favorable, Intermedio y Pobre.

Tabla Suplementaria 7. Porcentajes (media±EEM) de las diferentes poblaciones celulares y receptores antigénicos en muestras de MO en pacientes con SMD según ausencia/presencia mutaciones HMR.

Tabla Suplementaria 8. Porcentajes (media±EEM) de las diferentes poblaciones celulares y receptores antigénicos en muestras de SP en pacientes con SMD según ausencia/presencia mutaciones HMR.

Tabla Suplementaria 9. Porcentajes (media±EEM) de las diferentes poblaciones celulares y receptores antigénicos en muestras de MO en pacientes con SMD según el *score* mutacional.

Tabla Suplementaria 10. Porcentajes (media±EEM) de las diferentes poblaciones celulares y receptores antigénicos en muestras de SP en pacientes con SMD según el *score* mutacional.

Tabla Suplementaria 11. Porcentajes (media±EEM) de las diferentes poblaciones celulares y receptores antigénicos en muestras de MO en pacientes con SMD según la frecuencia mutacional.

Tabla Suplementaria 12. Porcentajes (media±EEM) de las diferentes poblaciones celulares y receptores antigénicos en muestras de MO en pacientes con SMD según la frecuencia mutacional.

Tabla Suplementaria 13. Perfil genético de los 50 pacientes con SMD a los que se les ha realizado de forma conjunta el estudio mutacional y del microambiente tumoral.

RESUMEN

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) constituyen un grupo heterogéneo de neoplasias clonales, caracterizados por una hematopoyesis ineficaz, displásica, citopenia(s) periférica(s), y elevada tendencia de transformación a leucemia mieloide aguda (LMA). La evolución clínica de la enfermedad es variable; por esta razón, recientemente, se han establecido diversos sistemas de clasificación y pronóstico, dividiendo así a los pacientes de acuerdo con la supervivencia global (SG) y el riesgo de progresión leucémica. Actualmente, los mecanismos determinantes de la patogénesis del SMD permanecen sin aclarar. Mientras que las alteraciones citogenéticas se detectan en el 50% de los pacientes al diagnóstico, los estudios de secuenciación masiva han identificado al menos una mutación en el 85-90% de los mismos. Especialmente, la presencia de mutaciones somáticas adquiridas en genes de alto riesgo molecular (*High Molecular Risk*, HMR) (*TP53*, *ETV6*, *ASXL1*, *RUNX1*, *EZH2*) han sido asociadas con pronóstico desfavorable, independientemente de los sistemas pronósticos actuales.

En consonancia, algunos autores asocian el riesgo de progresión de la enfermedad con más de 40 mutaciones, donde la aparición de variantes tumorales resistentes favorecería dicho proceso. Pero, con independencia de que existan fenómenos mutacionales y/o epigenéticos intrínsecos a la célula neoplásica que le confieran un aumento en la capacidad proliferación, anti-apoptótica, ect., existen evidencias que apoyan una alteración en el control inmunitario que llevaría al escape inmunológico y expansión de las clona maligna. En este contexto, el SMD de Alto riesgo se caracteriza por un aumento de células mieloides supresoras (MDSCs), disminución de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos y células NKs, entre otras.

A la vista de lo recogido en la bibliografía, tanto los factores genéticos como inmunológicos descritos hasta la fecha han sido estudiados por los diversos autores en contextos independientes. Sin embargo, este estudio recoge por primera vez un análisis conjunto de las características genéticas (cariotipo y perfil mutacional) e inmunogénicas (HLA y expresión de PD-L1) intrínsecas a la célula tumoral CD34⁺, junto con un análisis de las características inmunofenotípicas del microambiente tumoral en el que se desarrolla.

Nuestros resultados muestran cambios profundos que afectan a diferentes poblaciones leucocitarias, tanto a nivel medular como periférico. Los estudios llevados a cabo mediante citometría de flujo revelan que los pacientes diagnosticados con SMD presentan una disminución en el número absoluto de células T CD4⁺, una mayor presencia de marcadores asociados a células T exhaustas, una mayor frecuencia de células MDSC, y cambios inmunofenotípicos asociados con la funcionalidad de células NK.

En base a las características genéticas de la célula tumoral CD34⁺, el estudio del perfil mutacional reveló que la mayoría de los pacientes (~80%) presentaron mutaciones somáticas en los genes estudiados, dato similar al recogido en otros estudios. Especialmente, las mutaciones en genes HMR se asociaron con el grupo de pacientes de SMD en etapas avanzadas de la enfermedad. Curiosamente, algunos de ellos fueron clasificados según *score* pronóstico IPSS-R de bajo riesgo y/o cariotipos favorables. Los resultados revelan el importante papel de las mutaciones somáticas en la progresión y transformación leucémica, independientemente de *scores* pronósticos.

Así mismo, los análisis del perfil mutacional en relación con el microambiente leucocitario no revelaron ninguna asociación entre ellos, por lo que sugerimos que, las mutaciones somáticas representan mecanismos desfavorables con valor pronóstico independiente del microambiente inmunitario. De igual forma, la presencia de cariotipos adversos en la célula tumoral se asoció con el grupo de pacientes en etapas avanzadas de la enfermedad; sin embargo, a diferencia del *status* mutacional, los análisis estadísticos revelaron cierta asociación del perfil citogenético con el microambiente leucocitario, contribuyendo ambos de forma conjunta a la progresión tumoral.

En relación a las características inmunogénicas de la célula tumoral CD34⁺ y que podrían afectar al reconocimiento y a la activación celular T y NK, en contra a lo observado por otros grupos en otro tipo de tumores, la transformación y progresión del SMD no lleva consigo cambios importantes en la expresión de moléculas HLA. Por el contrario, se observó un aumento de la expresión del ligando inhibidor PD-L1 en el grupo de pacientes con SMD. La expresión HLA-I se conservó en todos los casos estudiados; no se ha observado ningún caso con pérdida total de expresión HLA-I. Sin embargo, se ha detectado una pérdida de heterocigosidad (*Loss of Heterocigosity*, LOH) en 3 de los casos estudiados. Los estudios de SNP-Array (*Single-Nucleotide Polimorfism Array*) en el cromosoma 6 revelaron que, solamente 3 de los 36 pacientes estudiados, presentaron una LOH en la región HLA, sin alteración en el número de copias (*Copy Neutral Loss of Heterozigosity*, CN-LOH).

Inicialmente, los pacientes con CN-LOH HLA fueron clasificados de bajo riesgo de progresión según *scores* pronósticos, sin embargo, experimentaron una evolución dramática que no pudo explicarse por la adquisición de factores adversos (cariotipo desfavorable y/o mutaciones asociadas a riesgo molecular). En 2 de estos pacientes, la CN-LOH HLA fue completa; y, curiosamente, ambos presentaban homocigosidad para los grupos HLA-C (C1/C1), lo que explicaría el escape a la acción de células NK. El tercer paciente presentaba una CN-LOH HLA parcial, debido posiblemente a la heterocigosidad para los grupos HLA-C; sin embargo, la progresión de la enfermedad podría explicarse por la duplicación de los ligandos de inhibición para el alelo HLA-C conservado. Por lo que, en ausencia de factores de riesgo, la CN-LOH HLA podría suponer un mecanismo de inmunoevasión que explicaría la progresión y transformación en este grupo de pacientes. De nuestros datos se desprende que, es posible que la pérdida selectiva (LOH) antes que la pérdida total de expresión HLA en la célula neoplásica, contribuya de una manera más eficiente al escape simultáneo de células T y NKs. En el resto de casos, en los que no hemos podido demostrar alteraciones intrínsecas a la célula neoplásica, es probable que la progresión tumoral se pueda ver favorecida por las importantes alteraciones observadas en el microambiente medular y que afectan tanto a células T como a células NK.

En resumen, factores inmunológicos, extrínsecos e intrínsecos a la célula tumoral, se encuentran alterados en el SMD, disminuyendo así la efectividad de la inmunovigilancia tumoral. Simultáneamente, la adquisición de algunas alteraciones genéticas (cariotipo y/o mutaciones somáticas) contribuyen a la expansión clonal y progresión de la enfermedad de forma independiente.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CONCEPTO Y ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Los Síndromes Mielodisplásicos (SMD) fueron probablemente descritos en 1900 por Leube bajo el término “*leukanamie*”, quien describió una anemia macrocítica severa con evolución hacia leucemia aguda, de origen infeccioso (Nimer 2008). Algunas décadas después, en 1942, *Chevalier* y col. utilizaron el término “*odo-leucemia*”, para definir a un conjunto de patologías que se encontraban en el umbral de la leucemia. En 1949, otros autores usaron la terminología “*pre-leucemia*” o “*leucemia latente*”, describiendo a un grupo de pacientes con anemia refractaria (AR) antes del desarrollo de Leucemia Mieloide Aguda (LMA) (Hamilton-Paterson 1949); y posteriormente, en 1953 se amplió el concepto incluyendo citopenias de todas las estirpes (Block et al., 1953). En 1975 en París, en una conferencia sobre leucemias inclasificables se sugirió el término “*displasia hematopoyética*” (Bessis et al., 1976) y, finalmente, en 1976, el grupo Franco Americano Británico (FAB) denominó a estos desórdenes Síndromes Mielodisplásicos. La primera clasificación de los SMD fue definida por este mismo grupo en 1982 (Bennett et al., 1982).

Actualmente, los SMD constituyen un grupo heterogéneo de desórdenes hematológicos clonales que afectan a la célula madre hematopoyética (Hematopoietic Stem Cell, HSC). Se caracterizan morfológica y clínicamente por hematopoyesis ineficaz y displásica, con alteraciones morfológicas en uno o más linajes celulares de origen mieloide, que se traduce de forma habitual en una médula ósea (MO) hipercelular y citopenia(s) periféricas. La citopenia mas común es la anemia, presente en el 60% de los casos al diagnóstico, y que, a lo largo del curso evolutivo, suele suponer dependencia transfusional. Otras manifestaciones comunes son: riesgo elevado de infección o hemorragia y tendencia de evolución a Leucemia Mieloide Aguda (LMA) (Béjar and Steensma 2014).

1.2. EPIDEMIOLOGÍA

Actualmente, la incidencia global exacta de los SMD es difícil de establecer debido a que existen varios factores que limitan una evaluación precisa. Se consideran una enfermedad rara, con una incidencia estimada de 3,7-4,8 casos por cada 100.000 habitantes al año, sin ajustar por edad (Ma 2012; Neukirchen et al., 2011). Afectan principalmente a la población anciana, donde la edad media al diagnóstico es de 70 años (Irons et al., 2006; Ma 2012).

La incidencia es mayor en personas de edad avanzada. No existen argumentos para decir que los casos aumenten; el incremento de la incidencia se atribuye al envejecimiento de la población junto con una mejora de las técnicas diagnósticas. Mientras que en pacientes menores a 50 años (5-10%), la incidencia anual es 0.5 por cada 100.000 habitantes (Kuendgen et al., 2006); la estimación anual de incidencia en el rango comprendido entre los 60-69 y más de 70 años es de 5 y 30 casos por cada 100.000 habitantes, respectivamente. La afectación en el varón es mayor que en la mujer (1.5-2 veces); sin embargo, en el síndrome 5q-, se ha observado un predominio hacia las mujeres. Por otro lado, no se ha encontrado ninguna asociación con la raza (Ma 2012; Neukirchen et al., 2011). Son infrecuentes en edades pediátricas, representando el 10% de todas las hemopatías de la infancia (Niemeyer et al., 2008).

1.3. ETIOLOGIA

El 90% de los SMD son de etiología desconocida (SMD *de novo*) y sólo en una minoría de los pacientes ($\leq 10\%$) aparecen de forma secundaria, debido principalmente al empleo de drogas antineoplásicas (esquemas prolongados o intensos, y los que incorporan agentes alquilantes o inhibidores de la topoisomerasa II (epidodofilotoxinas y antraciclinas)). Los SMD secundarios se caracterizan por presentar una morfología altamente displásica, con médulas óseas hipocelulares y con fibrosis. En la mayoría de los casos (90%) presentan cariotipos complejos, afectando principalmente a los cromosomas 5 y/o 7, y *TP53* mutado. Cuando la aparición de la enfermedad ocurre tras tratamiento con inhibidores de la topoisomerasa II, se ha observado una rápida progresión hacia LMA, comprometiendo de forma mayoritaria a los cromosomas 11q23 o 21q22 (Catenacci et al., 2005; Qian et al., 2010).

Otros factores como: la edad, el sexo masculino, el tabaquismo, la exposición a solventes, pesticidas y/o radiaciones ionizantes, el contacto con productos químicos, fundamentalmente los derivados del benceno; el tratamiento con inmunosupresores y las infecciones víricas, pueden influir en el desarrollo de la enfermedad (Catenacci et al., 2005; Qian et al., 2010). En la infancia su aparición se asocia con la existencia de enfermedades constitucionales, como el Síndrome de Down o síndromes de fallo medular congénitos, como la anemia de Fanconi (Niemeyer et al., 2008).

1.4. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de SMD resulta complejo, ya que es fundamental descartar otras posibles causas que cursan con citopenia(s) y/o rasgos displásicos, sin que estas constituyan una enfermedad clonal. En 2007, se publicó un documento concenso que recogía los criterios mínimos para el diagnóstico del SMD, establecido ante la presencia de unos pre-requisitos, y al menos uno de los criterios decisivos. En ausencia de criterios decisivos, los co-criterios pueden ayudar a establecer el diagnóstico de “alta sospecha de SMD” (Valent et al., 2007).

Los requisitos previos son: citopenia constante en una o más de las líneas: Eritroide (Hb<11g/dL), Neutrófila (neutrófilos<1.5x10⁹/L), Megacariocítica (plaquetas<100x10⁹/L); y exclusión de otras causas, hematológicas o no, de citopenias y/o displasia. **Los criterios decisivos incluyen:** displasia en al menos 10% de las células de una o más líneas hematopoyéticas en MO; 5-19% blastos en extensión de MO, y anomalías cromosómicas recurrentes características de SMD, por cariotipo convencional o FISH. A los pacientes que no cumplen los criterios decisivos, pero presentan hallazgos típicos relacionados con el SMD (anemia megaloblástica con dependencia transfusional), se les puede aplicar **pruebas adicionales (co-criterios)**, para el diagnóstico de “alta sospecha de SMD”. Tales pruebas incluyen: citometría de flujo (fenotipo anómalo en MO), evidencia molecular de clonalidad por ensayo HUMARA, perfil genético o análisis de mutaciones puntuales (por ejemplo, mutación RAS), y disminución de formación de colonias en MO y/o progenitores circulantes en sangre periférica (SP) (Valent et al., 2007).

1.5. CLASIFICACIÓN E ÍNDICES PRONÓSTICOS

1.5.1. CLASIFICACIÓN FAB

En el año 1982, el grupo cooperativo “Franco-Americano-Británico” (FAB) propuso la primera clasificación para los SMD “*de novo*”. En dicha clasificación se establecieron 5 subgrupos, basándose en los siguientes criterios: porcentaje de blastos existentes en MO y SP, porcentaje de sideroblastos en anillo y presencia de monocitosis en SP (Bennett et al., 1982). Sin embargo, algunas entidades definidas, como la AR, englobaban un grupo de pacientes con características morfológicas y pronósticas muy heterogéneas. Además, se incluía dentro de la categoría AREB-t, pacientes con blastos 21-30%, lo que en la clasificación OMS, corresponde con LAM. Por otro lado, no aportaba un claro valor pronóstico, y no consideraba las anomalías citogenéticas, factor hoy en día imprescindible a nivel diagnóstico y pronóstico.

1.5.2. CLASIFICACIÓN OMS

Desde el año 1990, la OMS ha ido proponiendo nuevas modificaciones con el objeto de clasificar, de una manera más eficiente, a los pacientes con SMD: 1999 (Jaffe et al., 1999), 2001 (Brunner et al., 2001), 2008 (Vardiman et al., 2009), y recientemente, 2016 (Bennett 2016), finalmente publicada en 2017. En esta última revisión, la OMS distingue siete categorías, y se fundamenta, principalmente, en el grado de displasia (número de líneas displásicas) y en el porcentaje de blastos para la clasificación de la enfermedad; mientras que las citopenias específicas presentan un impacto mínimo (Arber et al., 2016). Por ello, cambia la nomenclatura (p.ej. sustituye los términos “citopenia” y “anemia” por el de “SMD”) y mantiene los parámetros previos de citopenias, según IPSS original, y el porcentaje de blastos. Mantiene el umbral para definir displasia (10% células displásicas en cualquier linaje hematopoyético).

Redefine el subtipo SMD sideroblástico en función de la mutación *SF3B1* y el subtipo SMD del(5q) con anomalía citogenética aislada (permitiendo una anomalía citogenética adicional aislada, a excepción -7/del(7q)).

Existe un cambio importante en los criterios diagnósticos para las neoplasias mieloides con predominio eritroide (precursores eritroides $\geq 50\%$ en MO). En la clasificación actualizada, el denominador utilizado para calcular el porcentaje de blastos es el conjunto de células nucleadas en MO, no solo las "células no eritroides". Esto originará que los casos diagnosticados como eritroleucemia, ahora serán considerados como SMD con exceso de blastos.

En la **Tabla 1**, se recogen de forma resumida las principales modificaciones:

OMS 2008	OMS 2017	Citopenias *	% blastos MO	% SA en MO	Displasia morfológica	Citogenética
CRDU AR NR TR	SMD con DU	1 o 2	<5%**	<15%	1 línea	Cualquiera***
ARSA	SMD con SA+ y DU (± mutación SF3B1)	Anemia	<5%**	>15%	Eritroide	Cualquiera***
CRDM	SMD con DM	Citopenias	<5%**	<15%	>2 líneas	Cualquiera***
CRDM-SA	SMD con SA SMD con SA y SF3B1- SMD con SA y SF3B1+		Bastones Auer - ≥15% ≥5%			
AREB-1	SMD con exceso de blastos tipo 1	Citopenias	5-9% Bastones Auer-	Indistinto	Indistinto	Cualquiera***
AREB-2	SMD con exceso de blastos tipo 2	Citopenias	10-19% Bastones Auer+/-	Indistinto	Indistinto	Cualquiera***
SMD del(5q) aislada	SMD 5q- sin exceso de blastos en SP/MO sin displasia granulocítica. Puede coexistir una segunda alteración citogenética de bajo riesgo Recomendado estudio de TP53 TP53+ (↑ riesgo. ↓ respuesta a Lenalidomida) TP53- (↓ riesgo. ↑ respuesta a Lenalidomida)	Anemia	<5%** Bastones Auer +/-	Indistinto	Megacariocitos con núcleo hipolobulado	Del 5q aislado o con una alteración citogenética (excepto -7/del(7q))
SMD Inclasificable	CRDU con pancitopenia Las citopenias deben ser IPSS: Neutrófilos <1.8x10 ⁹ /L, Hb<10g/dL, PLT<100x10 ⁹ /L CRDU/CRDM con 1% de blastos en SP SMD sin exceso de blastos o displasia pero con citogenética SMD+	Citopenias	<5%**		< 10% en > 1 línea mieloide + alteración citogenética compatible	Cualquiera***

Tabla 1. Clasificación diagnóstica de los SMD propuesta por la OMS en 2008 con las modificaciones más relevantes propuestas en 2017. AR: anemia refractaria; ARSA: AR con sideroblastos en anillo; NR: neutropenia refractaria; TR: trombopenia Refractaria; AREB: AR con exceso de blastos; CRDU: citopenia refractaria con displasia unilínea; CRDM: citopenia refractaria con displasia multilínea; DM: displasia multilínea; DU: displasia unilínea; SA: sideroblastos en anillo. *10% de displasia en línea megacariocítica pasaría a ser del 30-40% en la nueva clasificación. **Informar el % exacto de blastos (no el rango). *** A no ser que cumpla los criterios SMD del(5q).

1.5.3. CLASIFICACIÓN DE LOS SMD EN RELACIÓN CON EL PRONÓSTICO

Los SMD son un grupo de patologías con una elevada heterogeneidad en cuanto a sus características clínicas, biológicas, y pronósticas, siendo ésta última variable en función de grupos de riesgo y comorbilidades asociadas. En algunos casos, la enfermedad evoluciona y progresa hacia fases más avanzadas; sin embargo, en otros pacientes, las complicaciones derivadas de las citopenias son la principal casusa de morbimortalidad. Por ello, es imprescindible identificar parámetros pronósticos que nos permitan predecir, con la mayor precisión posible, su evolución clínica.

A partir de parámetros que han demostrado su valor pronóstico independiente, se han desarrollado esquemas pronósticos integrados que permiten la estratificación de los pacientes en distintos grupos de riesgo. Los *scores* pronósticos con mayor aplicabilidad en la práctica clínica son: el Sistema Pronóstico Internacional o IPSS (*International Prognostic Scoring System*) y el IPSS revisado (IPSS-R) (Greenberg et al., 1997; Greenberg et al., 2012). Suponen sistemas de cálculo sencillo, capaces de definir grupos pronósticos. Por estas razones, se consideran de referencia para establecer el pronóstico individual y para la planificación de los tratamientos.

Otros sistemas pronósticos integrados son: Índice Pronóstico Español (IPE) (Sanz et al., 1989), el Índice pronóstico de Düsseldorf (Aul et al., 1994) y el WHO classification-based prognostic scoring system (WPSS) (Malcovati et al., 2007), el cual incorpora la dependencia transfusional. Sin embargo, ninguno de los esquemas pronósticos mencionados anteriormente se ha desarrollado sobre una cohorte recogida de forma prospectiva, como se recomienda en estos casos.

1.5.3.1. Internatinal Prognostic Scoring System (IPSS)

En 1997, *Greenberg* y col. desarrollaron el primer sistema pronóstico en esta patología, el IPSS (Greenberg et al., 1997).

Fue propuesto por el *International MDS Risk Anlysis Workshop* y está basado en el porcentaje de blastos medulares, número de citopenias y 3 categorías citogenéticas que incluyen 6 patrones citogenéticos diferentes definidos en base a 4 alteraciones citogenéticas concretas: -Y, del(5q), del(20q) y anomalías del cromosoma 7, de manera aislada o en combinación con otras alteraciones citogenéticas menos frecuentes; con elevada capacidad predictiva a nivel de supervivencia global (SG) y transformación leucémica, pero presenta una serie de limitaciones:

- No es aplicable cuando el estudio citogenético no está disponible, lo que ocurre aproximadamente en el 30% de los casos.
- No tiene en cuenta la severidad de las neutropenias o plaquetopenias. La dependencia transfusional está asociada con pronóstico desfavorable.
- Las implicaciones pronósticas del grupo de riesgo citogenético Intermedio no están bien establecidas, presentando estos pacientes una evolución muy variable.

Pronóstico	Puntuación				
	0	0.5	1	1.5	2
Blastos medulares	<5%	5-10%		11-19%	20-30%
Cariotipo	Bueno*	Intermedio*	Malo*		
Citopenias	0-1	2-3			

Tabla 2. Variables del IPSS. * Cariotipo: Bueno: normal, -Y, del(5q), del(20q) (única anomalía). Malo: complejo (≥ 3 anomalías), anomalías en cromosoma 7. Intermedio: otras anomalías citogenéticas. Citopenias: Hb <10 g/dl; Neutrófilos < $1.8 \times 10^9/L$; Plaquetas < $100 \times 10^9 /L$.

En base a los parámetros citados anteriormente (**Tabla 2**), los pacientes con SMD se clasifican en cuatro categorías: Bajo, Intermedio-1, Intermedio-2 y Alto riesgo de progresión a LMA; con un pronóstico significativamente diferente. La mediana estimada de supervivencia para los grupos de riesgo y el tiempo en el que el 25% de los pacientes evolucionan a LMA, se detalla a continuación (Greenberg et al., 1997) (**Tabla 3**).

Pronóstico	Puntuación	Mediana SV (años) (ausencia tto)	25% progresión LMA (ausencia tto)
Bajo	0	5-7	9.4
Intermedio-1	0.5-1.0	3.5	3.3
Intermedio-2	1.5-2.0	1.1	1.1
Alto	>2.5	0.4	0.2

Tabla 3. Grupos pronósticos IPSS y resultados clínicos. Mediana de supervivencia (en años) para cada grupo de riesgo. Tiempo de transformación a LMA del 25% de pacientes para cada grupo de riesgo (en años).

1.5.3.2. IPSS-Revisado (IPSS-R)

Con la aparición de nuevos índices pronósticos, fue necesario realizar una modificación del IPSS, el IPSS-R. Para ello se creó un proyecto, el *Working Group for Prognosis in MDS (IWP-PM)*, donde se realizó un estudio internacional en el que participaron investigadores de múltiples instituciones internacionales (Greenberg et al., 2012). El IPSS-R está basado en las variables ya presentes, pero redefiniendo sus valores, y confiriéndole una mayor relevancia a las alteraciones citogenéticas (**Tabla 4**).

- Se modifica el % blastos en MO, dividiendo el grupo de <5% de blastos en dos: de 0-2% y >2-<5%; y el grupo de >10% de blastos se unifica en una categoría.
- Respecto a las citopenias, se modifica el valor de la cifra absoluta de neutrófilos a $0.8 \times 10^9/L$.
- Se evalúan algunas variables: la edad, el estado general, las comorbilidades e indicadores bioquímicos, como el nivel de LDH, ferritina y $\beta 2$ -microglobulina; pero estas variables no forman parte de dicho *score*.

Pronóstico	Puntuación						
	0	1.5	1	1.5	2	3	4
Riesgo Citogenético	Muy Bueno		Bueno		Intermedio	Pobre	Muy Pobre
Blastos MO %	0-2		>2-<5		5-10	>10	
Hb (g/dL)	≥10		8-<10	<8			
Plaquetas x10⁹/L	≥100	50-99	<50				
PMN x10⁹/L	≥0.8	<0.8					

Tabla 4. Variables consideradas en sistema IPSS-R. Citopenias: Hb <10 g/dl; Neutrófilos < 0.8x10⁹/L; Plaquetas <100x10⁹ /L.

Schanz y col., junto con el Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica (GCECGH), propusieron un nuevo *score* citogenético basado en los estudios llevados a cabo en pacientes con SMD o LMA oligoblástica de los grupos español, alemán-austríaco, e internacional. Definieron 19 alteraciones citogenéticas, las cuales clasificaron en 5 subgrupos pronósticos según el riesgo de progresión a LMA y SG (Chanz et al., 2012).

Por tanto, para cada variable pronóstica (**Tablas 4 y 5**) se establece una puntuación y se definen cinco grupos de riesgo (**Tabla 6**).

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

Tabla 5. Categorías de riesgo citogenético que establece el grupo de Schanz (Chanz et al., 2012) en las que se basa el score IPSS-R.

Pronóstico	Puntuación	Mediana SV (años) (ausencia tto)	25% progresión LMA (ausencia tto)
Muy Bajo	0-1.5	8.8	No alcanzada
Bajo	>1.5-3	5.3	10.8
Intermedio	>3-4.5	3	3.2
Alto	>4.5-6	1.6	1.4
Muy Alto	>6	0.8	0.7

Tabla 6. Grupos pronósticos IPSS-R y resultados clínicos. Mediana de supervivencia (en años) para cada grupo de riesgo. Tiempo de transformación a LMA del 25% de pacientes para cada grupo de riesgo (en años).

1.5.4. SMD HIPERPLÁSICO vs. HIPOPLÁSICO

Atendiendo a la celularidad medular, los SMD se clasifican en dos grupos: (1) SMD con celularidad normal o aumentada (SMD-NH), y (2) SMD con celularidad disminuida o hipoplásicos (SMD-h).

Los SMD Normo/Hipercelulares o Hiperplásicos son la variante más frecuente. Representan una elevada frecuencia del total de casos con SMD diagnosticados (65-70%), por lo que la mayoría de los estudios publicados sobre impacto pronóstico IPSS o IPSS-R y/o perfil mutacional de riesgo hacen referencia a este grupo (Nazha et al., 2015). A pesar de la presencia de citopenias en SP, la MO es típicamente Normo/Hipercelular.

Sin embargo, un grupo de pacientes (10-15%) presentan una MO hipocelular; con una frecuencia mayor en pacientes de temprana edad (Tong et al., 2012). Globalmente, los SMD-h *de novo* se caracterizan por una mayor dependencia transfusional y mayor frecuencia de los subtipos de bajo riesgo de acuerdo con el IPSS-R. Histológicamente, existe un predominio de disgranulopoyesis y dismegacariopoyesis, escasa displasia eritroide y a menudo ausencia de incremento en % blastos (Yao et al., 2016). La frecuencia de anomalías citogenéticas parece ser similar al resto de SMD (47%), y no se han descrito anomalías específicas de SMD-h. En relación con el perfil mutacional, varios estudios concluyen que los SMD-h presentan inferior *score* mutacional (número total de mutaciones somáticas) y una menor frecuencia de mutaciones en genes de alto riesgo molecular (*High Molecular Risk*, HMR): *ASXL1*, *RUNX1*, *EZH2*, *ETV6* y *TP53* (Béjar et al., 2011).

Como se ha comentado anteriormente, son escasos los trabajos publicados en relación al SMD-h. A pesar de las características que lo definen (MO hipocelular, varios grados de dismielopoyesis y, en ocasiones, alteraciones cariotípicas), diversos autores han implicado también al sistema inmunitario en la patogénesis del SMD-h. En esta línea, se han observado una serie de hallazgos también presentes en los SMD-NH. Se ha postulado una expansión oligoclonal de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (CTLs), una expansión policlonal de linfocitos T colaboradores o helper (Th), una sobreexpresión de FAS-L en los linfocitos T CD3⁺ y un aumento de la expresión de TRAIL (ligando inductor de la apoptosis relacionada con el TNF) en las células NK, induciendo así la apoptosis de las células displásicas (Serio et al., 2014).

Además, se ha observado en ambos grupos una mayor liberación de citoquinas Th1, como IFN- γ , o de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), con respecto al grupo control. Así mismo, también se ha detectado una elevada frecuencia de polimorfismos relacionados con la producción de citocinas proinflamatorias, tales como TNF- α ; y de interleucina (IL) 10 (IL-10) (Serio et al., 2014).

1.6. FISIOPATOLOGÍA DEL SÍNDROME MIELODISPLÁSICO

1.6.1. ALTERACIONES EPIGENÉTICAS EN EL SMD

La transformación del SMD a LMA es un proceso que envuelve tanto alteraciones genéticas como epigenéticas. Se sabe que la metilación del ADN es un mecanismo epigenético que regula la transcripción de los genes mediante la metilación de citosinas de las regiones promotoras presentes en las islas CpG; asociándose con el silenciamiento de muchos genes supresores de tumores (Esteller 2008).

En los SMD también se encuentran alterados mecanismos epigenéticos que regulan los procesos de metilación del ADN y la deacetilación de las histonas (Issa 2013). Actualmente, se desconoce el papel que juega la hipermetilación en el SMD de bajo riesgo, sin embargo, en el alto riesgo la hipermetilación de genes supresores de tumores está asociada con una supervivencia reducida y un elevado riesgo de transformación leucémica (Aggerholm et al., 2006). Aproximadamente, se ha observado que el 50% de los casos con SMD presentan una hipermetilación del promotor del gen P15 (INK4b), asociándose con blastosis en MO (Quesnel et al., 1998). Por otro lado, se ha descrito también en el SMD de alto riesgo, una expansión de las células T reguladoras (Treg) reguladas epigenéticamente (Kordasti et al., 2007). Estas dianas biológicas son la clave de los tratamientos hipometilantes que constituyen la terapia estándar de los SMD de alto riesgo.

1.6.2. ALTERACIONES CITOGÉNÉTICAS EN EL SMD

La presencia de anomalías citogenéticas en el SMD confirma una alteración clonal, identifican ciertas entidades morfológicas y/o se comportan como factor pronóstico independiente. Además, en algunos casos, presentan valor predictivo de respuesta al tratamiento; por ejemplo, algunos autores han asociado la presencia de del(13q) con una respuesta favorable a IST (Hosokawa et al., 2012).

Se han detectado mediante FISH o cariotipo convencional de bandas G alteraciones citogenéticas aproximadamente en el 50% de los pacientes con SMD *de novo*, y en el 80% relacionados con la terapia. Los SMD secundarios presentan un mayor número de cariotipos anormales, cambios citogenéticos complejos, y pérdidas que implican el cromosoma 5, 7 o ambos (Godley and Larson 2008; Haase et al., 2007). No existe una alteración exclusiva que sea diagnóstica por sí misma de SMD, al contrario de otras enfermedades hematológicas como las leucemias agudas.

Además, la frecuencia de las alteraciones citogenéticas difiere según distintas entidades clínicas. Mientras que la frecuencia de dichas alteraciones es mayor en el subtipo “Anemia Refractaria con Exceso de Blastos” (AREB) (75% de los casos), en los pacientes con AR y Anemia Refractaria con Sideroblastos en Anillo (ARSA), esta frecuencia disminuye (15-20%).

Las alteraciones cromosómicas más frecuentes en SMD primario son las deleciones totales o parciales de los cromosomas 5, 7, 12, 20 e Y; la trisomía del cromosoma 8 y los cariotipos complejos (≥ 3 alteraciones cromosómicas, que incluya al menos 1 alteración estructural). En el SMD de bajo riesgo IPSS-R, los hallazgos más frecuentes corresponden a cariotipos normales, del (5q) o del (20q) aisladas y pérdida del Y (Haase 2008; Raza and Galili 2012).

La pérdida total o parcial del cromosoma 5, aislada o acompañada de otras alteraciones, es un hallazgo frecuente en el SMD. En el brazo largo del CRM 5 se localizan numerosos genes relacionados con los procesos que regulan la hematopoyesis. Actualmente, no se ha identificado ningún gen supresor de tumores cuya ausencia sea responsable del síndrome 5q-. Se cree que la haploinsuficiencia de un gen que codifica a la proteína ribosómica RPS14 podría ser la causa de dicho síndrome (Thomay et al., 2014).

La pérdida total o parcial del cromosoma 7 es otra anomalía citogenética común (10% de los SMD primarios y 50% de los secundarios). El segmento delecionado se encuentra a nivel de la banda q22, afectando a 14 genes. Se piensa que el mecanismo implicado es la haploinsuficiencia (Ademà et al., 2013). Otras alteraciones, como la del(20q) aislada se asocia con mínima displasia morfológica y trombocitopenia (Gupta et al., 2007).

Se cree que al menos una proporción de las células T derivan del clon maligno. En algunos pacientes con SMD se han detectado, mediante hibridación genómica comparativa (aCGH), anomalías citogenéticas idénticas presentes tanto en células hematopoyéticas *stem* como en células T. Se postula que la ausencia de detección en el resto de pacientes es debido al bajo número de células T derivadas del clon maligno. Por otro lado, se ha demostrado un elevado porcentaje de células en MO con monosomía 7 (células hematopoyéticas *stem*, progenitores de células B y células T/NK), sin embargo, no fue detectada en células B y T de SP (Miura et al., 2000). La ausencia de detección en muestras de SP se le atribuye a un posible proceso de apoptosis medular antes de éstas lleguen a ingresar en circulación.

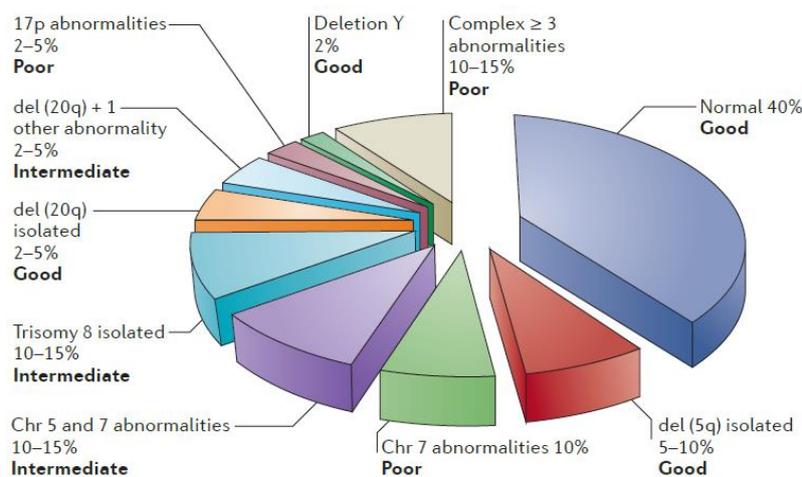


Figura 1. Incidencia y pronóstico de las anomalías cromosómicas más frecuentes en el SMD (Raza and Galili 2012).

El cariotipo convencional puede llegar a ser no informativo en el 20% de los casos. Cuando se combina con estudios citogenéticos y moleculares (FISH, aGCH y SNP-Array (*Single-Nucleotide Polimorfism Array*), la detección de aberraciones cromosómicas recurrentes o desequilibradas mejora a casi el 80%, mejorando la estratificación del riesgo y la precisión diagnóstica. La aCGH facilita la identificación de pequeñas anomalías cromosómicas que pueden no llegar a ser detectables mediante citogenética tradicional (Stevens-Kroef et al., 2017). Estas anomalías pueden incluir deleciones en la región 4q24, que contiene el gen *TET2*; pequeñas deleciones en la región 5q31 y deleciones en las regiones 7q22.1 y 21q22.12 (Thiel et al., 2011). Por otra parte, el mantenimiento de la integridad génica (pérdida <3 MB), ha sido asociado con menor riesgo de transformación leucémica (Starczynowski et al., 2008).

Del mismo modo, SNP-Array es una técnica de alta resolución que permite identificar alteraciones adicionales, incluido el número de copias y la pérdida o retención de heterocigosidad, no detectables mediante técnicas convencionales (Mohamedali et al., 2007). No precisa de células en división (metafases); sin embargo, no detecta pequeñas clonas ni translocaciones balanceadas (Tiu et al., 2011).

1.6.3. MUTACIONES SOMÁTICAS EN EL SMD

Actualmente, se desconoce en qué célula se originan los eventos iniciadores en los SMD. Se considera al igual que la práctica totalidad de las hemopatías malignas mieloides, afectarían a las HSCs; siendo esta afectación mucho menos frecuente entre las neoplasias linfoides. Los estudios realizados en pacientes con SMD con cariotipos alterados, han demostrado la presencia de poblaciones mieloides y de células linfoides clonales (Della Porta et al., 2008). Un estudio reciente ha descrito mutaciones *TET2* en células T en un número significativo de pacientes con SMD (Smith et al., 2010). Las mutaciones somáticas ocurrirían en el genoma de las HSCs, conduciendo a la transformación de una HSC normal en una célula de origen clonal. La hematopoyesis clonal se define por la presencia de eventos genéticos, tales como reordenamientos cromosómicos y/o alteraciones genéticas, confiriéndole una ventaja selectiva en el crecimiento con respecto al resto de la celularidad (Sperling et al., 2017). De acuerdo con el modelo de evolución Darwiniano, la aparición de mutaciones aleatorias en una célula inicial y la posterior selección de dichas variantes tumorales explicarían el desarrollo del cáncer.

Las mutaciones somáticas aparecen en las HSCs durante la replicación normal del ADN, pero son corregidas por los diferentes sistemas de reparación; sin embargo, algunas persisten tras los ciclos de autorenovación celular. El número de mutaciones se acumula durante décadas, de forma que, en tejidos autorenovables, se podría correlacionar directamente con la edad (Tomasetti et al., 2013). De forma aproximada, la HSC acumula $1,3 \pm 2$ mutaciones exónicas cada 10 años (Xie et al., 2014). En consonancia con esto, a los 60 años, una persona habrá acumulado un total aproximado de 8 mutaciones con potencial suficiente para alterar la secuencia de ADN que codifica para una determinada proteína.

Desde la última década, la aplicación de las nuevas tecnologías, incluyendo SNP-Array y la secuenciación de última generación (NGS), han permitido la identificación de mutaciones somáticas recurrentes en el SMD, donde una o más mutaciones se detectan en la mayoría de los casos (90%) (Pellagatti and Boulwood 2015).

A diferencia de las neoplasias mieloproliferativas, donde la mutación en uno de estos genes (*JAK2*, *CALR* y *MPL*) se detecta en más del 85% de los casos; en el SMD no existe ninguna mutación que sea dominante y específica de la enfermedad. Las mutaciones somáticas en estos genes no se limitan a las enfermedades mieloides, como la LMA *de novo* (*NMP1*, *CEBPA*, *WT1* y *FLT3*) o neoplasias mieloproliferativas (*JAK2*, *CALR* *MPL*), sino también han sido observadas en las neoplasias linfoides (Cazzola et al., 2013; Vainchenker et al., 2011). Por otro lado, tampoco existe un patrón mutacional definido en base a las diferentes entidades establecidas OMS, por ejemplo, Citopenia Refractaria con displasia Unilínea (CRDU), Citopenia Refractaria con Displasia Multilínea (CRDM) o SMD con delección aislada 5q. Contrariamente, un estudio reciente ha observado que los linfomas difusos de células B grandes (DLBCL), a pesar de ser una entidad fenotípica y genéticamente muy heterogénea, muestra un perfil de expresión génica característico en relación a los diferentes subgrupos (Schmitz et al., 2018). La identificación de mutaciones asociadas al SMD proporciona una información muy útil en aquellos casos donde la presentación clínica y la morfología son ambiguas.

Actualmente, se han identificado mutaciones somáticas en más de 40 genes (Papaemmanuil et al., 2013), validando su pronóstico independiente, y utilizando algunas de ellas como biomarcadores de respuesta clínica a tratamientos específicos. Por ejemplo, mutaciones en *TET2*, y quizás *DNMT3A*, se asocia con una mayor probabilidad de respuesta a la terapia con agentes hipometilantes; mientras que otras mutaciones (por ejemplo, *TP53*), se asocia con un elevado riesgo de recaída y una menor supervivencia tras un trasplante alogénico de MO (Béjar et al., 2014a; Béjar et al., 2014b; Traina et al., 2014).

Se considera que el desarrollo del SMD es un proceso gradual. Se ha detectado mutaciones somáticas en la práctica totalidad de las células tumorales, postulándose así que puedan constituir eventos primarios en el desarrollo de la enfermedad. Estas alteraciones primarias ocurrirían en las HSCs, originando un mayor grado de inestabilidad genética asociado a una mayor predisposición a la adquisición de mutaciones adicionales (secundarias), influyendo así en la progresión de la enfermedad.

Como se ha comentado anteriormente, no existe un patrón recurrente de evolución clonal asociado al SMD. Contrariamente, se sabe que el número de mutaciones somáticas detectadas en un paciente es inversamente proporcional a la SG y al tiempo libre de transformación a LMA (Papaemmanuil et al., 2013). Además, se han identificado mutaciones somáticas recurrentes en al menos 25 genes, asociadas con un pronóstico desfavorable independiente; siendo las más prevalentes *TET2* (21-90%), *ASXL1* (14-63%), *RUNX1* (9-38%), *TP53* (8-33%) y *EZH2* (7-28%) (Béjar et al., 2011, Béjar et al., 2014b).

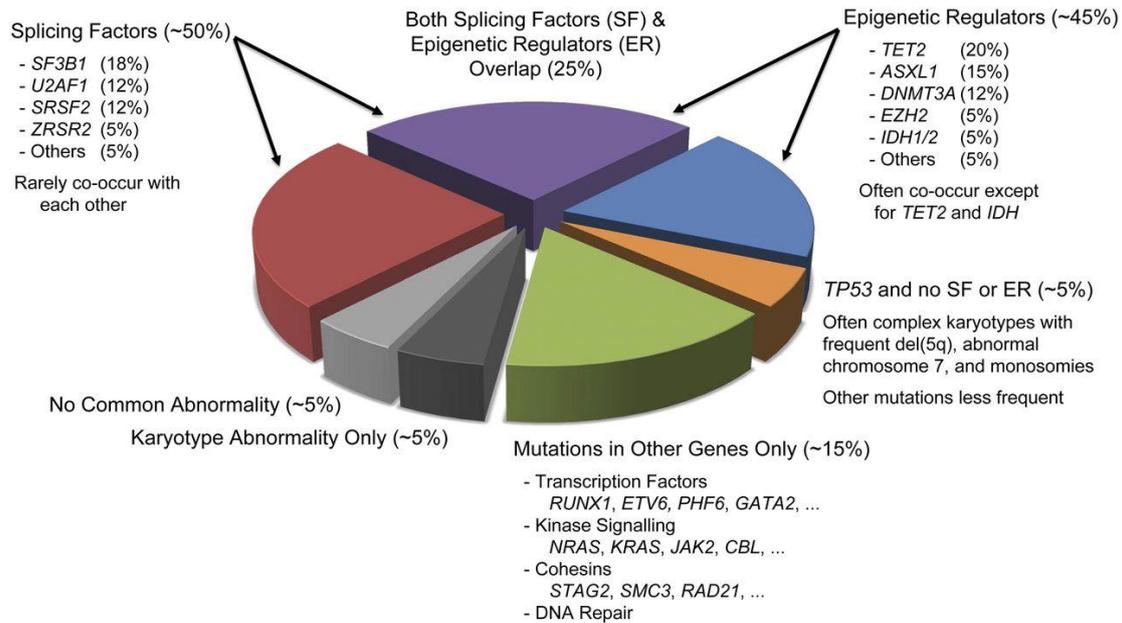


Figura 2. Distribución de las mutaciones somáticas recurrentes (según las diferentes categorías biológicas, y su frecuencia mutacional (%)) y de las alteraciones citogenéticas en el SMD. Aproximadamente, alrededor del 50% de los pacientes SMD presentan mutaciones en los factores del splicing, y un 45% en los factores de regulación epigenética; aproximadamente un 25% presentan mutaciones en ambos grupos. Los pacientes con mutación en *TP53* presentan menos mutaciones cooperantes; por el contrario, estos pacientes presentan una elevada tasa de alteraciones cromosómicas y cariotipos complejos (5%). Las mutaciones en otros genes pueden presentarse de forma cooperante con mutaciones que afectan a los genes del splicing y la regulación epigenética, aunque una fracción de los pacientes (15%) presenta mutaciones en ausencia de éstas. Por último, solamente un 10% de los pacientes con SMD no presentan mutaciones somáticas recurrentes (Béjar and Steensma 2014).

Los genes que aparecen mutados en el SMD se han clasificado en base a la proteína que codifican, definiéndose los siguientes grupos: i) mutaciones que afectan al “espliceosoma” o “*splicing* del ARN” (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2*), ii) mutaciones que afectan a la regulación epigenética (metilación del ADN (*TET2*, *DNMT3A*, *IDH1/2*) y modificación de histonas (*ASXL1*, *EZH2*), iii) mutaciones en diversos componentes de la cohesina (*STAG2*, *SMC3*, *RAD21*), iv) mutaciones asociadas a genes relacionados con la diferenciación celular (*RUNX1*, *NPM1*, *ETV6*, *GATA2*), v) mutaciones en genes supresores de tumores (*TP53*, *WT1*), y finalmente vi) mutaciones que están relacionadas con las vías de señalización celular (*RAS*, *CBL*) (Figura 2). A continuación, se detalla cada uno de los grupos:

1.6.3.1. Factores del splicing

Los genes que codifican para los componentes del espliceosoma aparecen mutados con elevada frecuencia en pacientes con SMD (60%). Éstos están implicados en el procesamiento del ARN mensajero (ARNm); durante la eliminación intrones del pre-ARNm y la posterior generación del ARNm maduro. Las mutaciones en estos genes son alteraciones *missense* en los denominados *hotspots*, originando cambios recurrentes en la secuencia aminoacídica. Esto origina patrones alterados del *splicing*, contribuyendo a pérdidas o ganancias de función, con repercusión en las diferentes funciones celulares.

Las mutaciones en estos genes se encuentran en heterocigosis y son mutuamente excluyentes, sugiriendo que la presencia de dos mutaciones es inviable para la célula o bien presentan un papel similar y redundante. Mutaciones en estos genes pueden alterar la capacidad de diferenciación celular, asociándose así con el fenotipo de displasia celular (Yoshida et al., 2011).

Dentro de los factores del *splicing*, las mutaciones más frecuentes corresponden al gen *SF3B1* (25%), relacionándose con la presencia de sideroblastos en anillo (80% de los casos) y pronóstico favorable (Malcovati et al., 2015; Papeemmanuil et al., 2011). La mutación *SF3B1* rara vez aparece de forma aislada, sino que generalmente se asocia con mutaciones en los genes *DNMT3A* o *TET2*. Sin embargo, la coexistencia con un evento epigenético no previene la formación de sideroblastos en anillo.

SRSF2 es el segundo gen más mutado dentro de este grupo (en torno al 15%). En el 85% de los casos, las mutaciones en *SRSF2* coexisten con otra mutación, principalmente en los genes *RUNX1*, *IDH2* y *ASXL1*, y se encuentra mutado de forma frecuente en los síndromes de solapamiento SMD/NMP (Kim et al., 2015). Por otra parte, las mutaciones en *U2AF1* han sido descritas en un 5-10% de los SMD, y no se han asociado a ningún fenotipo morfológico. En cuanto a su impacto pronóstico, los estudios son contradictorios (Graubert et al., 2011). Se ha observado que mutaciones en los genes *SRSF2* o *U2AF1* confieren un pronóstico desfavorable aún cuando se encuentran asociadas con el gen *SF3B1* (Malcovati et al., 2015).

La incidencia de mutaciones en el gen *ZRSR2* es muy baja (menos del 5%), asociándose con un elevado porcentaje de blastos (riesgo intermedio -1 y -2) y neutropenia. Otros genes implicados en la vía del procesamiento ARN son: Factor 8 del procesamiento del pre-ARNm (*PRPF8*), *U2AF2* y Factor 2 del *splicing* (*SF2*), entre otros; con frecuencias inferiores al 2% (Béjar and Steensma 2014).

1.6.3.2. Regulación epigenética

La metilación del ADN y las modificaciones post-traduccionales de las histonas constituyen dos importantes mecanismos de regulación epigenética. Los genes relacionados con estos procesos representan el segundo grupo de genes que aparece mutado con mayor frecuencia en el SMD. Los mecanismos implicados que conducen a una alteración en el patrón de metilación en el SMD son complejos; y varios estudios no han podido encontrar una asociación entre el grado de metilación y la expresión génica (Béjar and Steensma 2014).

➤ **Metilación ADN.** Las alteraciones en la vía de metilación del ADN son un hallazgo frecuente en pacientes con SMD. Diversos estudios confirman en MO de pacientes un patrón de metilación de los residuos de citosina en las islas CpG alterado. Los genes implicados en esta vía son *TET2*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*.

Las mutaciones en *DNMT3A* y *TET2* se encuentran aproximadamente en el 10-15% y 30% de los casos, respectivamente. Mutaciones *missense*, *nonsense*, *splice site* y *frameshift* han sido identificadas en *DNMT3A*, que codifica una ADN metiltransferasa (DNMT); y en *TET2*, el cual codifica una enzima que hidroxila los residuos de citosina metilada en el proceso de desmetilación del ADN (Bernard et al., 2009; Walter et al., 2011). Las mutaciones en *TET2* originan una hipermetilación de los residuos de citosinas de las secuencias *enhancer* provocando la represión de genes implicados en la diferenciación mieloide. Aunque *DNMT3A* y *TET2* son genes con actividades biológicas opuestas, aparecen co-mutados de forma frecuente en pacientes con SMD.

La actividad de *TET2* se ve también afectada por alteraciones en los genes que codifican para la enzima “Isocitrato Deshidrogenasa” (*IDH1* e *IDH2*), originando un oncometabolito (2-hydroxiglutarato) que inhibe la actividad, entre otros, de *TET2*. Las mutaciones en los genes *IDH1* e *IDH2* han sido descritas en el 5-10% de los pacientes con SMD, se presentan en heterocigosis y son mutuamente excluyentes (Ward et al., 2010).

➤ **Modificación de histonas.** Los genes que codifican las enzimas que se encargan de la modificación de las histonas aparecen frecuentemente alterados en el SMD. La modificación covalente de las colas de las histonas induce cambios en la estructura de la cromatina y altera la unión de diversos factores reguladores. PRC1 y PRC2 son dos complejos represores de la transcripción implicados en la diferenciación celular, a través de la modificación de las histonas y la compactación de la cromatina. *EZH2* codifica la subunidad catalítica PRC2 y aparece mutado en el 5-10% de los casos. Este gen es responsable de la metilación de histonas, y aunque se ha descrito una ganancia de función en algunos tipos de linfomas, en el SMD prevalece una pérdida de función. *EZH2* mutado se ha asociado con un pronóstico desfavorable y un mayor riesgo de progresión leucémica. *BCOR* y *BCORL1* son dos genes que codifican el complejo PRC1 (conocido como PRC1.1), y aparecen mutados en el 5% de los pacientes, asociándose con pronóstico desfavorable (Cao et al., 2002; Wang et al., 2004).

La frecuencia de mutaciones en el gen *ASXL1* es superior (20% de los casos). Las mutaciones patogénicas en *ASXL1* afectan a los exones 11 y 12, originando una proteína truncada que aumenta la ubiquitinación llevada a cabo por la proteína 1 asociada a BRCA1 (BAP1), asociándose con una disminución de la metilación llevada a cabo por PRC2 (Balasubramani et al., 2015). Las mutaciones en estos genes conducen a una alteración de la hematopoyesis, incluyendo los genes *Hox*; relacionándose con la presencia de citopenia y displasia.

1.6.3.3. Factores de la cohesina

Las cohesinas (STAG1, STAG2, SMC3, SMC1A, y RAD21) forman una estructura multiproteica que rodea al ADN y que ayuda a mantener la unión entre cromátidas hermanas, y facilita la recombinación homóloga durante el proceso de reparación del ADN. Las mutaciones en estos genes ocurren aproximadamente en el 15% de los casos de SMD y han sido asociadas con pérdida de función. A pesar del papel que desempeñan las cohesinas en la unión de cromátidas hermanas, no se ha descrito asociación entre la presencia de mutaciones en estos genes y fenómenos de aneuploidías o aberraciones cromosómicas (Thota et al., 2014).

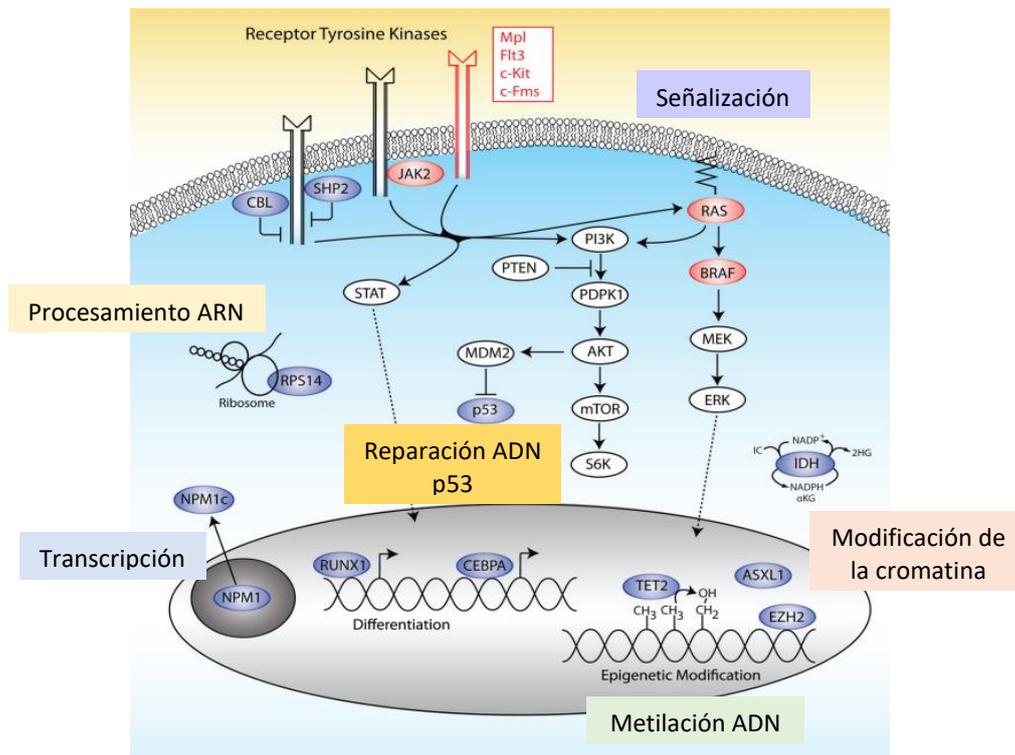


Figura 3. Vías celulares funcionales y genes implicados en el SMD. Las mutaciones activadoras se muestran en rojo, mientras que mutaciones o deleciones en genes que implican una pérdida de función se muestran en azul. Mutaciones en los genes *CBL*, *ASXL1*, *NPM1c*, *IDH1/IDH2*, *TP53*, y *RUNX1* pueden también causar una ganancia de función (adaptado de Béjar et al., 2011).

1.6.3.4. Factores de transcripción

Un pequeño número de factores de transcripción hematopoyéticos se encuentran alterados de forma recurrente en el SMD, tales como *RUNX1*, *GATA2* y *ETV6*. En estos genes se han descrito mutaciones con pérdida de función presentes en la línea germinal que se han asociado a fallo medular, y a un mayor riesgo de progresión leucémica. *RUNX1* es la subunidad de unión al ADN del *core binding factor* (CBF), que regula genes relacionados con los procesos de diferenciación mieloide. Además de las mutaciones germinales, las mutaciones somáticas en este gen se encuentran en el 10% de los casos de SMD, relacionándose con trombocitopenia grave (Owen et al., 2008). *GATA2* codifica un factor de transcripción de dedo de zinc altamente expresado en las HSCs, esencial para el correcto desarrollo de la hematopoyesis. Al igual que *RUNX1*, las mutaciones presentes en *GATA2* pueden ser germinales o somáticas, pero en *GATA2*, las mutaciones somáticas se encuentran presentes en el 1-2% de los pacientes. Las mutaciones somáticas en el *ETV6* parecen estar asociadas con mal pronóstico y con presencia de alteraciones en el cromosoma 7. Por último, otros factores de transcripción aparecen también alterados en el SMD, pero con frecuencias inferiores. Por ejemplo, la frecuencia de mutación en *WT1* en el SMD es inferior al 5% (Haferlach et al., 2014).

1.6.3.5. TP53

TP53 es el gen supresor de tumores que aparece alterado de forma recurrente en una amplia variedad de tumores, incluido el SMD. En condiciones de estrés celular, p53 aumenta la expresión de genes implicados en los procesos de apoptosis y parada del ciclo celular. En pacientes con síndrome de Li-Fraumeni, se ha observado un riesgo aumentado al desarrollo de otros tipos de cánceres, incluidos el SMD y LMA (Rücker et al., 2012).

Las mutaciones somáticas en *TP53* se encuentran en un 5-10% de los SMD y se asocian estrechamente con bajos niveles de plaquetas, un elevado recuento de blastos, cariotipos complejos y disgranulopoyesis (Lai et al., 1995); y más de un 30% de los casos están relacionados con la exposición previa a quimioterapia en neoplasias mieloides. En muchos casos, la delección de uno de los alelos, incluidos los casos con del(17p), coexiste con una mutación inactivadora en el otro alelo. La pérdida de *TP53* confiere un pronóstico desfavorable, aumentando el riesgo de transformación leucémica y el riesgo de recaída postrasplante. Curiosamente, la presencia de cariotipos complejos en ausencia de mutaciones en *TP53* confiere un pronóstico similar tras un Trasplante de Precusores Hematopoyéticos (TPH), que aquellos pacientes que presentan un cariotipo normal (Béjar et al., 2011).

1.6.3.6. Señalización celular

Las mutaciones en los componentes de la vía de señalización se asocian con estados proliferativos y se han observado en una amplia variedad de neoplasias mieloides, incluidas LMA (*FLT3*), policitemia vera (*JAK2*), trombocitemia esencial (*JAK2* y el gen que codifica el receptor de trombopoyetina, *MPL*), Leucemia Mielomonocítica Crónica (*CBL*) y neoplasias de células cebadas (mastocitosis) (*KIT*). Las mutaciones en estos genes ocurren con una frecuencia relativamente baja en el SMD (5-10%) en comparación con LMA, LMMC o neoplasias mieloproliferativas (Béjar et al., 2011).

La mayoría de estas mutaciones en el SMD conllevan a la activación de la vía de las MAP quinasas (Mitogen-Activated Protein Kinases, MAPK); así como de otras vías de señalización. Las mutaciones en la vía MAPK (*NRAS*, *KRAS*, *NF1*) y la tirosina fosfatasa son las más comunes, representando el 10% de los casos, y constituyen eventos tardíos.

Son mutaciones subclonales y se relacionan a menudo con la transición a LMA. La mayoría son mutaciones *missense* o implican pequeñas inserciones o delecciones que conducen a la activación constitutiva (Takahashi et al., 2013). Una excepción es el gen *CBL*, que codifica una tirosina quinasa asociada a una ubiquitina ligasa. En pacientes con SMD, las mutaciones en dicho gen conllevan al aumento de proteínas de señalización, tales como *FLT3* y *MPL* (Béjar et al., 2011).

Actualmente, el diagnóstico de SMD no incorpora las mutaciones somáticas, sino que se basa en los criterios morfológicos en MO, las anomalías citogenéticas y citopenias en SP. Por el contrario, dado que aún no se ha identificado la totalidad de mutaciones involucradas en la fisiopatología del SMD, la ausencia de mutaciones somáticas conocidas tampoco excluye el diagnóstico de la enfermedad.

1.6.4. ARQUITECTURA CLONAL DEL SMD

El desarrollo del SMD es un proceso gradual. Se considera que la transformación maligna en pacientes con SMD va asociada a un acúmulo secuencial de lesiones genéticas en la HSC tumoral cuya progenie tiene características clonales asociadas a rasgos displásicos y una función alterada, debido en parte a alteraciones madurativas (Flach et al., 2011) y donde los distintos subclones de células tumorales coexistentes desplazan progresivamente la hematopoyesis normal. El acúmulo de lesiones genéticas secundarias, junto con los procesos de apoptosis intramedular, acaban por traducirse en una hematopoyesis ineficaz, asociada a hiper celularidad medular y citopenias periféricas de grado variable (Malcovati et al., 2013).

Se ha definido una nueva entidad denominada hematopoyesis clonal con potencial indeterminado (CHIP). Los pacientes que presentan CHIP no cumplen los criterios diagnósticos de SMD, aunque sus células hematopoyéticas presentan mutaciones puntuales asociadas a la enfermedad; con una Frecuencia Alélica de la Variante (*Variant Allele Frequency*, VAFs) de al menos, el 2% en SP (Steensma et al., 2015). Las mutaciones que se observan de forma recurrente en CHIP afectan a los genes *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, *TP53*, *JAK2* y *SF3B1*; siendo los más comúnmente mutados *DNMT3A* y *TET2*, ambos encargados de la regulación epigenética. Por otro lado, las mutaciones menos frecuentes en CHIP afectan a los factores del *splicing* (Jaiswal et al., 2014).

Estas mutaciones pueden también observarse en una fracción de pacientes que presentan displasia moderada y/o citopenias idiopáticas de significado incierto, pudiendo contribuir hacia la transición a SMD, cuyo diagnóstico positivo se basa en los criterios morfológicos de la OMS, la evolución clínica del paciente y la presencia de VAFs superiores al 10% (Steensma et al., 2015).

La hematopoyesis clonal preclínica parece indicar una mayor predisposición al desarrollo de una neoplasia hematológica. Aproximadamente, el 10% de las personas mayores de 70 años y más del 20% de las personas mayores de 90 años, presentan mutaciones clonales en genes asociados a neoplasias mieloides, como *DNMT3A*, *TET2* y *SF3B1*; presentando una probabilidad del 0,5% al 1% por año en adquirir mutaciones adicionales que conduzcan al desarrollo del SMD (Steensma et al., 2015).

En este modelo de evolución y expansión clonal propuesto en el SMD, la transición desde CHIP hacia SMD y posterior transformación leucémica, conlleva la adquisición de mutaciones adicionales y/o cambios epigenéticos (Flach et al., 2011). Se ha observado que el evento iniciador está mayoritariamente relacionado con los procesos epigenéticos, afectando a genes relacionados con la metilación del ADN, como (*TET2* o *DNMT3A*); genes relacionados con la remodelación de la cromatina (*ASXL1* o *EZH2*); y genes implicados en el *splicing* del ARN, como *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1* o *ZRSR2*; promoviendo la capacidad de autorenovación de la HSCs (Delhommeau et al., 2009; Gelsi-Boyer et al., 2009; Yoshida et al., 2011). Como consecuencia, los eventos iniciadores alteran la diferenciación celular sin llegar a producir un bloqueo total de ésta hasta el final del mismo.

Por el contrario, durante la progresión hacia LMA ocurren con mayor frecuencia mutaciones en genes que afectan las vías de diferenciación y proliferación celular (*RUNX1*, *GATA2*, *BCOR*, *N/K-RAS*, *CBL*) o cohesinas (*STAG2*, *RAD21*), inhibiendo totalmente el proceso de diferenciación celular (Takahashi et al., 2013; Damm et al., 2013; Mazumdar et al., 2015). La presencia subclonal de mutaciones activadoras en vías de señalización celular, como *FLT3* y *N-RAS* en pacientes de SMD de bajo riesgo, han sido asociadas con la transformación leucémica (**Figura 4**) (Takahashi et al., 2013).

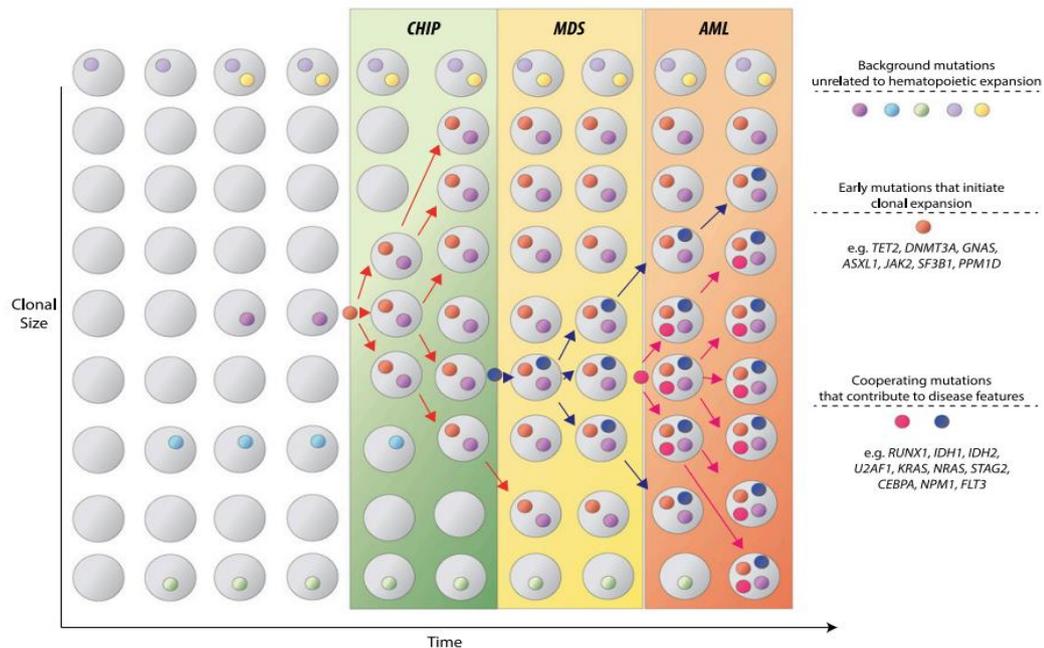


Figura 4. Expansión clonal en el SMD. En las primeras etapas, una o más HSC del individuo adquirirían mutaciones somáticas que podrían predisponer al desarrollo del SMD; estas primeras alteraciones no tienen por qué proporcionar una ventaja proliferativa a la HSC alterada. En una etapa posterior, dichas HSCs y su progenie, podrían adquirir nuevas mutaciones conductoras (del inglés, “driver”) que favorecerían su proliferación y/o mayor supervivencia respecto al resto de HSC no mutadas. Cuando esto ocurre, se produciría un acúmulo de células tumorales que progresivamente irían reemplazando la hematopoyesis normal (fase de expansión o crecimiento tumoral). Finalmente, la adquisición de nuevas mutaciones favorecería la expansión clonal y progresión de la enfermedad (Takahashi et al., 2013).

La LMA es una entidad distinta a la LMA *de novo*, caracterizada por una respuesta menos eficiente tras terapia de inducción, una mayor tasa de recaída y peor pronóstico. Evidencias biológicas reflejan su evolución a partir del SMD. Se ha demostrado que mutaciones en los genes *SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *ASXL1*, *EZH2*, *BCOR* y *STAG2*, están fuertemente asociadas al SMD y, por lo tanto, definen a un grupo de pacientes que se comportan clínicamente como LMAs incluso en ausencia de displasias o citopenias preexistentes (Sperling et al., 2017).

Por el contrario, mutaciones en los genes *NPM1*, *MLL1/KTM2A* (localizado en el cromosoma 11q23) o reordenamientos cromosómicos que afectan al CBF, se restringen principalmente a la LMA *de novo*, siendo poco comunes en el SMD.

El resto de mutaciones, como por ejemplo las que afectan al gen *DNMT3A*, mutaciones o duplicaciones internas en tándem en *FLT3*, entre otros; no son exclusivas y son compartidas por ambas entidades (**Figura 5**) (Sperling et al., 2017). La presencia mutaciones en el gen *TP53* en la LMA se considera por sí sola una categoría independiente, caracterizada por la mínima presencia y/o ausencia de mutaciones cooperantes y una elevada frecuencia de cariotipos complejos (Béjar et al., 2011).

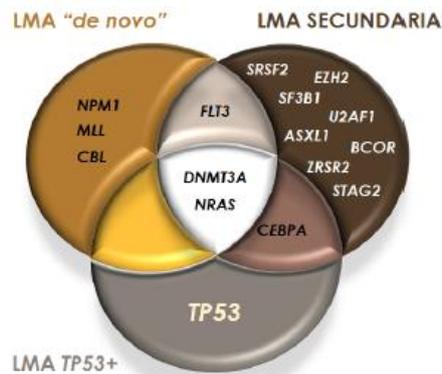


Figura 5. Perfiles genéticos en la LMA definidos por el tipo de mutaciones somáticas subyacentes.

El orden de aparición de la mutación puede contribuir a la presentación fenotípica de la enfermedad, como se ha observado en neoplasias mieloproliferativas, donde la mutación iniciadora puede afectar a los genes *TET2* o *JAK2*. Si el primer evento mutacional ocurre a nivel de *TET2*, los pacientes presentan un mayor número de progenitores mieloides en MO; mientras que, si la mutación iniciadora ocurre en *JAK2*, presentan un elevado número de progenitores megacariocíticos y eritroides, con mayor riesgo de trombosis (Ortmann et al., 2015). En el SMD, la influencia del orden mutacional en el fenotipo del paciente está menos clara. Sin embargo, en ratones inmunodeficientes se ha observado que cuando coexisten dos mutaciones clonales (afectando aproximadamente al 50% de la celularidad en MO), el clon que dirige la enfermedad es aquel que presenta los eventos más tempranos.

Por otro lado, el tipo de mutación puede influir en el fenotipo del SMD, donde algunas mutaciones han sido asociadas con presentaciones clínicas específicas. La mutación en *SF3B1* está fuertemente asociada con la presencia de sideroblastos en anillo, existiendo una estrecha correlación entre la VAF de dicho gen y la frecuencia de sideroblastos en anillo (Cazzola et al., 2013). Por otra parte, mutaciones en el gen *ATRX* se asocian con la α -talasemia adquirida (Steensma et al., 2004), *RUNX1* con trombocitopenia (Papaemmanuil., 2013) y *TP53* con la presencia de cariotipos complejos y disgranulopoyesis (Lai et al., 1995).

1.6.5. PAPEL DE LA RESPUESTA INMUNITARIA EN LA FISIOPATOLOGÍA DEL SMD

1.6.5.1. MICROAMBIENTE MEDULAR

El nicho medular está constituido por diferentes tipos de células estromales, tales como mesenquimales estromales (*Mesenchymal stromal cells*, MSCs), células endoteliales, macrófagos, adipocitos, fibroblastos, osteoclastos, condrocitos, entre otros; junto con elementos de la matriz extracelular como fibronectina. Las células estromales están implicadas en la regulación de la hematopoyesis gracias a la secreción de diversas citoquinas, manteniendo así la capacidad de auto-renovación y diferenciación de la HSC (Morrison et al., 2008).

En el SMD, diversos estudios muestran una expresión alterada de al menos 30 citoquinas tanto en el microambiente medular como en SP (Kornblau et al., 2010). Se ha observado un aumento en los niveles de TNF- α , IFN- γ , factor de crecimiento transformante β (TGF- β) e IL-6 en pacientes con SMD. Además, otras citoquinas producidas por el microambiente medular, como la IL-1 β , SCF (*Stem Cell Factor*) e IL-32, se han visto también significativamente aumentadas en estos pacientes, contribuyendo así a un ambiente proinflamatorio. El TNF- α actúa como un factor pronóstico adverso, ya que niveles elevados en suero se han relacionado con un aumento en el número de leucocitos, β 2-microglobulina (β 2m) y creatinina; y con bajos niveles de hemoglobina (Tsimberidou et al., 2008).

El SMD de bajo riesgo se caracteriza por un aumento marcado de la apoptosis de precursores hematopoyéticos en MO, originando grados variables de citopenia(s), mientras que, en pacientes con alto riesgo de progresión, prevalecen mecanismos de proliferación clonal e inmunoevasión, permitiendo a las células tumorales evolucionar a LMA (Acquaviva et al., 2010).

De acuerdo con esto, el SMD de bajo riesgo se caracteriza por un aumento de citoquinas pro-inflamatorias/pro-apoptóticas a nivel de fibroblastos y macrófagos medulares (TNF- α , IL-6 e interferón- γ (INF- γ)), contribuyendo a una desregulación del microambiente medular y a la apoptosis de los precursores mieloides. La apoptosis intramedular a través del receptor de muerte Fas y de su ligando específico (Fas-L) es una de las principales causas de citopenia en SMD (Deeg et al., 2000). Bajo condiciones fisiológicas, los progenitores CD34⁺ no expresan Fas, pero la expresión aumenta tras la exposición a diversas citoquinas como TNF- α o IFN- γ (Zeng et al., 2006). La sobreexpresión del receptor FAS en células progenitoras CD34⁺ explica la respuesta *in vitro* e *in vivo* frente a agentes anti-TNF- α como infliximab o agentes inmunomoduladores (IMiDs) como Talidomida y Lenalidomida (Baron et al., 2012). La IL-17, junto con otras citoquinas inflamatorias, ha sido también relacionada con altos niveles de apoptosis medular (Kordasti et al., 2009).

En condiciones normales, las MSCs son las principales responsables en el mantenimiento de la hematopoyesis normal en MO, ejerciendo una actividad inmunosupresora paracrina. En el SMD de bajo riesgo, se ha observado una menor capacidad para inhibir la activación de células T, y la diferenciación y maduración de células dendríticas (DCs) (Wang et al., 2013). Una publicación reciente muestra que las HSCs de pacientes con SMD presentan la habilidad de reprogramar las MSCs, induciendo cambios en su expresión génica, permitiendo sobre las células CD34⁺ *in vivo*, un aumento de la renovación celular y bloqueo de la diferenciación mieloide.

Por el contrario, el perfil de citoquinas presentes en el SMD de alto riesgo difiere del anterior, donde prevalecen citoquinas con actividad inmunosupresora, como la IL-10 (Kordasti et al., 2009). Además, este estado se caracteriza por la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas, tales como el Factor Nuclear κ B (NF- κ B) y la familia de proteínas Bcl-2, correlacionándose así con la progresión de la clona maligna (Braun et al., 2006). Además, los factores solubles angiogénicos, tales como el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos, se encuentran aumentados en el alto riesgo; junto con un aumento de la vascularización y densidad medular (Aguayo et al., 2000).

Así mismo, las MSCs en este grupo de pacientes se caracterizan por un aumento en los niveles de expresión de TGF- β , propiedades inmunosupresoras y una mayor capacidad para inducir células Treg. Se ha observado que la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) es secretada por MSCs, la cual detiene a las células T en la fase G1 del ciclo celular (Wang et al., 2013).

1.6.5.2. CÉLULAS DE LA RESPUESTA INMUNITARIA INNATA Y ADAPTATIVA.

1.6.5.2.1. SMD BAJO RIESGO vs. ALTO RIESGO SEGÚN IPSS

Diversos estudios clínicos e inmunológicos sugieren una desregulación inmunitaria en la fisiopatología del SMD (Wang et al., 2018). Paradójicamente, en contraposición al papel que ejerce en la inmunovigilancia tumoral, su interacción aumenta el crecimiento tumoral, promoviendo así la progresión de la enfermedad.

Generalmente, aunque los pacientes con SMD presentan linfopenias, la inmunidad celular se encuentra aumentada en aquellos de Bajo Riesgo en comparación con los de Alto Riesgo de transformación leucémica. Los pacientes de bajo riesgo presentan un aumento de CTLs, células Th17 y células NK, junto con una disminución de linfocitos Treg (Kordasti et al., 2009). Además, se ha observado que existe una relación inversa entre las células Th17 y las células Treg, sugiriendo que la ratio Th17/Treg puede ser usada para la elección de pacientes candidatos a IST, a base de agentes como la CsA o ATG. La expansión de las células T CD8⁺ ha sido observada principalmente en pacientes de SMD con trisomía 8. Un estudio reciente ha identificado la proteína del tumor de Wilms como epítipo potencial para las células T autólogas, lo que explica la elevada respuesta frente a IST (Sloand et al., 2011).

En general, la(s) citopenia(s) observadas en el SMD de bajo riesgo debida al alto grado de apoptosis intramedular, es causada no sólo por la muerte de las células displásicas, sino también por el resto de células precursoras en MO, ya que son diana de linfocitos-T específicos que reconocen autoantígenos expresados en ambos tipos celulares. Es probable que los antígenos asociados a displasia liberados debido a la muerte celular puedan ser presentados por las células presentadoras de antígenos (CPAs) originando así una respuesta inmunitaria adaptativa (Baumann et al., 2002).

Varios estudios demuestran que las células T CD3⁺ *naive* de pacientes con SMD presentan un acortamiento de los telómeros y consecuentemente, menor potencial proliferativo (Yang et al., 2013). Se ha observado que más del 90% de pacientes albergan CTLs clonales u oligoclonales en MO y SP, y que la mayoría derivan del clon maligno (Vercauteren et al., 2012), proponiendo que la mielosupresión observada podría deberse a un proceso autoinmune. La terapia con IST utilizada en pacientes de bajo riesgo altera la funcionalidad de las células T, lo que podría contribuir a la progresión de la enfermedad. Contrariamente a dicha idea, diversos ensayos clínicos han demostrado un riesgo similar de progresión leucémica (Sloand et al., 2008).

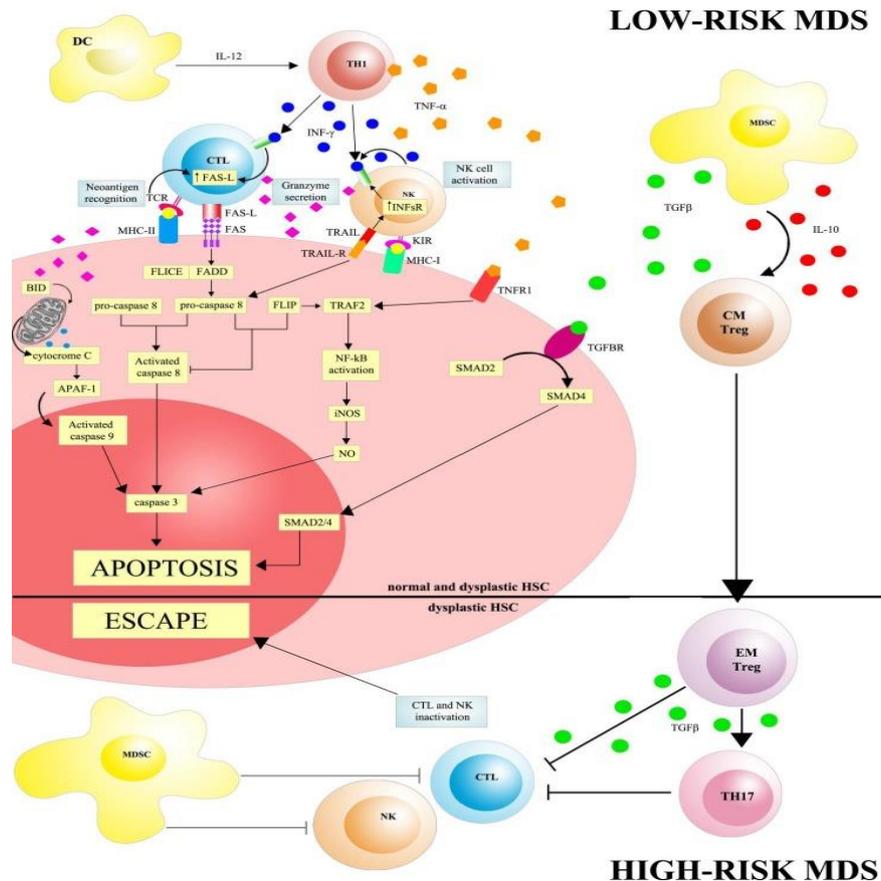


Figura 6. Citoquinas, Vías de Señalización celular y células del sistema inmunitario del microambiente medular en el SMD de Alto y Bajo Riesgo según score IPSS (Serio et al., 2014).

Por otro lado, los SMD de alto riesgo se caracterizan por una respuesta inmunitaria celular deficiente, promoviendo así la proliferación y expansión del clon displásico. Por lo general, presentan una disminución de células T CD8⁺ y células Th17, junto con un aumento de células NK no funcionales y células Treg (Epling-Burnette et al., 2007a; Kordasti et al., 2009). Además, la secreción de citocinas proinflamatorias en el microambiente medular, tales como TNF- α e INF- γ , induce la expresión del receptor de muerte programada (PD-1) sobre las células T y su ligando (PD-L1) sobre las células CD34⁺ (Yang et al., 2014).

La vía inhibitoria PD-1/PD-L1 ha sido también sugerida por otros autores como un factor determinante de la inmunoevasión. Se ha observado que células progenitoras CD34⁺ en este grupo de pacientes presentan un aumento en la expresión de ligandos PD-L1. Los niveles de expresión de PD-L1/PD-1 en los SMD se ve reforzada por el tratamiento con agentes hipometilantes, por lo que dicha desregulación se asocia con una resistencia a la terapia y con un pronóstico desfavorable (Yang et al., 2014).

La disminución en la citotoxicidad de las células NK fue inicialmente notificada en los síndromes preleucémicos. En estos primeros estudios, no se encontró ninguna asociación entre la disminución de dicha toxicidad y el número absoluto de células NK en MO o SP. Sin embargo, posteriormente, en 1984, *Kerndrup* y col. observaron en pacientes con SMD, que los defectos en la citotoxicidad se relacionaban con el descenso en el número de células NK circulantes (Kerndrup et al., 1984). Más adelante, en 1994, *Yokose* y col. observaron que la disminución de células NK en el SMD de alto riesgo se asociaba con un aumento en los niveles plasmáticos del receptor soluble de la IL-2, el cual se ha postulado que es producido por las células neoplásicas en la MO afectando así al crecimiento de las células NK estimulado por IL-2 (Yokose et al., 1994).

En el SMD de alto riesgo, se ha observado una disminución en la expresión de receptores activadores en células NK junto con una disminución de su actividad citolítica; sin embargo, actualmente, no está bien definido. Inicialmente, algunos estudios observaron una disminución de la citotoxicidad y un aumento de la apoptosis de células NK periféricas, sin cambios en la expresión de receptores inhibidores o estimuladores (Kiladjian et al., 2006). Contrariamente a esto, *Epling-Burnette* y col. atribuyeron el descenso de la toxicidad NK con una disminución en la frecuencia de receptores NKG2D sobre células NK en SP (Epling-Burnette et al., 2007a). Además, en dicho estudio se observó que las concentraciones de MICA soluble en suero (sMICA) y que la expresión de la cadena CD3 ζ fueron normales (Epling-Burnette et al., 2007a). Por otro lado, estudios recientes muestran en pacientes con SMD una elevada frecuencia de células NK con fenotipo CD56^{Bright} y un repertorio de receptores KIR (*Killer Immunoglobuline-like receptors*) desplazado hacia la expresión del receptor KIR2DL3; expresado en estadios más tempranos durante la adquisición secuencial del repertorio KIR (Hejazi et al., 2015).

1.6.5.2.2. SMD HIPOPLÁSICO vs. HIPERPLÁSICO

En relación al entorno leucocitario y a la celularidad medular en pacientes con SMD, se ha observado que los pacientes con SMD-h presentan neutropenias y trombocitopenias más severas, menor porcentaje de blastos y menor frecuencia de cariotipos alterados; en comparación con aquellos que presentan una MO normocelular o hipercelular.

En el SMD, la presencia de un clon HPN se restringe, mayoritariamente, a los subgrupos de bajo riesgo. En estos pacientes, la displasia morfológica es menos dramática, la presencia de cariotipo alterado es menos común y la progresión a leucemia aguda es menos frecuente (De Souza et al., 2014). Sin embargo, la presencia de un clon de HPN no se restringe a h-SMD.

En el SMD-h, los hallazgos compatibles con un proceso inmunitario (linfocitosis relativa en MO, expansión oligoclonal de células T y aumento de los niveles de citoquinas), no contribuyen al diagnóstico diferencial, ya que, por ejemplo, estos elementos son compartidos con la AA. Actualmente, aunque se sugiere la implicación del sistema inmunitario, no existen estudios a nivel del microambiente medular que discriminen si existen diferencias significativas entre el SMD-h y el SMD-NH en relación a dicha composición leucocitaria (Serio et al., 2014).

1.7. TRATAMIENTO DEL SÍNDROME MIELODISPLÁSICO

1.7.1. ESTRATEGIAS DE TRATAMIENTO CONVENCIONALES

Investigadores del International Working Group of MDS definieron los criterios para determinar las diferentes opciones de tratamiento en los SMD. La elección de la terapia varía en función de cada paciente, e influyen diversos factores tales como la edad, estado clínico, complicaciones médicas y la severidad de la enfermedad. La identificación de diversos mecanismos implicados en la patogénesis de la enfermedad (alteraciones moleculares, genéticas y epigenéticas; y la implicación de una respuesta inmunitaria), han llevado al desarrollo de diversas terapias; aunque actualmente no existe ningún tratamiento con impacto verdadero en la supervivencia.

A continuación, se lleva a cabo una breve descripción de las terapias de soporte dirigidas a los pacientes con SMD de Bajo riesgo, que no modifican la historia natural de la enfermedad; y de terapias modificadoras de curso clínico, pero no curativas, como agentes hipometilantes o Lenalidomida. Por otro lado, el trasplante alogénico de MO es único tratamiento curativo en el SMD, pero debido a que los pacientes en los que debuta la enfermedad son de edades avanzadas, la mayoría de ellos no son candidatos debido a que son terapias muy intensivas; por lo que, en estos casos, el único tratamiento terapéutico es el mantenimiento de la enfermedad.

- El tratamiento de soporte continúa siendo el empleado para ayudar a mejorar los síntomas y signos provocados por las citopenias. Consiste en transfusiones de sangre en combinación con antibióticos y factores de crecimiento hematopoyéticos, como la eritropoyetina (Epo). El uso profiláctico de otros agentes, como factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), o agonistas de trombopoyetina, no son recomendados, salvo en casos muy seleccionados. El Trombopag, un estimulante de la producción de plaquetas, ha mostrado en ensayos fase 2, un aumento en el riesgo de transformación leucémica, y en combinación con agentes hipometilantes, inferioridad respecto a agentes hipometilantes aislados. Su uso está indicado solo en el SMD de Bajo riesgo y fundamentalmente, variante hipoplásica (Dickinson et al., 2018). El Luspatercept es el primer agente anti TGF- β que ha mostrado su eficacia en el SMD de Bajo riesgo en ensayos clínicos, con capacidad de estimular la eritropoyesis. Por otro lado, el Imetelstat es un agente inhibidor de telomerasas que actúa en el SMD de Bajo riesgo tras fallo a agentes estimulantes de eritropoyesis.

- Los agentes Hipometilantes son el estándar terapéutico en el SMD de Alto riesgo, en pacientes no candidatos a TPH.

En el SMD, las islas CpG de las regiones promotoras de diversos genes a menudo se encuentran hipermetiladas y, por lo tanto, silenciadas epigenéticamente. La capacidad de los agentes hipometilantes (HMA) para revertir la hipermetilación es un enfoque terapéutico para restaurar la expresión génica. La 5-azacitidina (5-AZA) y su derivado 5-aza-2'-desoxicitidina (decitabina) son dos fármacos hipometilantes que presentan actividad anti-neoplásica, utilizados en pacientes con SMD. Ambos fármacos inhiben las DNMT, originando una hipometilación global del ADN. Se ha observado que el tratamiento con 5-AZA induce la re-expresión de genes anteriormente silenciados asociados con los procesos de crecimiento, diferenciación y apoptosis celular. Además, la desmetilación de diversos genes relacionados con la respuesta inmunitaria han sido también implicados.

Se ha demostrado que los HMA mejoran las funciones efectoras de células T mediadas por citocinas y la lisis tumoral (Zhang et al., 2017). Sin embargo, el tratamiento con 5-AZA produce un aumento de células Tregs gracias a la sobreexpresión del factor de transcripción FoxP3 (desmetilación de promotor FoxP3). Así mismo, se ha observado un aumento en la expresión de receptores KIR sobre las células NK, al mismo tiempo que origina una disminución en la expresión del receptor activador NKG2D; aunque sus efectos funcionales sobre la citotoxicidad no se han establecido firmemente (Sohlberg et al., 2015). Además, se ha observado que la 5-AZA aumenta la expresión de los genes PD-1, PD-L1, PD-L2 y CTLA-4, relacionándose así con la resistencia al fármaco en algunos pacientes (Yang et al., 2014).

- La única indicación actualmente aprobada por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) en el uso de la Lenalidomida es en el SMD del(5q) como anomalía aislada en pacientes con dependencia transfusional. La lenalidomida es un IMiD que inhibe la angiogénesis y acelera la apoptosis del clon neoplásico. También se ha descrito que presenta funciones inmunomoduladoras en células NK, monocitos y células dendríticas y células T. Los efectos inmunomoduladores son complejos. Por una parte, inhibe la producción de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) y células Treg; sin embargo, estimula la producción de citoquinas asociadas a Th1, INF- γ , y asociadas a Th2, IL-10 (Fozza and Longinotti 2012). Además, estudios recientes han sugerido que induce la ubiquitinación y la degradación de la caseína quinasa 1A1 (CK1 α), una serina/treonina quinasa cuyo gen está ubicado en la región cromosómica 5q. La degradación de CK1 α induce apoptosis celular a través de la activación de p53, por lo que la expresión haploinsuficiente del gen en el SMD del(5q) sensibiliza a sus células a la acción de lenalidomida, lo que explica su eficacia (Krönke et al., 2015).

- Los inhibidores de puntos de control de la respuesta inmunológica (*immune checkpoints*), serían una buena estrategia terapéutica en pacientes con SMD, tal y como ha sido observado en los tumores sólidos. La inhibición combinada de las principales vías co-inhibitorias con ab anti-CTLA-4 (Ipilimumab), anti-PD-L1 (Pembrolizumab) y anti-PD-1 (Nivolumax), está siendo investigada en pacientes con SMD. También existen ensayos clínicos en fase II, en combinación con agentes Hipometilantes, en pacientes con SMD no respondedores a dicho tratamiento, en los que se postula que dicha terapia combinada podría restaurar el microambiente medular.

- Muchas citoquinas (TNF- α , INF- γ , TGF- β e IL-6, entre otras) presentan un papel clave en la regulación de la hematopoyesis. Se ha observado que su desregulación contribuye al desarrollo del SMD; por lo que la terapia anti-citoquina o anti-apoptótica podrían ser empleadas como posibles dianas terapéuticas.

Actualmente, no existen evidencias clínicas sobre estos agentes y no están aprobados en el tratamiento del SMD; sin embargo, se pueden encontrar en fase de investigación. Un estudio reciente observó que el cA2, un AcMo quimérico anti-TNF- α , redujo los niveles de TNF- α y mejoró significativamente la hematopoyesis (Boula et al., 2006). El Infliximab es otro AcMo anti-TNF- α con el que se ha obtenido también resultados muy satisfactorios. En ausencia de TNF- α , las células T *naïve* CD4⁺ pueden diferenciarse bajo la influencia de TGF- β en células Treg en vez de en células Th17. La disminución de células Treg observadas en el SMD puede contribuir al fenómeno de apoptosis. En esta línea, la terapia celular basada en la transferencia adoptiva de células Treg activadas *ex vivo* es una estrategia para tratar las características autoinmunes de la enfermedad. Por último, el Daclizumab (Ab Anti-IL-2) ha mostrado una disminución de las citopenias en pacientes con SMD, al inhibir la expansión clonal de los linfocitos T.

Actualmente, existen múltiples investigaciones con el fin de desarrollar nuevos y/o distintos fármacos dirigidos frente a diversas dianas claves implicadas en la patogénesis de la enfermedad. Entre ellos, cabe mencionar, inhibidores de las quinasas, de la desacetilasa de histonas, de los fenómenos de apoptosis medular y del metabolismo celular, entre otros (Béjar and Steensma 2014).

1.7.2. TRASPLANTE DE PRECURSORES HEMATOPOYÉTICOS (TPH)

Actualmente, en el SMD de Alto riesgo, el TPH alogénico es la única estrategia curativa en aquellos pacientes candidatos por edad y en ausencia de comorbilidad; aunque esta opción solo beneficia a una minoría de pacientes debido a que la edad media al diagnóstico oscila en torno a la 7^a década de vida. Actualmente, la edad límite para el trasplante alogénico se ha incrementado gracias a la modalidad de TPH con acondicionamiento de intensidad reducida (Micro-aloTPH).

Existe mucha variabilidad en relación a las tasas de SG y supervivencia libre de progresión en estos pacientes tras TPH, debiendo aplicar *scores* de comorbilidad específicos asociados al trasplante de precursores hematopoyéticos, tales como HCT-CI (Sorró *score*).

1.7.2.1. ALOREACTIVIDAD DE CÉLULAS NK

Se ha demostrado en el trasplante de MO HLA-haploidéntico, que determinadas combinaciones genéticas entre donante y receptor de las moléculas que regulan la función de las células NK, favorecía la lucha del injerto contra la leucemia. En este sentido, las células NK aloreactivas desempeñan un papel crucial. Se ha demostrado en pacientes con LMA, que la presencia de células NK aloreactivas mejora el resultado del TPH (Ruggeri et al., 2002). Una característica de las células NK aloreactivas es la expresión de receptores KIRs que no estén comprometidos con alelos HLA de clase I presentes en las células alogénicas. Además, las células NK aloreactivas no deben expresar el receptor CD94/NKG2A, específico para moléculas HLA-E (presente en todas las células HLA-I⁺).

Los criterios para la selección de un donante ideal se basan en trabajos llevados a cabo por los grupos Moretta y Ruggeri, entre otros; el cual debe presentar, al menos, una incompatibilidad con el receptor en los ligandos KIR (HLA-C1, HLA-C2 o HLA-Bw4), es decir, que al menos un ligando esté ausente en el receptor, pero presente en el donante. Esto permitiría que una clona NK KIR⁺ manifieste capacidad aloreactiva frente a las células leucémicas del receptor, al reconocer en ellas la pérdida de su ligando correspondiente, en base a la teoría pérdida de identidad o *missing self*. Las células NK han sido relacionadas con una baja tasa de recaída postrasplante alógeno de MO, en los que existe una incompatibilidad KIR entre donante y receptor (Moretta et al., 2008; Moretta et al., 2011; Ruggeri et al., 2002; Ruggeri et al., 2006; Ruggeri et al., 2007).

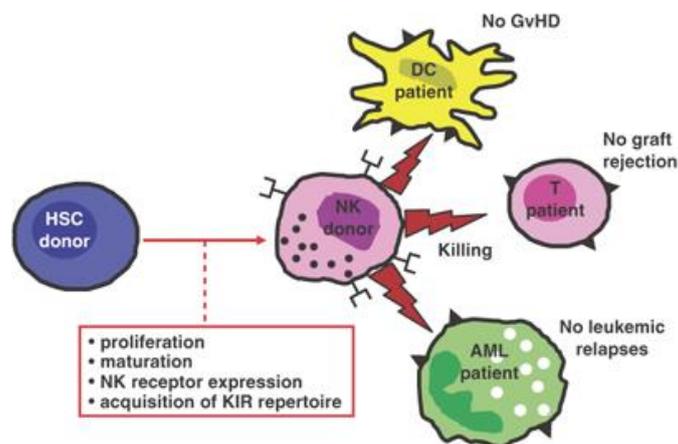


Figura 7. Papel terapéutico de células NK aloreactivas en la prevención de la recaída leucémica en el TPH haploidéntico. Las células NK aloreactivas del donante pueden matar a las células leucémicas residuales después de la quimioterapia y la radioterapia (régimen de acondicionamiento). También pueden eliminar las CD del paciente, evitando así la activación de las células T alogénicas y disminuyendo la reacción de injerto contra huésped. Finalmente, las células NK aloreactivas destruyen las células linfopoyéticas residuales del receptor, incluidos los linfocitos T, lo que evita el rechazo del injerto (Moretta et al., 2008).

1.8. RECONOCIMIENTO INMUNOLÓGICO EN CÁNCER

1.8.1. TEORÍA DE LA INMUNOVIGILANCIA FRENTE AL DESARROLLO DE TUMORES: INMUNOVIGILANCIA, INMUNOEDICIÓN E INMUNOESCAPE

La idea de que el sistema inmunitario puede controlar el desarrollo del cáncer ha sido tema de debate durante más de un siglo. A principios de 1900, Paul Ehrlich fue quizás la primera persona en proponer que el cáncer sería un evento común en organismos de vida larga si no fuera por los efectos protectores de la inmunidad (Manjili 2011). Sin embargo, en aquel entonces se sabía muy poco sobre la composición y la función del sistema inmunitario, por lo que fue imposible evaluar la validez de esa predicción. Pasaron casi 50 años antes de que la idea del control inmunológico del cáncer reapareciera, estimulada en gran parte, por una mejora en su comprensión y por la existencia de los antígenos tumorales (Old and Boyse 1964). Estos avances proporcionaron la base sobre la cual Burnet y Thomas construyeron su hipótesis de la inmunovigilancia tumoral, la cual preveía formalmente que la inmunidad adaptativa era la responsable de prevenir el desarrollo del cáncer en huéspedes inmunocompetentes (Burnet 1957; Thomas 1959). Después de eso, se demostró el papel que presentaban las CPAs en la activación de las células T, y se desarrolló el modelo de la inmunovigilancia del cáncer. Sin embargo, la idea de la inmunovigilancia no fue totalmente aceptada hasta 1990, cuando modelos experimentales en ratones knockout con tumores inducidos validaron su existencia (Hankaran et al., 2001).

El sistema inmunitario, no sólo protege al huésped del desarrollo del tumor, sino que, a través de su interacción con éste, esculpe el fenotipo del cáncer y favorece la inmuno-selección de variantes tumorales menos inmunogénicas que, al escapar del control inmunitario, progresan. Por lo que, tal y como se concebía originalmente, la inmunovigilancia es la función protectora del huésped en estadios tempranos de la transformación celular. Por este motivo, se introdujo un nuevo término que refinó y completó la teoría de la inmunovigilancia: *immunoediting* o inmunoedición del cáncer, estableciendo el papel dual de la inmunidad, tanto en la prevención como en el modelado de la enfermedad neoplásica (Dunn et al., 2002; Hankaran et al., 2001). En individuos inmunocompetentes, este proceso involucra cambios en el tumor, en el microambiente y en el sistema inmunitario (Mailloux and Epling-Burnette 2013). Actualmente, el proceso de inmunoedición conduce desde la inmunovigilancia hasta el inmunoescape, pasando por tres fases diferenciadas: eliminación, equilibrio y escape (Dunn et al., 2004; Hankaran et al., 2001) (*Figura 8*).

Eliminación: La fase de eliminación representa el concepto original de inmunovigilancia. El proceso de eliminación tumoral incluye respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas. Esta fase se inicia cuando el sistema inmunológico se alerta de la presencia del tumor, el cual produce la alteración del tejido local como resultado del modelado estromal, como consecuencia de los procesos de angiogénesis (Carmeliet and Jain 2000) y el crecimiento invasivo del tumor (Sternlicht and Werb 2001).

Si la destrucción de células tumorales es total, la fase de eliminación representa el punto final del proceso del cáncer *immunoediting*. Mientras que múltiples respuestas inmunitarias protegen al hospedador al desarrollo del cáncer, la inflamación crónica puede promover a la vez su inicio y progresión. En un principio, la respuesta inflamatoria desencadenada en el microambiente tumoral protege frente al desarrollo del cáncer; pero, sin embargo, el mantenimiento de los mediadores de la inflamación, originan un estado crónico, polarizando la inmunidad hacia un fenotipo que promueve la activación de células inmunosupresoras adicionales que apoyan la progresión tumoral (Mittal et al., 2014).

Equilibrio: El siguiente paso del cáncer *immunoediting* es la fase de equilibrio, en la que el sistema inmunitario y las células tumorales que escapan a la fase de eliminación, entran en un equilibrio dinámico. En este proceso, la presión ejercida por la inmunovigilancia es suficiente para controlar la progresión tumoral, en la que los linfocitos y el IFN- γ desempeñan un papel crítico, pero sin lograr extinguirlos totalmente (Kim et al., 2007). Esta fase es la menos estudiada debido a la dificultad de obtener modelos murinos para la misma.

Durante este período de selección Darwiniana, muchas de las variantes originales del tumor son destruidas, pero surgen nuevas variantes con nuevas mutaciones que les permiten aumentar la resistencia al ataque inmunológico, originando así una población con inmunogenicidad reducida, tras la modelación por el sistema inmunitario. Estas células presentan una mayor capacidad de sobrevivir en un huésped inmunocompetente, lo que explica la aparente paradoja de la formación de tumores en individuos inmunológicamente intactos (Kim et al., 2007; Schreiber et al., 2011).

Dado que la fase de equilibrio implica la eliminación continua de células tumorales y la producción de variantes tumorales resistentes debido a la presión ejercida por el sistema inmunitario, es probable que la fase de equilibrio sea el proceso más largo de la inmunoección del cáncer, pudiendo llevarse a cabo durante muchos años (Dunn et al., 2004). De hecho, se ha estimado que, para la mayoría de los tumores sólidos, existe un intervalo que abarca desde meses hasta 20 años desde la exposición inicial al carcinógeno y la detección clínica del tumor (Loeb et al., 2003). Esto se debe a que el sistema inmunitario mantiene a la célula tumoral en un estado funcional durmiente, conocido como "estado de latencia". Durante este periodo, la heterogeneidad e inestabilidad genética de las células tumorales son posiblemente las principales fuerzas que capacitan al tumor a la resistencia frente al huésped, permitiendo a la célula tumoral la capacidad de dividirse, invadir y metastatizar.

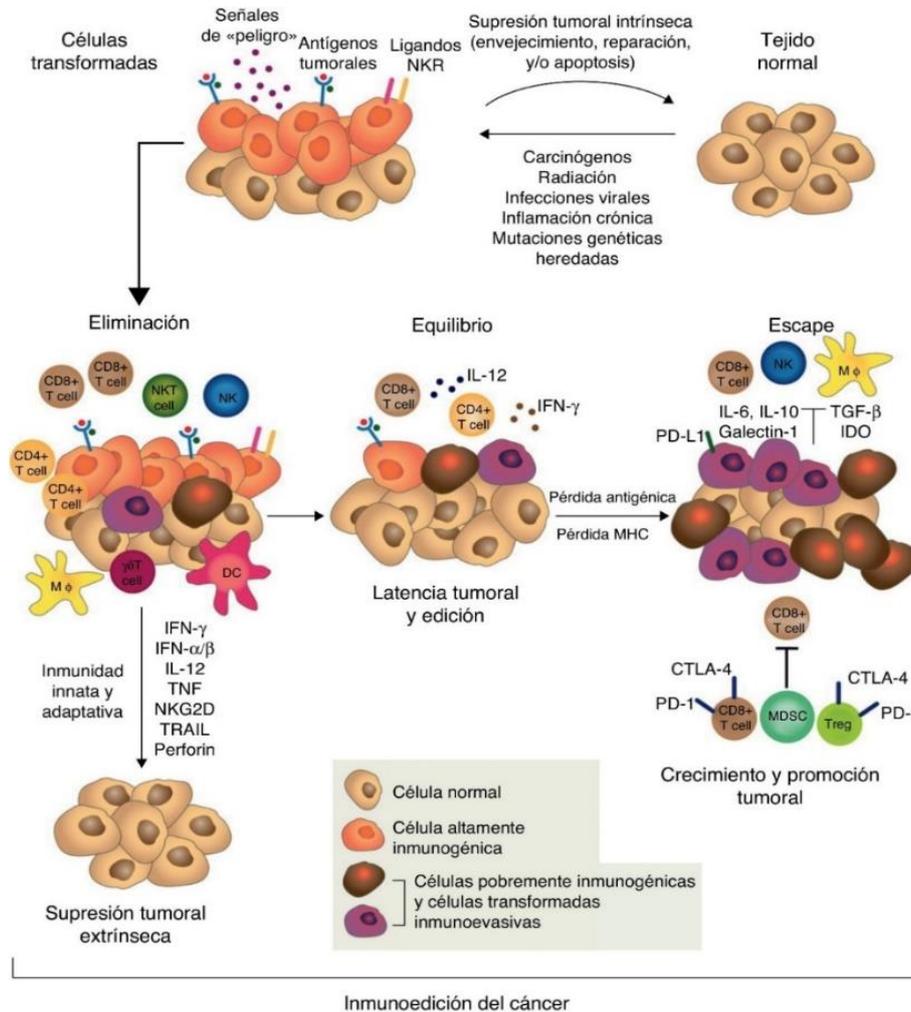


Figura 8. Representación esquemática del proceso de inmunoección (Schreiber et al., 2011).

Es importante destacar que, mecanismos inmunitarios adaptativos, especialmente la IL-12, IFN- γ , células T CD4⁺ y CD8⁺, y no mecanismos de la inmunidad innata, son los responsables de este periodo de latencia tumoral.

La IL-12 promueve la eliminación de las células tumorales, mientras que la IL-23 (que comparte la subunidad (p40) con la IL-12), promueve su persistencia; manteniendo así los tumores en el equilibrio (Teng et al., 2012). Otros mecanismos también implicados son: la IL-4, IL-17A, TNF, IFN- $\alpha\beta$. Esta fase de equilibrio ha sido relacionada con un aumento de células T CD8⁺, células NK, células T $\gamma\delta$. Por otra parte, se ha relacionado con una baja proporción de células NKT, células Treg y MDSCs en el microambiente tumoral (Wu et al., 2013). Estudios adicionales muestran que células T específicas del tumor pueden detener el crecimiento de tumores pancreáticos inducidos experimentalmente en ratones, mediante la interacción coordinada de IFN- γ y TNF. Además, en ausencia del receptor del TNF (TNFR) o IFN- γ , las células T promueven la angiogénesis y la carcinogénesis. Por otra parte, la combinación de IFN- γ y TNF induce senescencia en numerosos cánceres murinos y humanos (Müller-Hermelink et al., 2008).

Escape tumoral: Este estadio se origina cuando los cambios epigenéticos y genéticos presentes en la célula tumoral, junto con la inducción de mecanismos inmunosupresores, le confieren resistencia a la detección inmunológica y/o eliminación (Dunn et al., 2002). En este punto, el sistema inmunitario es incapaz de contener al tumor que continúa creciendo progresivamente, traduciéndose desde el punto de vista clínico en el desarrollo maligno de la enfermedad. Se cree que la mayoría de los tumores se diagnostican, generalmente, en esta etapa final de escape inmunitario.

1.9. MECANISMOS DE EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA EN CÁNCER

1.9.1. INMUNOTOLERANCIA DENTRO DEL MICROAMBIENTE TUMORAL

Hallazgos experimentales sostienen que el cáncer no sólo se desarrolla como un proceso multifásico de adquisición por la célula tumoral de unas características (hallmarks) que parecen ser una constancia en muchos tipos de cáncer (Hanahan and Weinberg 2000), sino que hay que adicionarles otras características biológicas importantes no clásicas que tienen que ver con el microambiente celular (células del estroma, fibroblastos) y la respuesta inflamatoria, tanto innata como adaptativa. La respuesta antitumoral efectiva depende de la correcta interacción de diversos componentes del sistema inmunitario; sin embargo, los tumores malignos desarrollan numerosos mecanismos para evadir su reconocimiento y eliminación, existiendo una gran complejidad entre el sistema inmunitario y el tumor.

En el escape inmunológico influyen numerosos factores que se pueden dividir, de forma general, en 2 categorías: **1) Mecanismos de tolerancia tumoral** y, **2) Mecanismos de resistencia a la muerte celular**. Este último puede llevarse a cabo a través de la inducción de mecanismos antiapoptóticos, que involucran activación de oncogenes, tales como Stat3; o a través de la expresión de moléculas anti-apoptóticas como Bcl-2 (Drake et al., 2006).

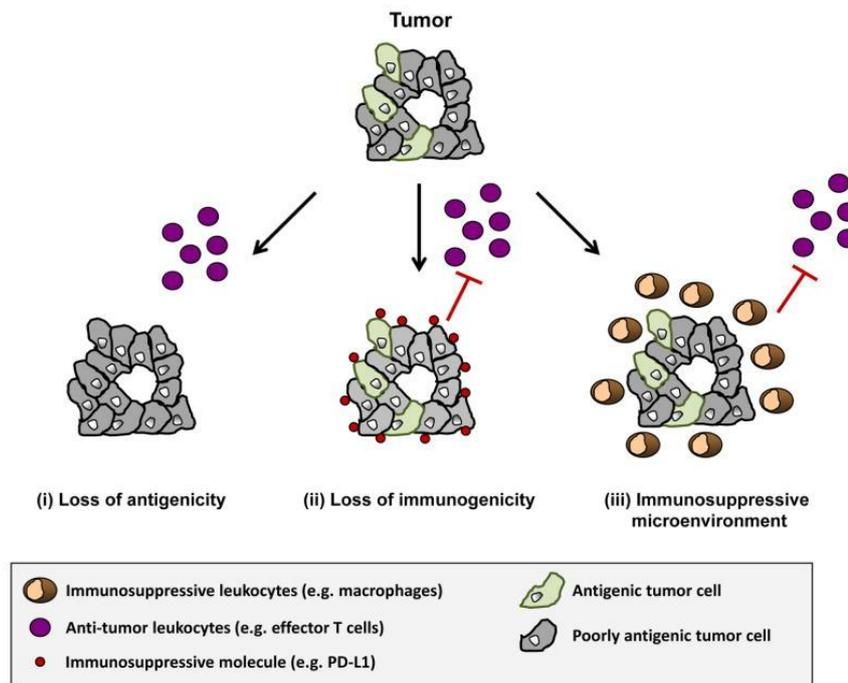


Figura 9. Mecanismos de inmunoevasión en tumores. Las células tumorales deben adquirir una serie de mecanismos que le permitan evadir al sistema inmunológico: (i) pérdida de antigenicidad y/o (ii) pérdida de inmunogenicidad. La pérdida de antígenos en la superficie celular tumoral puede ser debida a defectos en el procesamiento y presentación de antígenos o mediante la pérdida de antígenos tumorales inmunogénicos presentados en el contexto MHC. Aunque la pérdida de antígenos se asocia a con una pérdida de inmunogenicidad, las células tumorales pueden adquirir propiedades inmunosupresoras adicionales, como la expresión de PD-L1 o la secreción de citocinas inmunosupresoras (ej. IL-10, TGF- β), reduciendo aún más su inmunogenicidad. (iii) Además, los tumores pueden también escapar al sistema inmunitario gracias a la formación de un microambiente inmunosupresor (Beatty and Gladney 2015; Lengauer et al., 1998).

La tolerancia tumoral puede encuadrarse en dos vías distintas no excluyentes (Beatty and Gladney 2015).

(1) Cambios en la célula tumoral que originaría la selección de clones celulares no reconocibles por el sistema inmunitario (Garrido et al., 1997; Ruiz-Cabello and Garrido 1998; Senovilla et al., 2012). La pérdida de la expresión de antígenos tumorales es uno de los mecanismos de escape mejor estudiados, y puede ocurrir a través de diferentes vías: **(i)** aparición de células tumorales que carecen de la expresión de neoantígenos altamente inmunogénicos, **(ii)** pérdida de expresión de moléculas MHC de clase I, necesarias para la presentación antigénica a los linfocitos T CD8⁺ específicos del tumor, o **(iii)** alteración de la maquinaria de procesamiento antigénico (APM). Todas estas alteraciones son probablemente impulsadas por una combinación entre los fenómenos de inestabilidad genética inherente a toda célula tumoral y el proceso de inmunoselección.

(2) Cambios en el sistema inmunitario: i) en respuesta a factores inmunosupresores a nivel local inducidos por el tumor. Alternativamente, el escape tumoral puede llevarse a cabo gracias a la formación de un entorno inmunosupresor (Schreiber et al., 2011).

Las células tumorales pueden promover dicho estado mediante la secreción de citocinas inmunosupresoras tales como: TGF- β , IL-10, VEGF, galectina, o IDO; y/o mediante el reclutamiento de células con función inmunosupresora, que abarcarían células Treg, células MDSC y macrófagos M2, entre otras (Coussens et al., 2013); **o ii) por defectos en su función.** Las células tumorales pueden inducir anergia de células T tumorales específicas (debido a una disminución de moléculas coestimuladoras en las CPAs) o inducir defectos en la señalización mediada por TCR (debido a un descenso de la cadena CD3 ξ del TCR).

1.9.2. ALTERACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD EN TUMORES

Desde hace tiempo se conoce que la transformación maligna de la célula tumoral se asocia a una alteración en la expresión de las moléculas HLA de clase I (HLA-I) codificadas en el cromosoma 6 (CRM 6). Uno de los mecanismos más importantes es la pérdida o down-regulación del MHC de clase I en la célula tumoral. La pérdida antigénica del MHC, asociada con la molécula HLA de clase I H-2K^k, fue descrita por primera vez en 1976 en un linfoma de ratón; y un año después, en 1977, se detectaron pérdidas HLA en tumores humanos (Garrido et al., 1976). Con el paso del tiempo, estas alteraciones han sido encontradas en una proporción creciente de tumores (Garrido et al., 1993; Garrido et al., 1997).

Esta anomalía proporciona a las células neoplásicas la capacidad de ser reconocidas por el sistema inmunológico adaptativo, haciéndolas resistentes a la citotoxicidad mediada por células T. Contrariamente, las alteraciones en moléculas HLA-I las hace susceptible al ataque por células NK, capaces de lisar células tumorales que no expresan alelos HLA-I a través de un mecanismo en el que participan receptores inhibidores KIR ("missing self") (Ljunggren and Kärre 1990). Otro mecanismo de inmunoselección es la pérdida parcial de las moléculas HLA-I, permitiendo el escape simultáneo al ataque por CTLs y células NK, como ha sido observado en cáncer colorectal; asociándose además con un pronóstico desfavorable en comparación con tumores totalmente HLA positivos o HLA negativos (Watson et al., 2006).

La expresión de las moléculas de HLA-I es variable; esto depende de su síntesis, ensamblaje, transporte y/o expresión en la superficie celular. Los mecanismos moleculares responsables de alteraciones en la expresión de moléculas HLA-I, pueden afectar directamente a las cadenas pesadas, a la cadena de la $\beta 2m$, o bien, a los componentes de la APM. En algunos casos, hasta el 90% de las células tumorales presentan fenotipos HLA-I alterados. Estos fenotipos pueden clasificarse como: **Fenotipo I** (pérdida total HLA-I); **Fenotipo II** (pérdida de haplotipo HLA, debido a una pérdida de heterocigosidad (LOH) en CRM 6); **Fenotipo III** (pérdida de locus HLA-A, -B o -C); **Fenotipo IV** (pérdida de alelo HLA); **Fenotipo V** (Fenotipo compuesto; acumulación de varias alteraciones que conllevan a la expresión de un único alelo HLA Clase I), o finalmente, **Fenotipo VI** (Falta de respuesta a IFN) (*Figura 10*) (Garrido et al., 1997).

La expresión de HLA-I en la superficie celular tumoral puede detectarse mediante citometría de flujo utilizando un panel de anticuerpos específicos anti-HLA-I. El uso de un panel de AcMo anti-HLA que define determinantes monomórficos, locus específicos o alélicos, es absolutamente necesario ya que las células tumorales pueden perder todo o sólo algunos alelos HLA (Méndez et al., 2008).

➤ **Pérdida total de antígenos HLA clase I (Fenotipo I)**

La pérdida completa de expresión HLA puede estar relacionada con alteraciones en las diferentes etapas de la síntesis de la molécula. El defecto molecular más frecuente es la presencia de alteraciones en el gen que codifica la $\beta 2m$, originando una cadena no funcional (Seliger et al., 2002). Mutaciones o defectos en la síntesis de la $\beta 2m$ (Benitez et al., 1998), hipermetilación de los genes de la cadena pesada del MHC-I (Serrano et al., 2001) y/o alteraciones en la producción, ensamblaje o transporte del péptido antigénico debido a una pérdida o *down*-regulación de los componentes de la APM (Seliger et al., 2002), pueden causar ausencia total de expresión de estas moléculas en la superficie celular. Con frecuencia, la inactivación bialélica de la $\beta 2m$ como resultado de una mutación en una copia del gen en combinación con una pérdida de heterocigosidad, origina la pérdida total de la expresión HLA (Benitez et al., 1998; Paschen et al., 2003). Se han identificado mutaciones en el gen de la $\beta 2m$ que abarcan grandes deleciones hasta inserciones o deleciones de nucleótidos simples, así como sustituciones de nucleótidos con una consecuencia funcional. Esto origina una parada de la transcripción o en la mayoría de los casos, la traducción del ARNm; originando una proteína no funcional (Bernal et al., 2012).

➤ **Pérdidas selectivas de antígenos HLA clase I (Fenotipo II, III, IV)**

Entre las pérdidas selectivas HLA encontramos pérdida de haplotipo (Fenotipo II), pérdida de locus (Fenotipo III) y pérdidas alélicas (Fenotipo IV). La pérdida de haplotipo fue descrita en líneas celulares derivadas de tumores de distintos tipos histológicos debido a una LOH en la región del MHC. Puede ser debido a defectos en la segregación cromosómica o a recombinaciones mitóticas, causando la pérdida del brazo corto del cromosoma 6 (Marincola et al., 1994). Por otro lado, las pérdidas selectivas de locus (Fenotipo III) parecen deberse a un fallo en la regulación de la transcripción, y suelen afectar frecuentemente al locus B. Se han detectado alteraciones en las secuencias promotoras de locus HLA clase I que originan la *down*-regulación (Griffioen et al., 2000). La pérdida de un alelo HLA (Fenotipo IV) puede deberse a mutaciones o deleciones parciales que afectan a la transcripción o a la traducción de la cadena pesada (Real et al., 2001; Seliger et al., 2002; Serrano et al., 2001).

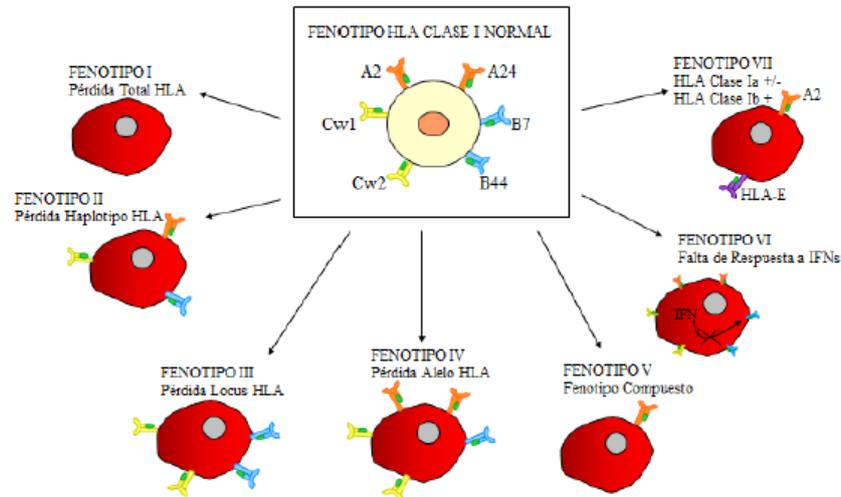


Figura 10. Fenotipo HLA normal y fenotipos HLA alterados en tumores. En condiciones normales, las células con fenotipo normal expresan 6 moléculas HLA-I en la superficie celular. Sin embargo, las moléculas HLA pueden estar ausentes de forma total o parcial en la superficie de las células tumorales (Fenotipo I-Fenotipo V). Además, la célula tumoral puede no responder a IFNs (Fenotipo VI) o expresar moléculas HLA-E alteradas junto con una disminución en la expresión de moléculas HLA clásicas (HLA-A, -B, -C). Imagen adaptada del libro: Bernal *et al*; “Inmunoterapia del cáncer. Perspectivas y realidades”. Sociedad Española de Inmunología (SEI). Cap. 2, 2015, 9-19. Ed. Elsevier, ISBN: 978-84-9022-887-6.

Por otro lado, las alteraciones en la molécula HLA pueden ocurrir a nivel genético (gen o cromosoma) o pueden ser reguladoras (transcripcional y postranscripcional), por lo que, desde el punto de vista funcional, los diferentes fenotipos HLA: **i)** aquellos que son capaces de aumentar la expresión de moléculas HLA mediante la acción de citoquinas (defectos *soft* o reguladores) aumentando así la respuesta antitumoral; **ii)** aquellos que no pueden recuperar la expresión de HLA I (lesión *hard*), favoreciéndose el escape tumoral. En el primer caso, el defecto molecular es reversible, mientras que en el segundo caso el defecto es estructural, resultando irreversible, y solamente pueden corregirse reemplazando el gen defectuoso. De acuerdo con esto, la naturaleza de la lesión de HLA clase I va a determinar el resultado de la inmunoterapia del cáncer.

- **Defectos irreversibles**

La LOH en el CRM 6 en la región HLA (6p21) es el mecanismo irreversible que conlleva a una pérdida de haplotipo HLA; y ha sido observada en varios tipos de tumores humanos con una incidencia del 35% (Maleno *et al.*, 2004; Maleno *et al.*, 2006). Otro mecanismo irreversible es la LOH en el CRM 15, que afecta al gen de la $\beta 2m$. Por otra parte, la LOH es un evento que ocurre con mayor frecuencia (40% en cáncer de colon, melanoma y carcinoma laríngeo; y 50% en carcinoma de vejiga) (Maleno *et al.*, 2002), que la presencia de mutaciones en el gen de la $\beta 2m$, describiéndose principalmente en cáncer de colon y líneas celulares de melanoma (Pérez *et al.*, 1999); y podría representar uno de los primeros eventos ya que las células tumorales pueden pasar inadvertida al presentar un patrón "normal" de HLA.

Por otra parte, las mutaciones bialélicas en el gen de la $\beta 2m$ constituyen un evento poco frecuente. Otro mecanismo irreversible es la pérdida de alelos HLA debido a mutaciones, deleciones y/o mecanismos de recombinación somática (Garrido et al., 1997). Las mutaciones en los genes HLA-I son un evento poco frecuente (Serrano et al., 2000). De manera similar, las mutaciones en *TAP* conducen a la pérdida de HLA-I, y han sido descritas en cáncer de pulmón y melanoma (Seliger et al., 2001). Por último, la resistencia a la regulación por IFN- γ es debida a alteraciones en los componentes Jak-Stat de la ruta de señalización mediada por IFN (Rodríguez et al., 2007).

- **Defectos reversibles**

La *down*-regulación de las moléculas de HLA-I puede ser debida a defectos en la regulación de los genes de la cadena pesada, el gen de la $\beta 2m$ o los componentes de la APM. Estos defectos son reversibles, ya que pueden corregirse *in vitro* con IFN- γ u otras citocinas (Seliger et al., 2008). A diferencia de las alteraciones genéticas, las modificaciones epigenéticas pueden, en algunos casos, revertirse *in vitro* con agentes farmacológicos que inducen la hipometilación del ADN o inhiben la desacetilación de histonas.

1.9.2.1. HLA EN NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

Es conocido que la alteración en la expresión de moléculas HLA-I en la superficie de la célula tumoral es un mecanismo ampliamente utilizado para escapar al control por células T (Garrido et al., 1997; Seliger et al., 2000; Seliger et al., 2002). Varios estudios demuestran la existencia de diferentes fenotipos HLA-I en un amplio rango de tumores sólidos, incluyendo la pérdida total o *down*-regulación de los antígenos de HLA-I, pérdida de haplotipo y/o pérdidas alélicas, entre otros; asociándose a diferentes mecanismos moleculares (Garrido et al., 1997; Méndez et al., 2007). El mecanismo más frecuentemente observado implica la LOH en la región HLA (LOH HLA), sugiriendo una estrategia común de inmunoevasión como resultado de una presión selectiva (Chowell et al., 2018; McGranahan et al., 2017; Perea et al., 2017b). Así, la homocigosidad en la región HLA podría proporcionar una ventaja selectiva a la célula tumoral al disminuir el repertorio antigénico presentado a los linfocitos T CD8⁺, en comparación con un estado de heterocigosidad (Chowell et al., 2018; McGranahan et al., 2017).

Hasta la fecha, la mayoría de las investigaciones enfocadas en anomalías de la expresión HLA han sido llevadas a cabo en tumores sólidos (70-90%), detectando una mayor frecuencia de pérdidas HLA en comparación con las neoplasias hematológicas: 49% en carcinoma de pulmón (McGranahan et al., 2017; Perea et al., 2017a), 20-70% en melanoma (Méndez et al., 2007); carcinoma laríngeo (Maleno et al., 2002), 38% en cáncer de mama de alto grado; y 90% en cáncer de cuello de útero (Koopman et al., 2000).

Contrariamente a lo que ocurre en tumores sólidos, la expresión de antígenos HLA-I ha sido investigada en un número limitado de neoplasias hematológicas; siendo detectada en un bajo porcentaje de leucemias, tales como: Leucemia linfática Crónica (LLC) (Nouri et al., 1998), Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) y LMA (Brouwer et al., 2002).

Se ha observado que la pérdida parcial de alelos HLA ocurre con mayor frecuencia en neoplasias hematológicas que las pérdidas de haplotipo HLA (Wetzler et al., 2001). La *down-regulación* o la pérdida de antígenos HLA-I en la célula tumoral parece ocurrir de forma preferencial, observándose pérdidas selectivas en leucemias en estadios previos al trasplante. Masuda y col. detectaron por primera vez una pérdida de haplotipo HLA en el 11.1% de líneas celulares leucémicas (Masuda et al., 2007). Posteriormente, un estudio realizado en pacientes con LLC mostró una elevada tasa de homocigosidad en los loci HLA-A, B, C y DRB1 en comparación con la población general, sugiriendo LOH HLA como posible mecanismo de inmunoselección (Shah et al., 2011). En esta línea, algunos autores han observado una *Copy Neutral Loss of Heterocigosity* (CN-LOH) en la región HLA en pacientes con AA, postulando dicho mecanismo como un fenómeno de escape a la autoinmunidad ejercida por los CTLs (Katagiri et al., 2011).

La *down-regulación* o pérdidas selectivas de alelos HLA, pero no la pérdida total de la expresión de moléculas HLA en la superficie tumoral, han sido observadas en células leucémicas. Curiosamente, mutaciones en el gen que codifica la $\beta 2m$ que originen una pérdida total de expresión HLA han sido observadas en linfomas, tales como Linfoma de células B y Linfoma de Hodgkin (Challa-Malladi et al., 2011; Riemersma et al., 2000): no siendo observadas en leucemias. En esta línea, la pérdida total de antígenos HLA-I se ha asociado con un curso agresivo de la enfermedad en el Linfoma no Hodgkin (Amiot et al., 1998).

Como se ha mencionado anteriormente, son escasos los trabajos que muestran pérdidas HLA en leucemias; sin embargo, LOH HLA ha sido identificada aproximadamente en el 20-33% de las recaídas leucémicas post-trasplante. Estudios recientes muestran CN-LOH HLA gracias a mecanismos de disomía uniparental adquirida (aUPD) en pacientes tras un TPH-haploideéntico, a través del cual las células leucémicas escapan a la presión inmunitaria del injerto contra leucemia a través de la pérdida del haplotipo HLA no coincidente (Vago et al., 2009; Villalobos et al., 2010).

En un TPH-haploideéntico, la función antitumoral de las células NK cobra particular relevancia. Las células NK presentan en su superficie diversos receptores KIR, cuyos ligandos inhibidores son moléculas HLA-C. Pérdidas en cantidad y/o calidad de las moléculas HLA serían permisibles en aquellos casos en los que existe homocigosidad para los grupos HLA-C, ya que la ausencia de ligandos específicos para receptores KIR las haría susceptible al ataque por células NK. A diferencia de las aloespecificidades de HLA-C, no todos los alelos HLA-B inhiben la citotoxicidad de las células NK, sólo los alelos HLA-B que portan el epítipo HLA-Bw4 protegen a las células diana (Demanet et al., 2004).

Gracias a la identificación de antígenos específicos o asociados a leucemia reconocidos por los CTLs, se están desarrollando inmunoterapias específicas que incluyen la transferencia adoptiva de CTLs y la vacunación usando antígenos específicos de la leucemia. Sin embargo, la efectividad de la inmunoterapia depende en gran medida de la expresión de las moléculas HLA-I, por lo que la pérdida o disminución de la expresión HLA podría alterar el resultado de la misma. Incluso la eficacia de los tratamientos convencionales, como el TPH o la infusión de linfocitos del donante van a depender también de la expresión de antígenos HLA.

1.9.3. CÉLULAS DE LA INMUNIDAD INNATA Y ADAPTATIVA EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL

1.9.3.1. CÉLULAS MIELOIDES SUPRESORAS (MDSCs)

Fueron descritas en 1990 por *Bronte* y col. como «supresores naturales» en modelos animales de tumores asociándose con la disfunción de linfocitos citotóxicos (Bronte et al., 1998). *Gabrilovich* y col. acuñaron el término de “Células Mieloides Supresoras (MDSCs)” para describir a una población morfológicamente heterogénea de células mieloides en humanos con fenotipo inmaduro, originadas en MO (Gabrilovich 2017). En individuos sanos, se encuentran en bajo número en SP y están encargadas de la regulación de la respuesta inmunitaria y de la reparación de los tejidos (Gabrilovich 2017).

La MDSCs carecen de marcadores específicos, por lo que existe una gran dificultad a la hora de su identificación en los pacientes con cáncer. En humanos, se caracterizan por la expresión en superficie de marcadores mieloides CD33, CD11b y baja/ausencia HLA-DR (CD33⁺ CD11b⁺ HLA-DR⁻). Se han definido 2 subconjuntos clínicamente relevantes, MDSCs monocíticas (Mo-MDSCs) (CD14⁺ CD15⁻) y granulocíticas o polimorfonucleares (PMN-MDSCs) (CD14⁻ CD15⁺) (Gabrilovich 2017).

En circunstancias normales, las HSCs ubicadas en la médula ósea dan lugar a células mieloides inmaduras, y se diferencian hacia células mieloides maduras (macrófagos, DCs, granulocitos), en presencia de citoquinas específicas (Geissmann et al., 2010). Sin embargo, bajo condiciones patológicas como cáncer, proceso traumatológico, u otra enfermedad caracterizada por una inflamación crónica, los mediadores producidos por el tumor favorecen la acumulación de las células mieloides inmaduras con fenotipo inmunosupresor, denominadas MDSCs; en diferentes lugares como MO, hígado, bazo y microambiente tumoral (Gabrilovich 2017). La presencia de MDSCs se ha relacionado con procesos pro-tumorales, tales como la angiogénesis, progresión del tumor y metástasis; asociándose a un desarrollo clínico desfavorable (Pyzer et al., 2016).

Han sido descritas en una amplia variedad de cánceres tales como carcinoma renal, melanoma, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, cáncer colorectal-colon, carcinoma de células renales, cáncer gastrointestinal, adenocarcinoma pancreático, cáncer de esófago y cáncer de pulmón de células no pequeñas, entre otros (Pyzer et al., 2016). Recientemente se ha estudiado el papel de las MDSCs en las neoplasias hematológicas; presentando una gran relevancia en el Linfoma no Hodgkin de células B, Linfoma de Hodgkin y LLC; entre otros (Damuzzo et al., 2015; Pyzer et al., 2016).

La expansión de MDSCs durante el desarrollo del cáncer no representa un evento patológico sino fisiológico. Las células tumorales inducen la expansión de MDSCs gracias a la secreción de factores derivados del tumor, que comprenden una variedad de compuestos biológicamente activos incluyendo factores de crecimiento, citoquinas y quimioquinas (Damuzzo et al., 2015).

Todos los mecanismos usados por las MDSCs para suprimir la inmunidad innata y adaptativa son dependientes de la proximidad de éstas con las células diana, ya que dependen del contacto directo célula-célula a través de receptores celulares o mediadores solubles (Gabrilovich 2017).

Los mediadores locales de señalización, tales como la ciclooxigenasa-2 (COX2), prostaglandinas, IL-1 β e IL-6, TNF- α , GM-CSF y VEGF promueven la expansión de las MDSCs en la MO gracias a la activación de rutas que implican a JAK quinasas y factores de activación de la transcripción (Stat) (Gabrilovich 2017; Sawanobori et al., 2008). Stat3 actúa sobre diferentes factores anti- y pro- apoptóticos, c-myc, Bcl-xL, ciclina D1 y survivina, previniendo así la diferenciación y maduración hacia células mieloides maduras (Gabrilovich 2017). Por otro lado, IFN- γ , IL-13, IL-4 y TGF- β , producida por las células estromales después de la muerte de las células tumorales, promueven la activación de las MDSCs, mediante la inducción de factores intracelulares como STAT1 y STAT6. A su vez, estos factores inducen la expresión de la Óxido Nítrico Sintasa inducible (iNOS), arginasa y citoquinas inmunosupresoras por las MDSCs (Gabrilovich 2017; Pyzer et al., 2016).

Las MDSCs pueden inducir inmunosupresión gracias a la inhibición de los nutrientes necesarios para la síntesis de proteínas de activación linfocitaria (Gabrilovich et al., 2012). Por ejemplo, pueden eliminar la L-Arginina y L-Cisteína (Rodríguez et al., 2004; Srivastava et al., 2010), 2 aminoácidos necesarios en la diferenciación celular T. Las MDSCs expresan Arginasa-1 (Arg1) e iNOS2, resultado de la estimulación de citoquinas, incluyendo IL-10, IFN- γ y TNF- α . La Arg1 convierte la L-Arginina en urea y L-ornitina, y la iNOS2 la transforma en óxido nítrico (NO) y L-citrulina. Se ha demostrado que las PMN-MDSCs producen Arg1 mientras que Mo-MDSC producen iNOS.

La privación de L-arginina induce la disfunción de las células T, originando una *down*-regulación de la cadena ζ del TCR, requerida para su activación linfocitaria; y, además, el NO producido por las MDSCs interfiere en la señalización Jak-Stat, necesario para varias funciones efectoras de las células T e induciendo la apoptosis celular T (Waldron et al., 2013).

Por otro lado, las células T carecen de la enzima para la síntesis de L-cisteína y el transportador de membrana para importar cistina, por lo que son dependientes de los macrófagos y CDs para que les proporcionen cisteína durante la presentación antigénica (Pyzer et al., 2016). Las células MDSC carecen de cistationasa y dependen de la cistina extracelular para la síntesis de cisteína por lo que importan cisteína a una tasa similar a los macrófagos y DC, pero no exportan cisteína. Esta acción produce depleción de cisteína ambiental y produce la inhibición de la función y activación de las células T (Draghiciu et al., 2015). Por otro lado, la Arg1 inhibe la proliferación de las células NK y la producción de INF- γ por éstas (Oberlies et al., 2009).

Otro tipo de mecanismo supresor de las MDSCs consiste en la inducción de estrés oxidativo. Las MDSCs expresan altos niveles de estrés oxidativo debido al aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y a la actividad iNOS, originando así especies reactivas de nitrógeno (RNS), tales como peroxinitrito, H₂O₂, y NO (Bogdan 2001). El NO suprime la función de las células T alterando la vía de señalización Jack/Stat, reduciendo la expresión del MHC, induciendo la apoptosis celular T, disminuyendo la expresión de la cadena ζ TCR y originando la desensibilización del TCR.

Las células T activadas son altamente dependientes de triptófano y, por lo tanto, sensibles a su depleción. La IDO es una enzima inmunomoduladora que polariza la presentación antigénica hacia un fenotipo tolerante. En la LLC, las Mo-MDSCs expresan altos niveles de IDO. El bloqueo de dicha encima origina un aumento de la proliferación celular T y una disminución de las células Treg (Jitschin et al., 2014).

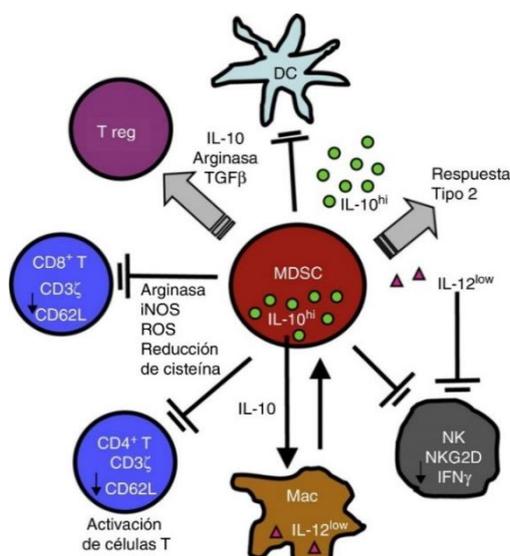


Figura 11. Mecanismos llevados a cabo por las MDSCs que contribuyen al inmunoescape. Las células MDSCs suprimen la función de la inmunidad innata y adaptativa mediante una variedad de mecanismos: (i) Bloquear la migración de los linfocitos T *naive* CD62L hacia órganos linfoides y posterior transformación hacia células T efectoras; (ii) liberar factores que estimulan la conversión hacia células Treg y su expansión; (iii) inducir vías intracelulares que promueven la auto-expansión; (iv) producir altos niveles de (Arg-1 reduciendo la disponibilidad a las células T de L-arginina, induciendo la detención del ciclo celular; (v) estimular la producción de ROS y RNS, que disminuyen la funcionalidad del TCR (Ostrand-Rosenberg and Sinha 2009).

La vía de señalización PD-1/PD-L1 juega un papel crucial en la inmunotolerancia dentro del microambiente tumoral. Las MDSCs expresan el ligando PD-L1, el cual se une al receptor PD-1 situado en la superficie de las células T, transformándolos en linfocitos T exhaustos. De forma similar, las MDSCs expresan Galectina 3, el cual se une a TIM-3 situado en los linfocitos T, induciendo su apoptosis. Por otra parte, la IL-1 β derivada del tumor induce la acumulación y activación de las MDSCs, lo que conlleva al aumento de NF- κ B, con actividad inmunosupresora. La producción de TGF- β e IL-10 por las MDSCs origina el reclutamiento de las Treg. Además, la IL-10 inhibe la función de las CDs y, además, actúa sobre los macrófagos que producen IL-10, originando una repuesta Th2 (Draghiciu et al., 2015; Pyzer et al., 2016).

Varios estudios han demostrado que las MDSCs pueden también influir en el tráfico de linfocitos tumorales y en su viabilidad. Para migrar a los ganglios linfáticos las células T *naive* deben expresar altos niveles de L-selectina CD62L. Tras la activación dentro de los nódulos linfáticos, los niveles de CD62L disminuyen, permitiendo a las células T activadas salir a la periferia. Cuando las MDSCs expresan en su membrana la proteína ADAM 17, el contacto entre las MDSCs y células T *naive* elimina la L-selectina CD62L (Hanson et al., 2009).

1.9.3.2. CÉLULAS NATURAL KILLER (NKs)

Las células asesinas naturales o células natural killer (NKs) constituyen un tipo de linfocitos producidos en la MO. Se localizan de forma mayoritaria en SP y en los nódulos linfoides, aunque también se pueden encontrar en la piel, el hígado, el intestino, los pulmones y el útero, entre otros (Cichocki et al., 2013).

Constituyen una población relativamente pequeña de linfocitos circulantes que no expresan marcadores propios de los linfocitos T o B maduros. Su función efectora está mediada por la producción de citocinas y actividad citotóxica. Presentan funciones reguladoras gracias a la secreción de citoquinas y quimioquinas favoreciendo así el desarrollo de una respuesta inmunitaria Th1 (Cichocki et al., 2013; Maghazachi 2010). Su capacidad citotóxica es llevada a cabo a través de las mismas moléculas empleadas por las células T citolíticas (perforina, granzima, Fas-Fas ligando e interacción TRAIL-receptor TRAIL). Pero, a diferencia de las células T que requieren una activación previa para inducir la expresión de gránulos que contienen perforina y granzima, las células NK expresan de forma natural los gránulos citolíticos (Screpanti et al., 2005).

Representan entre el 7-15% del total de linfocitos circulantes en SP. En términos morfológicos, se definen como linfocitos grandes granulares; los cuales carecen del marcador CD3, pero expresan las moléculas CD56 y/o CD16. La maduración de las células NK conlleva un continuo proceso de diferenciación desde CD56^{bright} hacia CD56^{dim}, alterando su fenotipo y propiedades funcionales. En base a esto, la expresión de las moléculas CD56 y CD16 es variable y permite su clasificación: **a)** CD56^{Bright}, las cuales no expresan CD16 y presentan baja expresión de receptores KIR; **b)** CD56^{dim}, que constituyen aproximadamente el 90% de las células NK. Una pequeña proporción son CD16⁻, pero en su mayoría, expresan CD16 y receptores KIR; y finalmente **c)** CD56⁻, con elevada densidad de la molécula CD16 (Bjorkstrom et al., 2010).

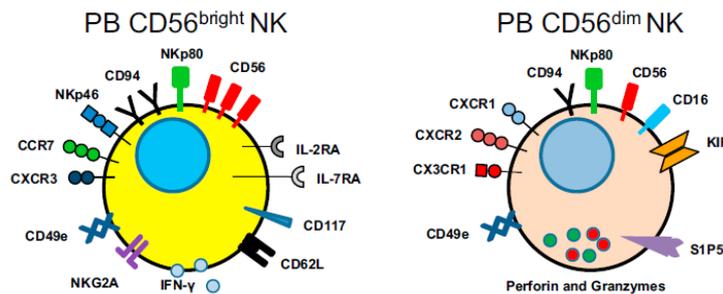


Figura 12. Caracterización fenotípica de células NK en SP. Tradicionalmente, los dos subconjuntos principales de células NK (CD56^{bright} y CD56^{dim}) se han caracterizado en SP en función de la expresión diferencial de las moléculas CD56 y CD16. (Freud et al., 2017).

Las células NK CD56^{bright} responden a citoquinas y producen una mayor cantidad de citoquinas inmunomoduladoras, tales como IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-15 y GM-CSF, pero presentan baja capacidad citotóxica. Se caracterizan por expresar altos niveles de CCR7 y CD62L, lo que les permite migrar hacia los nódulos linfoides. También han sido definidas como células NK reguladoras, debido a su capacidad para potenciar la respuesta de CDs y, de esta manera, favorecer la respuesta de los linfocitos T. Las células NK CD56^{dim} expresan una alta densidad de receptores activadores que potencian su capacidad citotóxica, con elevada cantidad de perforina para responder frente a células tumorales.

Los receptores que regulan la función de las células NK, incluyen:

i) Superfamilia de las inmunoglobulinas (receptores KIR y tipo ILT), codificados en el cromosoma 19. Estos pueden ser activadores o inhibidores y son sensibles a la disminución de las moléculas de HLA-I (HLA-A, -B y -C); **ii)** Superfamilia de las lectinas o KLR (Killer-cells Lectin-like Receptors). Presentan formas inhibitoras NKG2A y B, y formas activadoras NKG2C y E, cuyo ligando es la molécula no clásica HLA-E; **iii)** Heterodímero NKG2D/CD94, codificado en el cromosoma 12, encargado también en el reconocimiento de HLA-E (La molécula HLA-E contiene el péptido líder de los alelos HLA-A, B y C, por lo que no precisa del haplotipo del individuo para inhibirse) (Braud et al., 1998; Parham 2005); **iv)** Receptores de citotoxicidad natural (*Natural Cytotoxicity Receptors*, NCR), que incluyen los receptores activadores NKp30 y NKp46 (expresados constitutivamente en células NK de SP) y NKp44 (inducido bajo estimulación por IL-2); **v)** El receptor CD16, un receptor Fc del tipo FcγRIIIA de baja afinidad para la IgG; implicado en el reconocimiento de células opsonizadas por anticuerpos IgG (Biassoni et al., 2001). La activación de las células NK está regulada por un balance del total de señales recibidas a partir de los receptores que expresan, es decir, por el balance entre señales de activación e inhibición (Bakker et al., 1998).

Estructuralmente, los receptores KIR están constituidos por dominios extracelulares tipo inmunoglobulina y una cola intracitoplasmática. De esta forma, la nomenclatura de estos receptores se basa en sus características morfológicas según el número de dominios inmunoglobulina (2D o 3D) en la región extracelular, codificados por los exones 3, 4, 5; o si el tallo intracitoplasmático es corto (“S” del inglés “Short”; dotados de dominios estructurales ITAM con función activadora) o largo (“L” del inglés “Long”; dotados de dominios estructurales ITIM con función inhibitora), y seguido de un dígito que diferencia las moléculas codificadas por genes diferentes (Kulkarni et al., 2008; Parham 2005).

Debido a la proximidad entre los distintos genes KIR, por lo general se segregan en haplotipos con alto desequilibrio de ligamento. Tradicionalmente, se distinguen dos grupos:

- **Haplotipo A**, se compone de cinco genes que codifican receptores inhibidores (*KIR2DL1*, *2DL3*, *3DL1*, *3DL2*, *3DL3*), un gen de activación (*KIR2DS4*) e *KIR2DL4*, con capacidad activadora e inhibitora. Curiosamente, muchos haplotipos A poseen variantes nulas de *KIR2DS4* y *KIR2DL4*, que no se expresan en la superficie celular. Por lo tanto, estos haplotipos técnicamente no poseen receptores activadores KIR funcionales (Kulkarni et al., 2008; Parham 2005).
- **Haplotipo B**, contienen un número variable de receptores activadores e inhibidores; siendo los principales contribuyentes de la diversidad de asociaciones de presencia-ausencia de genes y de polimorfismos entre los presentes en cada genotipo.

Se han descrito más de 100 haplotipos KIR diferentes en función del contenido de genes que presenten; y sus frecuencias varían entre las distintas poblaciones. Destacar que los genes KIR (*2DL4*, *3DL2*, *3DL3* y *3DP*) están presentes en todos los haplotipos por lo que se denominan genes marco o *framework* (Becker et al., 2016; Kulkarni et al., 2008; Parham 2005).

En humanos, los receptores KIR tienen como ligando de mayor afinidad las moléculas del MHC de clase I con diferente afinidad (HLA-C > HLA-B > HLA-A) y en particular, los dominios $\alpha 1/\alpha 2$. Dicha unión se genera a través de puentes de hidrógeno y de interacciones hidrofóbicas. La especificidad KIR-HLA se ve influenciada por la presencia de ciertos aminoácidos localizados en la $\alpha 1$ hélice MHC-I, clave en la interacción. En este sentido, las moléculas HLA-C han sido clasificadas en dos grupos definidos en base a la presencia de dimorfismo en el dominio $\alpha 1$ de la cadena pesada (Kulkarni et al., 2008; Parham 2005).

- **Grupo 1 (C1)** constituido por aquellos alelos con motivos Asn80 y Ser77. Se incluyen los alelos HLA-C*01, *03, *07, *08, *12, *14, *16, ligandos para KIR2DL2/3 (CD158b1/b2) y KIR2DS2 (CD158j).
- **Grupo 2 (C2)**, con motivos Asn77 y Lys80 presentes en los alelos HLA-C*02, *04, *05, *06, *15, *17 y *18, ligandos para KIR2DL1 (CD158a) y KIR2DS1 (CD158h).

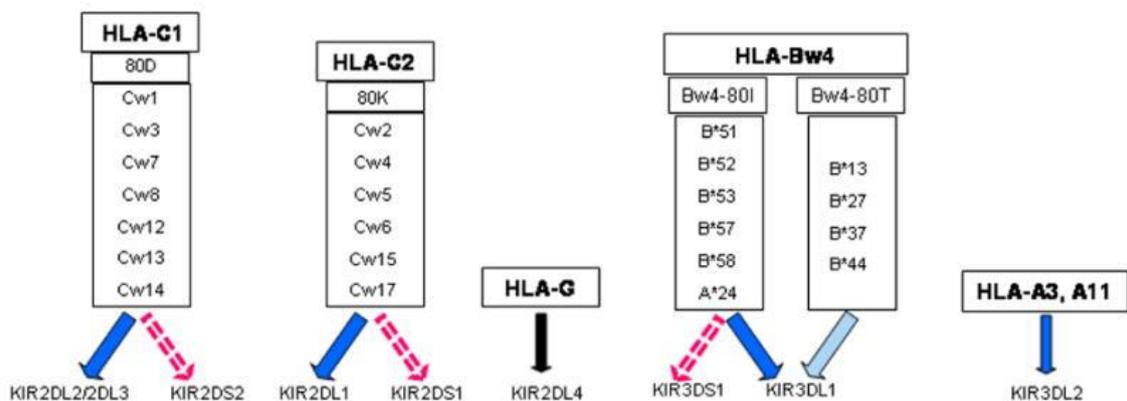


Figura 13. Especificidades HLA pertenecientes a los diferentes grupos de ligandos de receptores KIR. Se cree que los receptores activadores KIR2DS2, 2DS1 y 3DS1 presentan especificidades HLA similares que los correspondientes receptores inhibidores, aunque las interacciones KIR/HLA son mucho más débiles (representadas como flechas rojas). Los ligandos para KIR2DL5, 2DS3, 2DS4, 2DS5 y 3DL3 aún no han sido identificados (Kulkarni et al., 2008).

La activación de las células NK está regulada negativamente a través de receptores inhibitorios localizados en la superficie celular, específicos para las moléculas HLA I propias; por lo que la ausencia de señal negativa conlleva a la lisis de la célula diana. Como consecuencia, en un contexto autólogo, las células NK lisan a las células diana que carecen o expresan niveles bajos de moléculas de MHC de clase I. En un contexto alogénico HLA-haploidéntico, la aloreactividad de las células NK viene determinada por los ligandos KIR, es decir, alelos HLA-I agrupados en 3 grupos: grupo 1 HLA-C, grupo 2 HLA-C, y alelos HLA-Bw4. Dicho en otras palabras, la aloreactividad de las células NK se genera solamente entre aquellos individuos entre los que existe una incompatibilidad entre grupos de ligandos KIR. Por el contrario, las células NK que expresan la molécula CD94/NKG2A no son aloreactivas, ya que su ligando es la molécula HLA-E, expresado por todos los individuos (Ruggeri et al., 2006).

NOMBRE	CLUSTER DE DIFERENCIACIÓN	LIGANDOS
MOLECULAS ADHESIÓN		
<i>N-CAM</i>	<i>CD56</i>	?
RECEPTORES INHIBIDORES		
<i>KIR2DL1</i>	<i>CD158a</i>	HLA-C2
<i>KIR2DL2</i>	<i>CD158b1</i>	HLA-C1
<i>KIR2DL3</i>	<i>CD158b2</i>	HLA-C1
<i>KIR3DL1</i>	<i>CD158e1</i>	HLA-Bw4
RECEPTORES ACTIVADORES		
<i>KIR2DS1</i>	<i>CD158h</i>	HLA-C2 (débil)
<i>KIR2DS2</i>	<i>CD158j</i>	HLA-C1 (débil)
<i>KIR2DS3</i>	-	Desconocido
<i>NKRP-1</i>	<i>CD161</i>	LLT-1
<i>NKG2D</i>	<i>CD314</i>	MIC-A, MIC-B, ULBPs
<i>NKp46</i>	<i>CD335</i>	?

Tabla 7. Diferentes receptores expresados sobre las células NK y sus correspondientes ligandos.

Por ejemplo, los individuos que expresan alelos HLA-C del grupo 2 y poseen receptores KIR específicos (*KIR2DL1*), presentarán células NK aloreactivas frente a las células del otro individuo que no expresen alelos HLA-C del grupo 2 (homocigotos para el grupo 1 HLA-C). De igual forma, los individuos que expresan alelos HLA-C del grupo 1 y que poseen receptores KIR específicos (*KIR2DL2* y/o *KIR2DL3*), tendrán células NK aloreactivas frente a los individuos que no expresen los alelos HLA-C del grupo 1 (homocigotos para el grupo 2 HLA-C). Del mismo modo, individuos que poseen receptores *KIR3DL1* para alelos HLA-Bw4, presentarán células NK aloreactivas frente a individuos que no expresen HLA-Bw4. Finalmente, las células NK que coexpresan ambos tipos de receptores KIR específicos para los diferentes grupos HLA-C, no presentan fenómenos de aloreactividad frente a individuos que expresan alelos HLA pertenecientes a cualquiera de los grupos (HLA-C1 o HLA-C2) (Becker et al., 2016; Ruggeri et al., 2006).

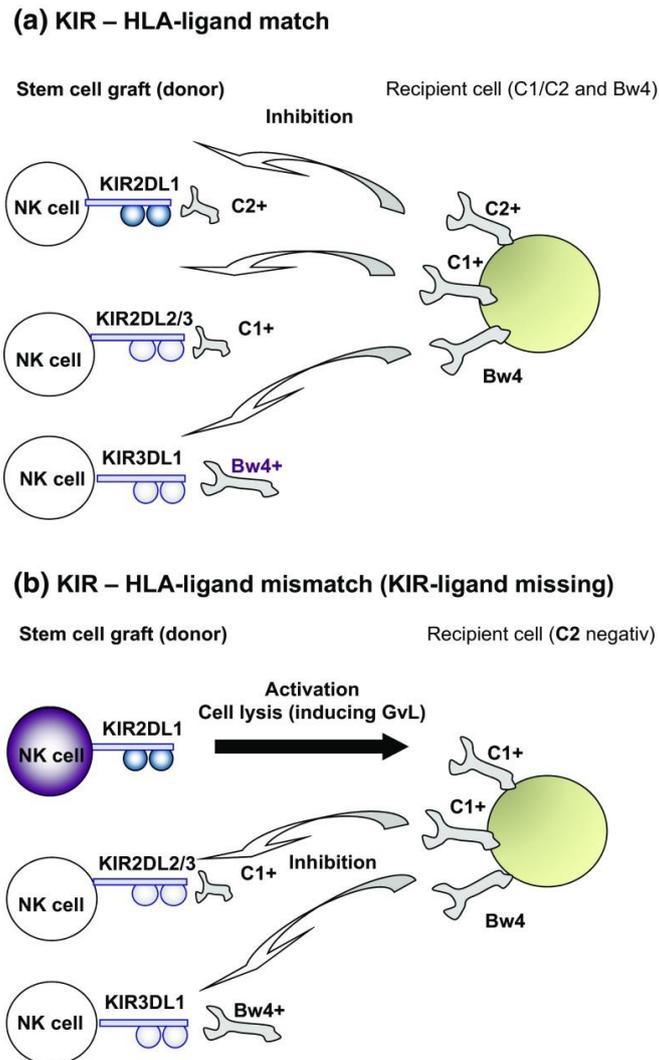


Figura 14. Representación esquemática de la inhibición o activación de las células NK del donante en el alotrasplante a través de la interacción entre sus receptores KIR y los ligandos, HLA-C1, C2 y ligandos Bw4, expresados por la célula tumoral (Becker et al., 2016).

Se ha demostrado que la célula tumoral y/o el microambiente que le rodea contribuyen a suprimir la respuesta mediada por las células del sistema inmunitario. Este mecanismo de "edición inversa" ha sido demostrado en células NK y células T, entre otras; y ha sido ampliamente estudiado en las neoplasias hematológicas. Concretamente, la tolerancia/anergia de las células NK ha sido observada mediante diferentes mecanismos: deficiencias cuantitativas de células NK, disminución de la expresión de receptores activadores, aumento de la expresión de receptores inhibidores, defectos en las vías de señalización y defectos en la producción de citocinas (Farnault et al., 2012). A diferencia de las alteraciones cualitativas que son comunes en diferentes tipos de cáncer, las alteraciones a nivel cuantitativo en las células NK afectan principalmente a las neoplasias hematológicas.

Uno de los mecanismos observados con mayor frecuencia consiste en la disminución en la expresión de receptores activadores. El receptor NKG2D se expresa en células NK, linfocitos T CD8⁺ y linfocitos T γ δ . Los ligandos de NKG2D son moléculas con un dominio α similar a la proteína HLA-I, pero sin la asociación a la β -2m (MIC-A, MIC-B y las proteínas ULBPs); su expresión aumenta en condiciones de estrés, tal y como temperatura elevada, transformación neoplásica o infección viral. La secreción del ligando de NKG2D en su forma soluble al medio extracelular ha sido observada en tumores sólidos y en neoplasias hematológicas, originando una *down*-regulación del receptor NKG2D, y conduciendo finalmente a una citotoxicidad NK reducida (Hilpert et al., 2012). Las células tumorales junto con el microambiente asociado (fibroblastos, macrófagos, CDs y células T) también producen factores solubles inmunosupresores, como la prostaglandina E2, adenosina, TGF- β eIDO, entre otros; que suprimen directamente la maduración, proliferación y funcionalidad celular, alterando así la citotoxicidad de la célula NK mediante la *down*-regulación de los receptores NKG2D, NKp30 y NKp46 (Guillerey et al., 2016). Además, las Treg y las MDSCs, pueden también inhibir la activación y función de las células NK. Destacar que, a pesar de ser una citoquina inmunosupresora, la IL-10 no inhibe la función de las células NK.

Las células malignas acumulan alteraciones genéticas que modulan la expresión de moléculas susceptibles de ser reconocidas por las células efectoras del sistema inmunitario; donde la alteración de las moléculas de HLA representa un evento muy frecuente. En estas circunstancias, la función antitumoral de las células NK cobra particular relevancia, ya que las moléculas que portan en la superficie confieren a las células NK la capacidad de detectar pérdidas en cantidad y/o calidad de las moléculas HLA que expresan las células malignas (Carrega et al., 2009). El aumento en la expresión HLA confiere a la célula tumoral resistencia a la lisis mediada por células NK. Blom y col. observaron en metástasis hepáticas que la célula tumoral expresaba altos niveles de moléculas MHC clase I, y que el agotamiento de las células NK empeoraba el curso de la enfermedad. Además, estos investigadores demostraron en un modelo murino que dichas células estaban implicadas en la progresión del melanoma uveal, y que la mayor expresión de MHC-I encontrada en las metástasis se debía a un proceso de selección basado en la actividad de las células NK, regulada por los receptores inhibidores KIRs, cuyos ligandos son las moléculas HLA-I. Hay que destacar que la propagación del melanoma uveal se realiza a través de la circulación sanguínea (Blom et al., 1997). Este aumento en la expresión de moléculas HLA-I en la superficie tumoral ha sido también descrito en el mieloma múltiple (Carbone et al., 2005). En estos tumores expuestos a un elevado número de células NK, la inmunoedición es llevada a cabo por estos linfocitos citotóxicos. Posteriormente, Demanet y col. observaron una *down*-regulación selectiva de las moléculas HLA-A y HLA-Bw6, asociada con una conservación de la molécula HLA-Bw4 (ligando inhibidor de células NK) en pacientes con LLA y LLC, postulando dicho mecanismo como posible escape simultáneo a la acción de las células T y células NK (Demanet et al., 2004).

En la LMA, la *down*-regulación de los receptores NCR (NKp30/NCR3 y NKp46/NCR1) ha sido asociada con una disminución en la citotoxicidad de las células NK. En esta línea, otros estudios han documentado una *down*-regulación de diversos ligandos NCR; por lo que la combinación de ambos podría ser un potente mecanismo de inmunoevasión (Costello et al., 2002). El receptor NKG2D desempeña un importante papel en la activación de las células NK. Se ha observado que los ligandos de NKG2D, MICA y MICB, son expresados en la mitad de las células leucémicas en pacientes con LMA.

Además, se ha observado *in vitro* que dichas células que expresan MICA, son lisadas por las células NK a través de la interacción con NKG2D, en contraposición a los sujetos control, ya que estos últimos presentaban altos niveles de sMICA, lo que conlleva a la internalización del receptor. Estudios en pacientes con LMC han revelado niveles elevados de sMICA junto con una baja expresión del receptor NKG2D (Groh et al., 2002). Por otro lado, Weiss-Steider y col. demostraron que células leucémicas de pacientes con LMMC producen y secretan MICA y MICB, pero también expresan el receptor NKG2D, por lo que la activación crónica resulta en un agotamiento de las señales de estrés, evitando así la activación de las células NK (Weiss-Steider et al., 2011).

1.9.3.3. LINFOCITOS T CD8⁺ CITOTÓXICOS (CTLs)

Los CTLs son una de las principales células implicadas en la inmunovigilancia tumoral, desde las etapas iniciales hasta estadios avanzados de la enfermedad. Eliminan a las células infectadas por virus y a las células neoplásicas autólogas bajo el contexto de la restricción por MHC. Reconocen péptidos derivados de antígenos tumorales presentados vía HLA-I sobre la célula tumoral a través de sus receptores de membrana (TCR). Tras el reconocimiento, en presencia de moléculas coestimuladoras, se produce la activación y expansión clonal (Townsend et al., 1986).

Actualmente, se conoce que la mayoría de los cánceres humanos son capaces de activar una respuesta celular, vía HLA, y mediar la destrucción específica de las células tumorales mediante la liberación de diversos componentes líticos. El aumento de los CTLs ha sido asociado con un pronóstico favorable en una amplia variedad de cánceres, tales como melanoma, de mama, de ovario, colorectal y pulmón, entre otros; destacando así el papel de éstas células en la respuesta antitumoral. Gracias al descubrimiento de que los CTLs reconocen los antígenos tumorales, se han desarrollado diversas estrategias de inmunoterapia, con el fin de potenciar la respuesta antitumoral, entre ellas: la terapia adoptiva, vacunas con péptidos específicos, IL-2 o INF- γ (Rammensee et al., 2013; Van der Bruggen et al., 1991).

1.9.3.4. CÉLULAS T REGULADORAS (Treg) (CD4⁺ FoxP3⁺ CD25⁺)

Las Treg constituyen una subpoblación de linfocitos T CD4⁺, la cual representa el 1-4% de la celularidad total de linfocitos T CD4⁺ circulantes en humanos. Suprimen la respuesta inmunitaria no sólo frente a autoantígenos, sino también frente a antígenos extraños en el contexto de la inmunotolerancia. Han sido observadas en varios tipos de cánceres, tales como carcinoma de células no pequeñas de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de mama, páncreas y colon, entre otros (Nishikawa and Sakaguchi 2014).

El papel de Treg en el cáncer y en particular en neoplasias hematológicas parece ser relevante al promover la progresión tumoral y suprimir la actividad antitumoral efectiva de las células T efectoras específicas frente al tumor. Actualmente, existen pocos estudios que reflejen el papel de las Treg en las leucemias agudas. En general, su frecuencia y función inmunosupresora aumenta en los pacientes con cáncer en comparación con los sujetos sanos. Sin embargo, la importancia pronóstica de esta subpoblación celular es un tema que actualmente se encuentra en debate (D'Arena et al., 2017).

En 1995, *Sakaguchi* y col. identificaron a las células Treg en ratón como células T CD4⁺ que expresaban la cadena α del receptor de la IL-2 (CD25). Fueron *Baecher-Allan* y col. quienes identificaron un subconjunto muy pequeño de células T con una elevada expresión de CD25 y con función reguladora en humanos (Baecher-Allan et al., 2001). Sin embargo, el marcador CD25 no es exclusivo de las Treg, y se expresa también en linfocitos T efectoras tras activación. Posteriormente, se identificó el factor de transcripción FoxP3, requerido para el desarrollo, mantenimiento y función de las células Treg. Finalmente, se caracterizan por la no expresión del receptor heterodimérico de la IL-7 (CD127) en superficie (Liu et al., 2006).

Las células Treg se caracterizan por expresar bajos niveles de IL-2 y por la expresión constitutiva de CD25; por lo que su proliferación y supervivencia depende principalmente de la IL-2 exógena. Suprimen a las células T efectoras al privarlas de la IL-2; como consecuencia, las células T experimentan apoptosis (Pandiyani et al., 2007). Ejercen su función inmunosupresora a través de las principales citocinas inhibitorias, la IL-10 y el TGF- β . La IL-10 disminuye la expresión de moléculas coestimuladoras en las DCs, lo que induce un estado tolerogénico y suprime los linfocitos T efectoras (Collison et al., 2009). No obstante, algunos estudios revelan que la capacidad reguladora de las Treg es independiente de la IL-10. El TGF- β es una citocina inmunosupresora con propiedades pleiotrópicas. Se expresa en las Treg a nivel de membrana y de forma secretada, y suprime a las células T efectoras y linfocitos T CD8⁺ a través del contacto célula-célula, aunque estos resultados son contradictorios (Green et al., 2003). La actividad citotóxica de las células Treg es mediada a través de perforina y granzima A y B. Se ha observado que las células Treg inducen la apoptosis de las células T efectoras a través de una vía dependiente de TRAIL-DR5 (Ren et al., 2007). Otra interacción de CD95-CD95L (Fas-FasL) también parece jugar un papel en la función supresora de las células Treg, aunque sólo en los linfocitos T CD8⁺ (Strauss et al., 2009).

La regulación de las células T efectoras es llevada a cabo, entre otros mecanismos, por la adenosina. Las células Treg expresan en su superficie las ectonucleasas CD73 y CD39, las cuales degradan el trifosfato de adenosina (ATP) y el difosfato de adenosina (ADP) hasta adenosina (Deaglio et al., 2007). La adenosina se une a los receptores A2A en otro tipo de células o de las mismas Treg. En las células T, reduce la secreción de citocinas proinflamatorias, tales como la IL-12 y TNF- α ; sin embargo, en las CPAs, estimula la producción de la citocina antiinflamatoria, IL-10 (Deaglio et al., 2007). El hecho de que las células Treg respondan también a la adenosina implica que esta molécula actúa como factor autocrino en la optimización de la respuesta antiinflamatoria.

Por otro lado, la molécula CTLA-4 es expresada por las Tregs. Por una parte, se une a las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 presentes en las CPAs, y por otro, a la molécula CD28, presente en los linfocitos T vírgenes, induciendo la señal coestimuladora necesaria para su activación y proliferación. Sin embargo, se ha observado que CTLA-4 presenta una mayor afinidad por CD80 y CD86, en comparación con CD28. Esto origina la inhibición de la señal coestimuladora y la inhibición de los linfocitos T efectoras a través de las CPAs (Wing et al., 2008).

1.9.3.5. CÉLULAS T HELPER (Th1, Th17, Th22)

Las células T helper o colaboradoras (Th) juegan un papel importante en el desarrollo y la progresión de las enfermedades autoinmunes y en los tumores. Las células Th1 han sido relacionadas con procesos inflamatorios autoinmunes, secretan IL-2, TNF- β , grandes cantidades de IFN- γ y promueven la respuesta inmunitaria celular. Se sabe que el equilibrio Th1/Th2 está alterado en muchas enfermedades autoinmunes. La respuesta Th1 prevalece en la artritis reumatoide y en la púrpura trombocitopénica idiopática; mientras que respuestas Th2 prevalece en el Lupus Eritematoso Sistémico. En las neoplasias hematológicas, el equilibrio Th1/Th2 se polarizó hacia Th2, como ha sido observado en el DLBCL y en la LLA (Mori et al., 2001; Zhang et al., 2000).

Las células Th17 y Th22 han sido recientemente descritas, presentando funciones en las respuestas inmunitarias periféricas. Las células Th17 secretan la IL-17, una citoquina altamente proinflamatoria; mientras que las células Th22 expresan la IL-22. Estudios recientes han observado un papel de las células Th17 en la patogénesis de varias enfermedades autoinmunes, tumores sólidos en humanos, como la enfermedad de Crohn, cáncer gástrico, cáncer de pulmón y en las neoplasias hematológicas, como mieloma múltiple, LLC, LMA y Linfoma no Hodgkin; aunque actualmente, el papel de las células Th17 es controvertido (Tesmer et al., 2008). Por otro lado, estudios recientes han implicado el papel de Th22 e IL-22 en la patogénesis de una variedad de tumores sólidos y en un número limitado de neoplasias hematológicas que incluyen LMA y LLA, donde han sido relacionadas con la progresión de la enfermedad.

1.9.3.6. LINFOCITOS T CON EXPRESIÓN DE CD39

CD39 es una proteína integral de membrana, con actividad ectonucleasa, que fosfohidroliza el ATP, y de manera menos efectiva el ADP, dependiente de Ca^{2+} y Mg^{2+} , para producir AMP, en coordinación con CD73, el cual defosforila el AMP extracelular para producir finalmente adenosina (Antonioli et al., 2013). El ATP extracelular funciona como indicador de daño tisular, activando al sistema inmunitario. El ATP induce la quimiotaxis y la maduración de las células dendríticas, así como la secreción de IL-1 por monocitos, la apoptosis de células Treg y la proliferación de células Th17 (Bours et al., 2006); mientras que el AMP y la adenosina presentan funciones inmunosupresoras, inhibiendo la secreción de citoquinas inflamatorias y desensibilizando los receptores de quimiocinas.

En humanos, la molécula CD39 se expresa de forma constitutiva en el bazo, timo, pulmón y placenta; y asociándose principalmente con células endoteliales y células del sistema inmunitario, tales como células B, NKs, CDs, células de Langerhans, monocitos, macrófagos, neutrófilos y células T. La inducción de CD39 es promovida por citoquinas pro-inflamatorias, estrés oxidativo e hipoxia celular. La expresión de CD39 está aumentada en muchos tumores sólidos, al igual que en leucemias linfocíticas crónicas; sugiriendo un papel en el desarrollo y progresión de la enfermedad (Perry et al., 2012). Un incremento de la concentración de adenosina origina un efecto inhibitorio como mecanismo de retroalimentación negativa para evitar el daño excesivo del tejido como consecuencia de una respuesta inmunitaria prolongada.

La adenosina inhibe las funciones efectoras de los linfocitos T y células NK (Häusler et al., 2011), y contribuye también a la resistencia al tratamiento, como ha sido observado en pacientes con LLC, protegiendo a las células tumorales frente a la apoptosis inducida por los agentes quimioterapéuticos (Serra et al., 2011).

Dentro del conjunto de células T, el marcador CD39 se expresa principalmente en los linfocitos T CD4⁺ (20–30% en SP), y predominantemente, en células Treg. Sin embargo, existen otras células T CD4⁺ en humanos que expresan también CD39, como las células T efectoras de memoria (Antonioli et al., 2013).

CD39 también se expresa de forma constitutiva en linfocitos T CD8⁺ (<5% en SP), y se ha asociado como un marcador de células T CD8 exhaustas en modelos murinos de cáncer y en pacientes con cáncer de mama y melanoma, bajo un estado de inflamación crónica. Recientemente, se ha observado también en pacientes con infecciones virales crónicas, y que, además, coexpresaban PD-1 (Canale et al., 2018).

1.9.4. OTROS MECANISMOS QUE CONTRIBUYEN A LA INMUNOSUPRESIÓN

1.9.4.1. VÍA PD-1/ PD-L1

El receptor inhibitorio PD-1, CD279, es un receptor co-estimulador inhibitorio que se expresa en timocitos CD4⁻ CD8⁻ y su expresión se induce en células T CD4⁺ y CD8⁺ periféricas, células B, monocitos, células NK, NKT, y algunas DCs (Keir et al., 2008). La expresión persistente de PD-1 en las células T induce su agotamiento, perdiendo su función efectora; siendo incapaces de segregar moléculas citolíticas, como perforinas y granzimas, y citoquinas pro-inflamatorias, tales como la IL-2, IFN- γ y TNF- α (Wherry 2011).

Las células Treg, críticas en el mantenimiento de la tolerancia y la atenuación de la respuesta inmunitaria, expresan PD-1. La unión de éste a PD-L1 en las células CD4 *naive*, en presencia de TGF- β , origina la conversión hacia Treg. Por lo que la ruta de activación de PD-1 conlleva una reducción de la función efectora de células T, junto con un aumento de la función inmunosupresora Treg.

PD-1 presenta dos ligandos, PD-L1 (CD274) (Freeman et al., 2000) y PD-L2 (CD273) (Latchman et al., 2001), con distintos patrones de expresión celular. PD-L1 se induce en células hematopoyéticas y no hematopoyéticas, previa estimulación celular. Citoquinas como IFN- γ y TNF- α aumentan la expresión de PD-L1 en células T, células B, células endoteliales y células epiteliales, jugando un papel en el mantenimiento de la tolerancia periférica, y también se ha observado en células tumorales. Datos recientes demuestran que PD-L1 se une a B7-1 (CD80) además de PD-1 (Keir et al., 2008). La expresión de PD-L2 es inducible y está restringida a DCs, macrófagos, mastocitos y algunas células B en respuesta a IL-4 e IFN. La afinidad de PD-L2 hacia PD-1 es tres veces superior a la de PD-L1.

La expresión persistente de PD-1 sobre las células T conlleva a su agotamiento y a la disminución de su función efectora (Wherry 2011). Este fenotipo se ha observado en linfocitos del infiltrado tumoral y se ha vinculado a un mal pronóstico y recidiva tumoral. De forma similar, PD-L1 y PD-L2 también son utilizados como factores pronóstico en algunos tumores humanos. Algunos estudios asocian la elevada expresión de PD-L1 con el tamaño tumoral, afectación ganglionar y SG, mientras que PD-L2 sólo ha sido asociado con una disminución de la supervivencia.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La progresión clínica de un proceso tumoral se ve condicionada por diversos factores, algunos intrínsecos a la biología del propio tumor y otros, relacionados con el microambiente donde éste se desarrolla. Las variaciones genéticas que pueden conducir a la transformación celular y a su malignización, se traducen en un fenotipo distintivo, un patrón de alteraciones genéticas específicas y una capacidad proliferativa y apoptótica definida. Actualmente, se conoce que algunas mutaciones somáticas contribuyen a la progresión a LMA; sin embargo, esto no explica la evolución en todos los pacientes. Existen suficientes indicios que indican que, con independencia de que la mutagénesis y/o los cambios epigenéticos dirijan el proceso de transformación neoplásica, deben de ocurrir también alteraciones en la respuesta inmunitaria que provocarían el escape inmunológico, la expansión de la clona maligna y la progresión de la enfermedad.

Por tanto, se establece como **hipótesis general** del estudio que, tanto los cambios genéticos en la célula neoplásica como en el microambiente inmunitario, constituyen factores críticos para la progresión tumoral.

En esta línea, la investigación de los diferentes mecanismos inmunológicos que subyacen a la fisiopatología del SMD contribuye a la identificación de aquellos individuos con mayor susceptibilidad de transformación leucémica y, por tanto, constituirían un factor predictivo de respuesta hematológica, evolución clínica y supervivencia de los pacientes.

2.2. OBJETIVOS

El **objetivo general** de la tesis doctoral consiste en la identificación de distintos mecanismos de escape tumoral que incidan en la transformación y evolución del SMD, y que afectarían a las características inmunogénicas de la célula neoplásica, como a la formación de un microambiente tumoral desfavorable que inhibiría el desarrollo de una respuesta inmunitaria antitumoral efectiva.

Con este fin, se detallan los siguientes **objetivos específicos**:

2.2.1. Análisis inmunofenotípico y caracterización funcional de las poblaciones leucocitarias y subpoblaciones linfocitarias T y NK en el microambiente medular y en sangre periférica de pacientes con SMD.

2.2.2. Evaluación del impacto de la respuesta inmunitaria en la progresión de la enfermedad: su posible relación con la blastosis y transformación a LMA, con los diferentes subtipos diagnósticos de SMD (clasificación OMS 2017), con la estratificación pronóstica según los *scores* IPSS e IPSS-R, y con el riesgo citogenético.

2.2.2. Caracterización de alteraciones genéticas que conducen a la expresión de fenotipos anómalos HLA-I en la célula tumoral CD34⁺ y que pudieran representar mecanismos de escape inmunitario al control de células T y células NK; así como posible impacto en la respuesta clínica y la progresión de la enfermedad.

2.2.3. Estudio de marcadores genéticos asociados a SMD mediante secuenciación de última generación (NGS), su relevancia en la progresión de la enfermedad y su posible impacto sobre el microambiente inmunitario y/o inmunogenicidad del clon tumoral.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. GRUPO DE ESTUDIO

El estudio cuenta con un total de 246 pacientes diagnosticados en el periodo comprendido entre diciembre 2016 y noviembre 2018; pertenecientes principalmente a la región de Granada y de forma minoritaria, a otros centros andaluces que han participado de forma activa en el estudio. Los pacientes con SMD (n=194) forman parte del Registro Español de SMD (RESMD) y han sido clasificados de acuerdo con la reciente revisión OMS-2017: 166 pacientes fueron clasificados de SMD primario (media de edad 72 años, 45-95 años) y 28 pacientes fueron clasificados de LMAs (media de edad 74 años, 62-85 años).

Aunque el objetivo principal del estudio actual se centra en el SMD y posterior transformación leucémica, de forma adicional se han incluido 32 pacientes diagnosticados de LMMC (media de edad 75 años, 58-90 años) y 20 pacientes con LMA *de novo* (media de edad 68 años, 57-82 años).

Los pacientes diagnosticados de SMD fueron clasificados según criterios de la OMS 2017, tal y como sigue: SMD con displasia Unilínaje (SMD-DU), SMD con displasia Multilínaje (SMD-DM); SMD con sideroblastos en anillo (SMD-SA) (SMD-DU/DM-SA); SMD con delección aislada 5q (SMD del(5q)), SMD no clasificable (SMD-U), SMD con exceso de blastos 1 (SMD EB-1) y SMD con exceso de blastos 2 (SMD EB-2). Además, los pacientes con SMD fueron clasificados según *scores* pronósticos IPSS, IPSS-R y riesgo citogenético; y perfil mutacional.

Las muestras tanto de aspirado medular como de SP de los pacientes se obtuvieron en el momento del diagnóstico. Las muestras de aspirado medular fueron extraídas por punción directa a nivel del esternón o cresta ilíaca, por facultativos de Hematología, en tubos de EDTA. Las muestras de SP fueron recogidas en la sala de extracciones, hospital de día o planta por el personal de enfermería, en tubos de EDTA. Ambas fueron remitidas al Laboratorio Clínico (Hematología, Inmunología HUVN) para su procesamiento. Así mismo, las muestras de SP del grupo control fueron obtenidas en los correspondientes análisis rutinarios durante los primeros meses del estudio.

El estudio fue aprobado por el comité ético de la investigación del Hospital Virgen de las Nieves de Granada, tras consentimiento escrito informado de acuerdo con la Declaración de Helsinki, garantizando siempre el anonimato de los pacientes. Las características clínicas del grupo de estudio se muestran en la **Tabla 10**.

Como controles se utilizaron muestras de SP procedentes de 40 individuos sanos (media de edad 70 años, rango 50-91 años), para los que no existía antecedentes de enfermedades neoplásicas conocidas, exposición previa a fármacos quimioterápicos, radioterapia o inmunoterapia, incluida terapia actual con corticoides.

3.2. ESTUDIO IMMUNOFENOTÍPICO DEL MICROAMBIENTE TUMORAL

3.2.1. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

La caracterización fenotípica del microambiente tumoral se llevó a cabo, de forma independiente, en muestras de MO y SP. Tras la recepción y etiquetado de las mismas, la caracterización de los diferentes marcadores de superficie se realizó mediante inmunofluorescencia directa utilizando AcMo, conjugados con diferentes fluorocromos (*Tabla 8*).

Para ello, se adicionó 5 μ L de cada AcMo en cada uno de los tubos según el panel (salvo cuando se especifique otra cantidad) y posteriormente, se adicionó 50 μ L de la muestra a estudiar. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 20 min y posteriormente se añadió 2 mL de la solución de lisado (FACS *Lysing Solution*, *Becton-Dickinson Biosciences*) durante 10 min. Tras centrifugación y lavado con PBS, se añadió 300 μ L de FACS *Lysing Solution* y se adquirió inmediatamente.

TUBO	FITC	PE	PER	APC	PE-Cy7	APC-H7	V450	V500
1*	CXCR3	CCR6	CCR10 (0.5 μ l)	-	-	-	CD4	CD45
2*	-	CD39	CD127	CD25	CD8	CD4	-	CD45
3*	-	-	CD34 (2.5 μ l)	CD279 **	CD274**	CD8	CD3	CD45
4*	CD16	CD56	NKG2D	CD161	NKp46	CD3	CD20	CD45
5	KIR2DL1	KIR2DL1/S1	KIR2DL2/L3/S2 (1 μ l)	KIR2DL3	CD56	-	CD3	CD45
6	CD14	CD64	-	-	-	-	DR	CD45
7	LIN-1	CD11b	-	CD33	CD15	-	DR	CD45
8	CD11b	CD13	CD34	HLA	CD117	-	CD3	CD45

Tabla 8. Panel de estudio de inmunofenotipo para la caracterización de los diferentes marcadores de superficie. La base molecular de la técnica aprovecha la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo para después definir el perfil fenotípico. La cantidad de cada uno de los AcMo añadidos por 50 μ l de muestra fue de 5 μ l, excepto donde se indican otras cantidades.

* Linfocitos definidos en ventana FSC/SSC (tamaño y complejidad). Para el análisis, se adquirieron un total 70,000 eventos en la región linfocitaria. ** CD279, se corresponde con el marcador PD1, mientras que CD274 se corresponde con el marcador PD-L1.

La adquisición de las muestras fue llevada a cabo mediante el citómetro FACS Canto-II (Becton Dickinson, Nueva Jersey, USA). Se generaron plantillas (*templates*) de adquisición en Diva software (*Becton-Dickinson*®) para cada uno de los tubos. Se diseñaron *dot-plots* (gráficos de puntos, bidimensionales) en los cuáles se crearon las ventanas (*gates*) para su adquisición. Para el análisis de las muestras, se adquirieron un total de 200.000-250.000 eventos y 40.000-70.000 eventos dentro de la región linfocitaria.

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el software Infinicyt, versión 10.0 (Cytognos). Los paneles de estudio fueron predefinidos e indican los tubos diseñados con las combinaciones y cantidades de AcMo para el estudio de MO y SP (*Tabla 8*). A continuación, se detallan las características de cada uno de los AcMo utilizados en el estudio (*Tabla 9*).

	FLUOROCROMO	CLON	FABRICANTE	REFERENCIA
<i>CD45</i>	V500	2D1	BD	655873
<i>CD3</i>	APC-H7	SK7	BD	641415
<i>CD3</i>	V450	UCHT1	BD	560365
<i>CD4</i>	V450	SK3	BD	651849
<i>CD4</i>	APC-H7	SK3	BD	641398
<i>CD8</i>	APC-H7	SK1	BD	641400
<i>CD8</i>	PE-CY7	SK1	BD	335787
<i>CD20</i>	V450	L27	BD	655872
<i>CD56</i>	PE-Cy7	NCAM16.2	BD	335826
<i>CD56</i>	PE	NCAM16.2	BD	345812
<i>CD16</i>	FITC	3G8	BD	555406
<i>CD39</i>	PE	TU66	BD	555464
<i>T Cell Cocktail</i>	<i>CD4 FITC</i>	SK3	BD	560249
	<i>CD25 PE-CY7</i>	2A3		
	<i>CD127 APC</i>	hIL-7R-M21		
<i>CXCR3</i>	FITC	1C8	BD	561730
<i>CCR6</i>	PE	11A9	BD	561019
<i>CCR10</i>	PercP-Cy5.5	1B5	BD	564772
<i>NKG2D</i>	PercP-Cy5.5	1D11	BD	562364
<i>NKp46</i>	PE-Cy7	9E2	BD	562101
<i>Human Lineage Cocktail 1 (LIN 1)</i>	<i>CD3 FITC</i>	SK7	BD	340546
	<i>CD16 FITC</i>	3G8		
	<i>CD19 FITC</i>	SJ25C1		
	<i>CD20 FITC</i>	L27		
	<i>CD14 FITC</i>	MφP9		
	<i>CD56 FITC</i>	NCAM16.2		
<i>HLA-DR</i>	V450	L243	BD	642276
<i>CD33</i>	APC	P67.6	BD	345800

	FLUOROCROMO	CLON	FABRICANTE	REFERENCIA
<i>CD11b</i>	PE	ICRF44	BD	555388
<i>CD11b</i>	<i>FITC</i>	M5E2	BD	562793
<i>CD13</i>	PE	L138	BD	347406
<i>CD15</i>	PE-Cy7	HI98	BD	560827
<i>CD117</i>	PE-Cy7	104D2	BD	339217
<i>CD161</i>	APC	DX12	BD	561729
<i>CD14</i>	FITC	M5E2	BD	555397
<i>KIR2DL1/S1</i>	PE	EB6.B	BC	A09778
<i>KIR2DL1</i>	FITC	143211	RyD	FAB1844F
<i>KIR2DL2/S2/L3</i>	PercP-Cy5.5	GL183	BC	A66900
<i>KIR2DL3</i>	APC	180701	RyD	FAB2014A
<i>CD103</i>	FITC	Ber-ACT8	BD	561677
<i>CD137</i>	PE	C65-485	BD	559446
<i>CD34</i>	PE-Cy5	581	BD	561819
<i>CD274</i>	PE-Cy7	M1H1	BD	558017
<i>CD279</i>	APC	M1H4	BD	558694
<i>HLA</i>	APC	W6/32	eBioscience	17-9983-42

Tabla 9. AcMo utilizados en citometría de Flujo Multiparamétrica. * BD: Beckton Dickinson, RyD: RyD Systems, BC: Beckman Coulter

3.2.2. ANÁLISIS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO MULTIPARAMÉTRICA

La citometría de flujo se ha convertido en una de las metodologías principales que permiten caracterizar el microambiente tumoral gracias a la expresión celular de ciertos marcadores de superficie y/o intracelulares, habitualmente empleados en el estudio de maduración y desarrollo de los diferentes linajes hematopoyéticos. A continuación, se detalla cada una de las ventanas utilizadas para el análisis, con las regiones necesarias para llevar a cabo el análisis porcentual de las distintas poblaciones.

3.2.2.1. Caracterización de linfocitos T helper (Th)

La caracterización de los linfocitos Th (Th1, Th17 y Th22) se llevó a cabo sobre la población celular T CD4⁺, gracias a la expresión de los marcadores de superficie: CCR10, CCR6 y

CXCR3. Las diferentes subpoblaciones de células T CD4⁺ se definen como: células Th1 (CXCR3⁺), células Th17 (CCR6⁺/CCR10⁻) y células Th22 (CCR6⁺/CCR10⁺) (**Figura 15**).

En primer lugar, sobre el plot que enfrenta SSC-A (complejidad celular) frente a CD45 (antígeno pan-leucocitario), se seleccionó la población linfocitaria y posteriormente, se seleccionaron aquellos linfocitos T con expresión positiva para el marcador CD4. Seguidamente, y sobre el total de la población celular CD4, se analizó la expresión de los diferentes marcadores, anteriormente citados para cada una de las subpoblaciones T.

La caracterización de las células Th22 se realizó, en primer lugar, en el diagrama que enfrenta a los marcadores CCR10 vs. CXCR3, seleccionando aquellas con fenotipo CCR10⁺, CXCR3⁻. Posteriormente, sobre este conjunto celular, en un segundo diagrama se enfrentó los marcadores CCR6 y CXCR3, seleccionando aquellas CCR6⁺. Una vez seleccionadas la subpoblación Th22, las células Th1 y Th17 se seleccionaron en el plot que enfrenta a los marcadores CCR6 vs. CXCR3, siendo las Th1 CXCR3⁺/CCR6⁻, y las Th17 CXCR3⁻/CCR6⁺.

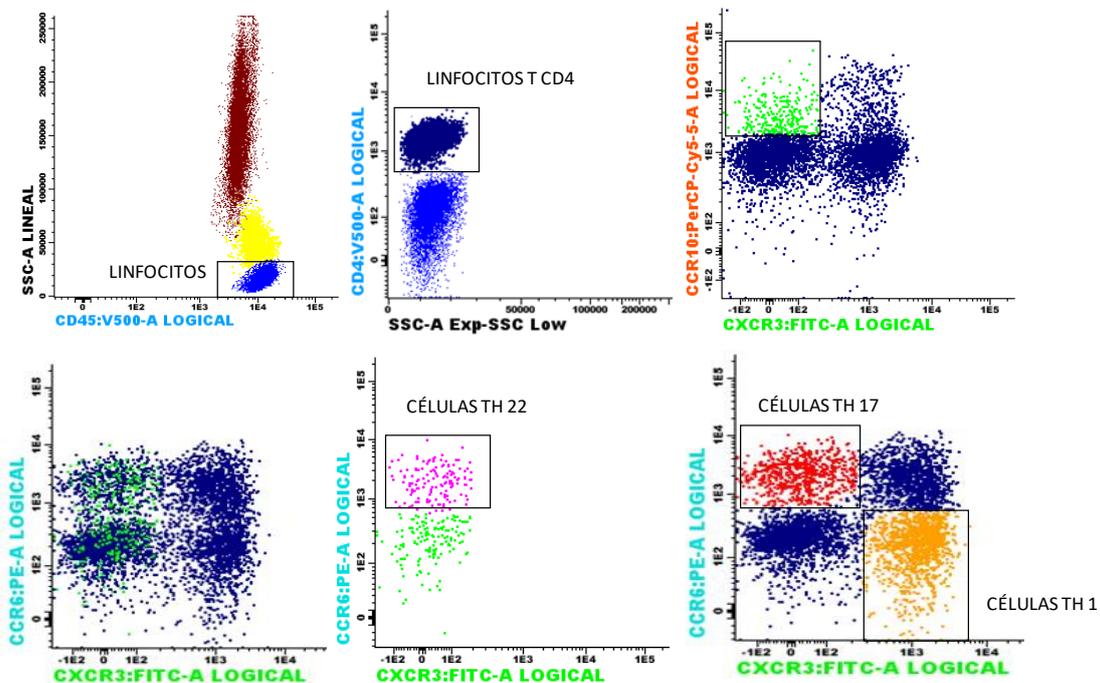


Figura 15. Tubo-1: diseño para analizar las diferentes subpoblaciones de linfocitos T-CD4⁺ helper.

3.2.2.2. Caracterización de linfocitos T reguladores (Treg)

En primer lugar, sobre el plot que enfrenta SSC-A frente a CD45, se seleccionó la población linfocitaria y posteriormente, se seleccionaron aquellos linfocitos T con expresión positiva para el marcador CD4. Seguidamente, sobre el total de la población celular CD4, se seleccionaron aquellas con fenotipo CD25⁺ y CD127⁻ (**Figura 16**).

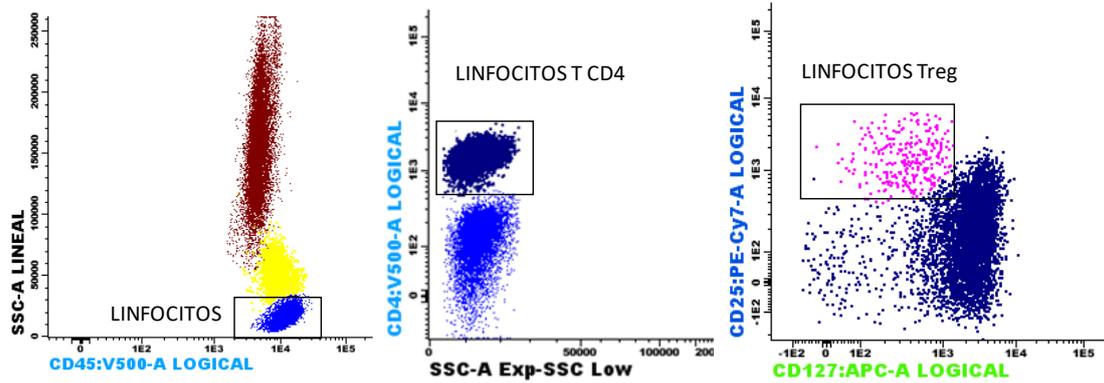


Figura 16. Tubo-2: diseñado para el análisis de los linfocitos T-reguladores con fenotipo $CD4^+ CD25^+ CD127^-$.

3.2.2.3. Análisis de la expresión del receptor CD39 sobre células T

Tras selección de la población linfocitaria en el plot que enfrenta SSC-A frente a CD45, se seleccionaron en plots independientes los linfocitos T $CD4^+$ y los linfocitos T $CD8^+$; y a continuación, sobre cada una de estas subpoblaciones celulares, se analizó la expresión del marcador CD39 (Figura 17).

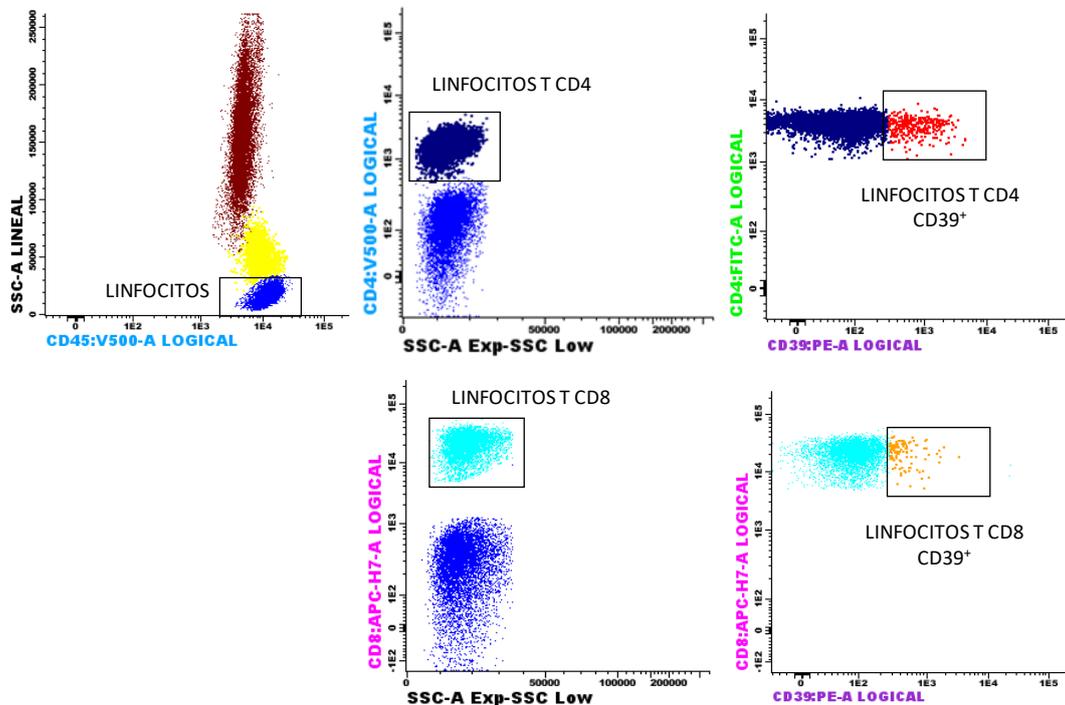


Figura 17. Tubo-2: diseñado para analizar la expresión del marcador CD39 sobre células T- $CD4^+$ y T- $CD8^+$.

3.2.2.4. Análisis de la expresión de PD-1 sobre linfocitos T

A continuación, se analizó la expresión del marcador PD-1 (CD279) sobre linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Tras selección de la población linfocitaria sobre el plot que enfrenta SSC-A frente a CD45, se seleccionaron los linfocitos T CD3⁺ y posteriormente, sobre dicha población celular, se seleccionaron aquellos con expresión positiva para cada uno de los marcadores: CD4 y, paralelamente, CD8. Finalmente, la expresión del marcador PD-1 se llevó a cabo sobre ambos tipos celulares (*Figura 18*).

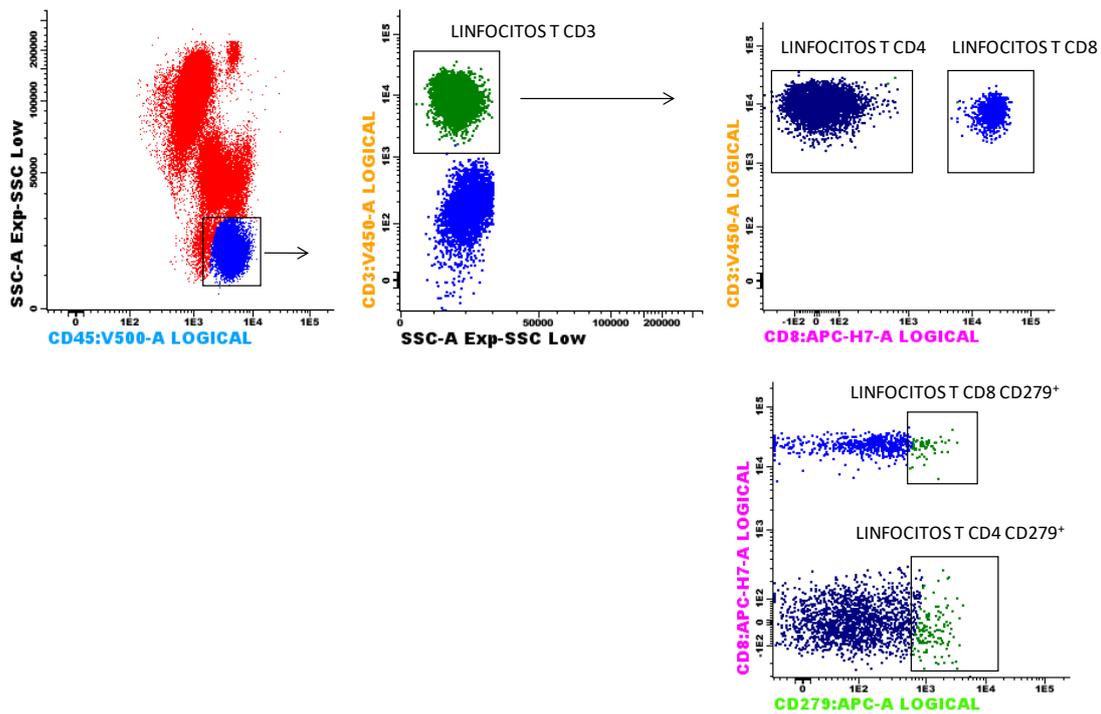


Figura 18. Tubo-3: diseñado para analizar la expresión del receptor PD-1 sobre linfocitos T CD3⁺ CD4⁺ y CD3⁺ CD8⁺.

3.2.2.5. Caracterización de las diferentes poblaciones de células Natural Killer (NKs)

Tras selección de la población linfocitaria y previa eliminación de las células T CD3⁺ y linfocitos B CD20⁺, las diferentes subpoblaciones de células NK se identificaron en base a la expresión de dos marcadores de superficie: la molécula de adhesión CD56 y el receptor activador CD16. Seguidamente, se eliminaron aquellas células NK doble negativas para estos marcadores, identificando finalmente cuatro subgrupos: CD56^{Bright}CD16^(dim/-) (principales productoras de citoquinas), CD56⁺CD16⁺ (principales efectoras citotóxicas), CD56⁺CD16⁻ y CD56⁻CD16^{Bright} (*Figura 19*).

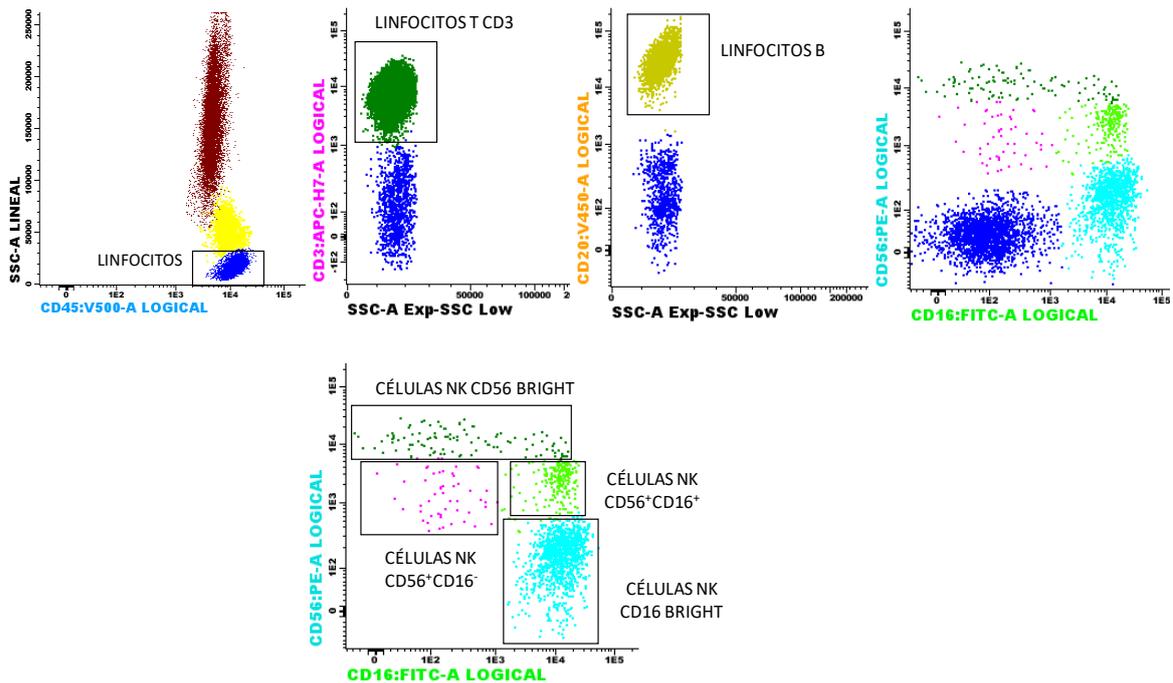


Figura 19. Tubo-4: caracterización de las diferentes subpoblaciones de células NK en base a la expresión de los marcadores de superficie CD56 y CD16.

3.2.2.6. Análisis de la expresión de los receptores activadores NKG2D, NKp46 y CD161 sobre células NK.

En el mismo tubo 4 anterior, se analizó también la expresión de diversos receptores activadores sobre células NK. Para ello, tras previa selección de la población linfocitaria en el plot SSC-A vs. CD45 y posterior eliminación de las células T CD3⁺ y los linfocitos B CD20⁺, se seleccionaron las células NK CD56⁺. Posteriormente, sobre este conjunto celular, se analizó, de forma independiente, la expresión de los diferentes marcadores activadores estudiados: NKG2D, NKp46 y CD161 (*Figura 20*). Como control negativo se utilizó la población linfocitaria B.

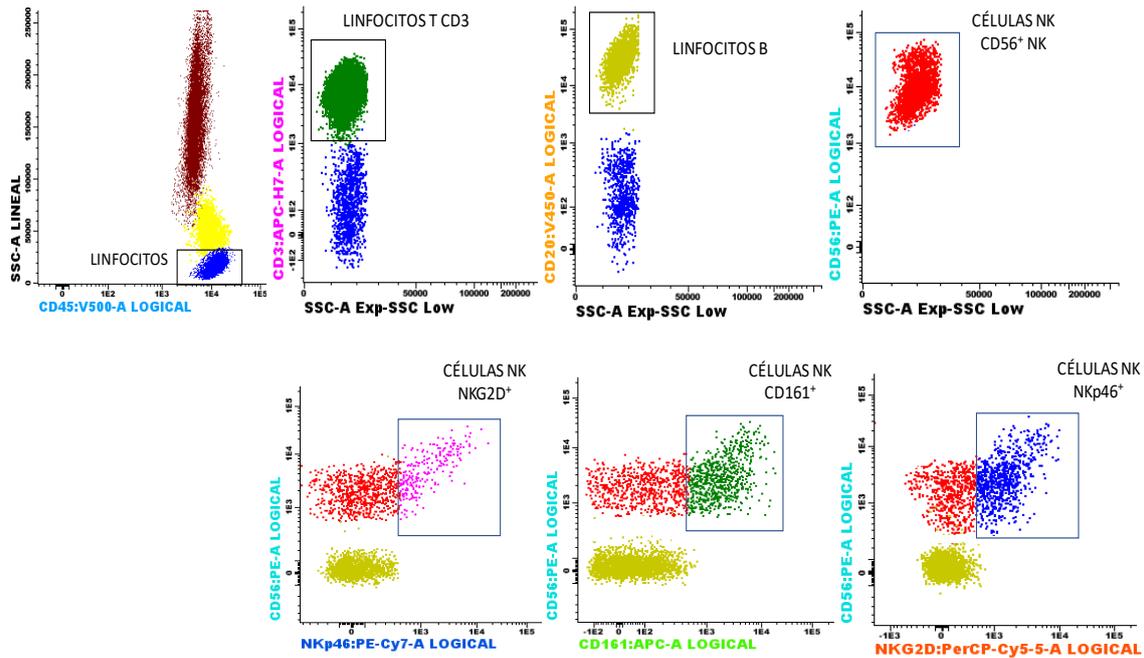


Figura 20. Tubo-4: diseñado para analizar la expresión de receptores *NKG2D*, *Nkp46* y *CD161* en células NK $CD3^+CD56^+$.

3.2.2.7. Análisis de la expresión de receptores *KIR* sobre células NK

A continuación, sobre el total de células NK $CD56^+$, se analizó la expresión de los diferentes receptores *KIR*: receptores *KIR* activadores (*KIR2DS1*, *KIR2DS2*) e *KIR* inhibidores (*KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*) (Figura 21).

En primer lugar, tras previa eliminación de la población linfocitaria y los linfocitos T $CD3^+$, se seleccionaron las células $CD56^+$. A continuación, sobre el diagrama en el que se enfrentan los receptores *KIR2DL1* vs. *KIR2DL1/S1*, se identificaron las subpoblaciones de células NK con fenotipo $KIR2DL1^+$, $KIR2DS1^+$ y $KIR2DL1^+S1^+$. De igual forma, mediante el plot en el que se representan los receptores *KIR2DL2/L3/S2* vs. *KIR2DL3*, se seleccionaron aquellas subpoblaciones de células NK con fenotipo: $KIR2DL2^+S2^+$ y $KIR2DL3^+$.

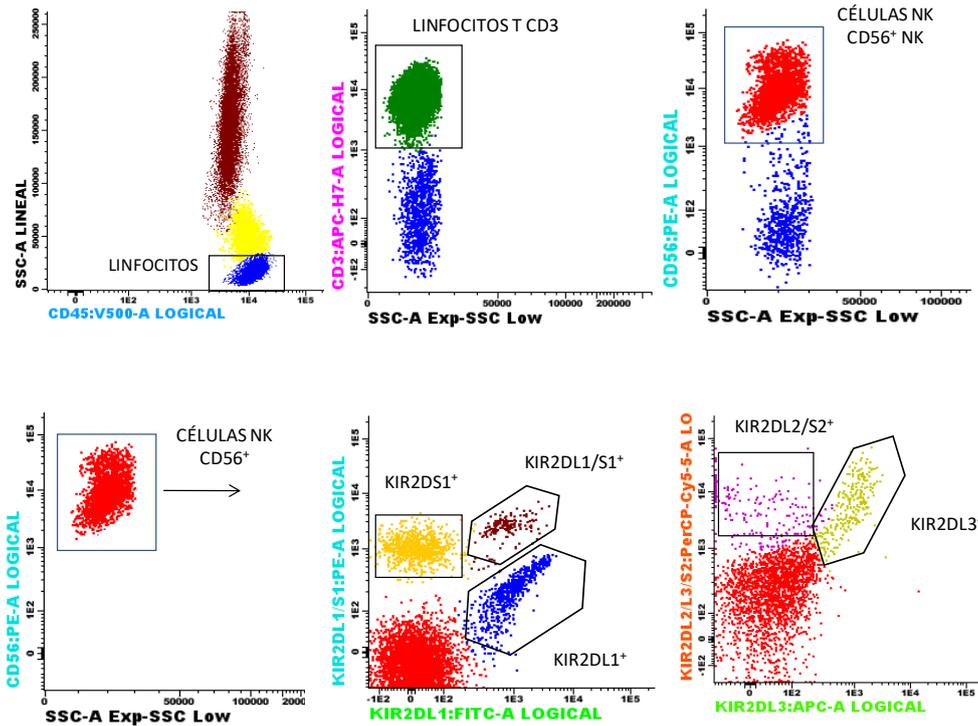


Figura 21. Tubo-5: caracterización de la expresión de los diferentes receptores KIR (*KIR2DL1*, *KIR2DS1*, *KIR2DL2*, *KIR2DS2* y *KIR2DL3*) sobre células NK $CD3^+CD56^+$.

3.2.2.8. Caracterización de las células mieloides supresoras (MDSCs)

Las MDSCs se definen como: $HLA-DR^{low/-}/CD33^+/CD11b^+$. Éstas se dividen en dos poblaciones celulares: Mo-MDSC ($CD14^+$) y PMN-MDSC ($CD15^+$).

Para la caracterización de las células Mo-MDSC, en primer lugar, se seleccionaron las poblaciones leucocitarias; y posteriormente, sobre la población monocítica $CD14^+$ y posterior eliminación de los promonocitos (gráfico $CD64$ vs. $CD14$), se seleccionaron aquellas células con expresión negativa del receptor $HLA-DR$, utilizando como control negativo la serie mielóide madura (Figura 22).

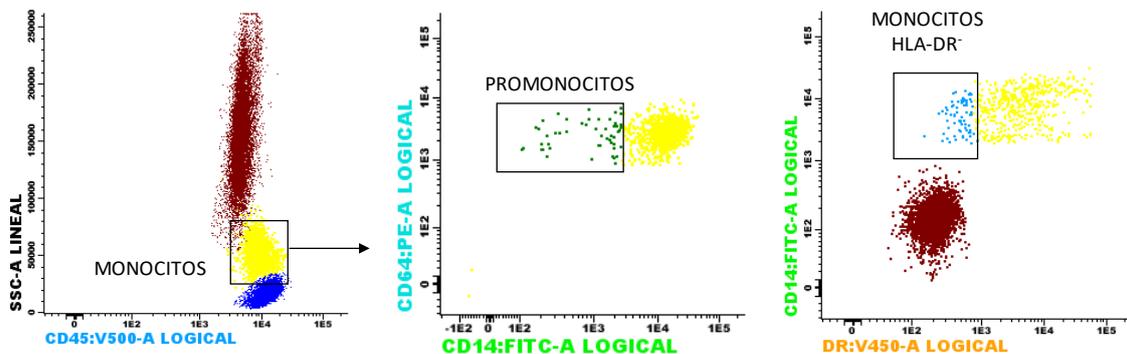


Figura 22. Tubo-6: Caracterización de la población de células Mo-MDSC.

Por otro lado, la caracterización de las células PMN-MDSC, se llevó a cabo sobre la celularidad total. Se identificaron aquellas células $\text{Lin}^- \text{HLA-DR}^{\text{low/-}}$ y posteriormente, tras eliminación de los eosinófilos mediante el diagrama SSC-A frente CD45, se seleccionaron aquellas con expresión simultánea para los antígenos CD33 y CD11b. Finalmente, sobre dicha selección, se identificaron las células con expresión positiva para el marcador CD15 (*Figura 23*).

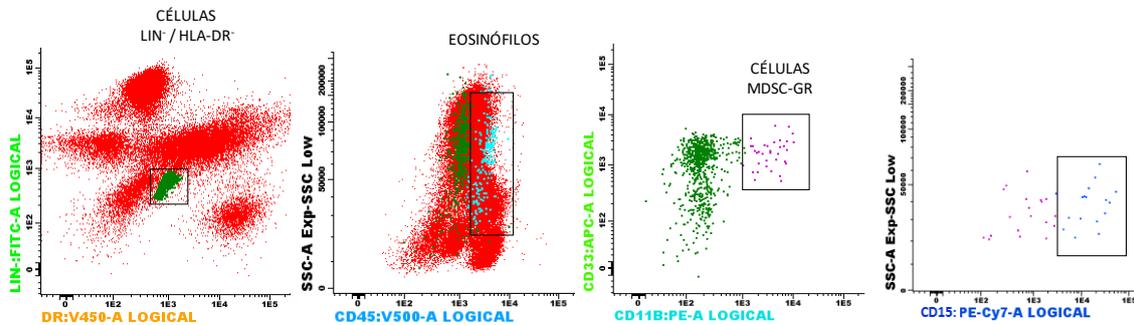


Figura 23. Tubo-7: Caracterización de la población de células PMN-MDSC.

3.2.2.9. Análisis de la expresión de moléculas HLA-I y ligandos PD-L1 sobre la célula tumoral CD34⁺

Con el fin de estudiar las características inmunogénicas de la célula tumoral, se llevó a cabo un análisis de los niveles de expresión de dos de los principales mecanismos de inmunoevasión: moléculas HLA-I y la expresión de ligandos PD-L1.

Para calcular la intensidad de expresión de una molécula sobre una población celular determinada se utilizó el parámetro Intensidad Media de Fluorescencia (IMF), el cual es proporcional al número de moléculas detectadas sobre la superficie celular. La determinación de los niveles de la IMF de moléculas HLA-I clásicas (HLA-A, -B y -C) se llevó a cabo sobre la población celular CD34⁺ y durante el proceso de diferenciación mieloide; y paralelamente, el estudio se realizó sobre la población celular autóloga T CD3⁺, usando el AcMo monomérico W6/32.

Para ello, sobre la celularidad total CD45⁺, se seleccionaron en dos plots independientes los blastos CD34⁺ y los linfocitos T CD3⁺ de pacientes con SMD y/o LMAs (*Figura 24, Apartado A*) A continuación, en base a la expresión de los marcadores CD13 y CD11b, se establecieron varios estadios de diferenciación de la serie granulocítica, representados como: estadio I, estadio II, estadio III y estadio IV. Finalmente, se recogieron los valores de la IMF del marcador HLA-I sobre cada uno de las poblaciones celulares anteriormente seleccionadas (*Figura 24, Apartado B*).

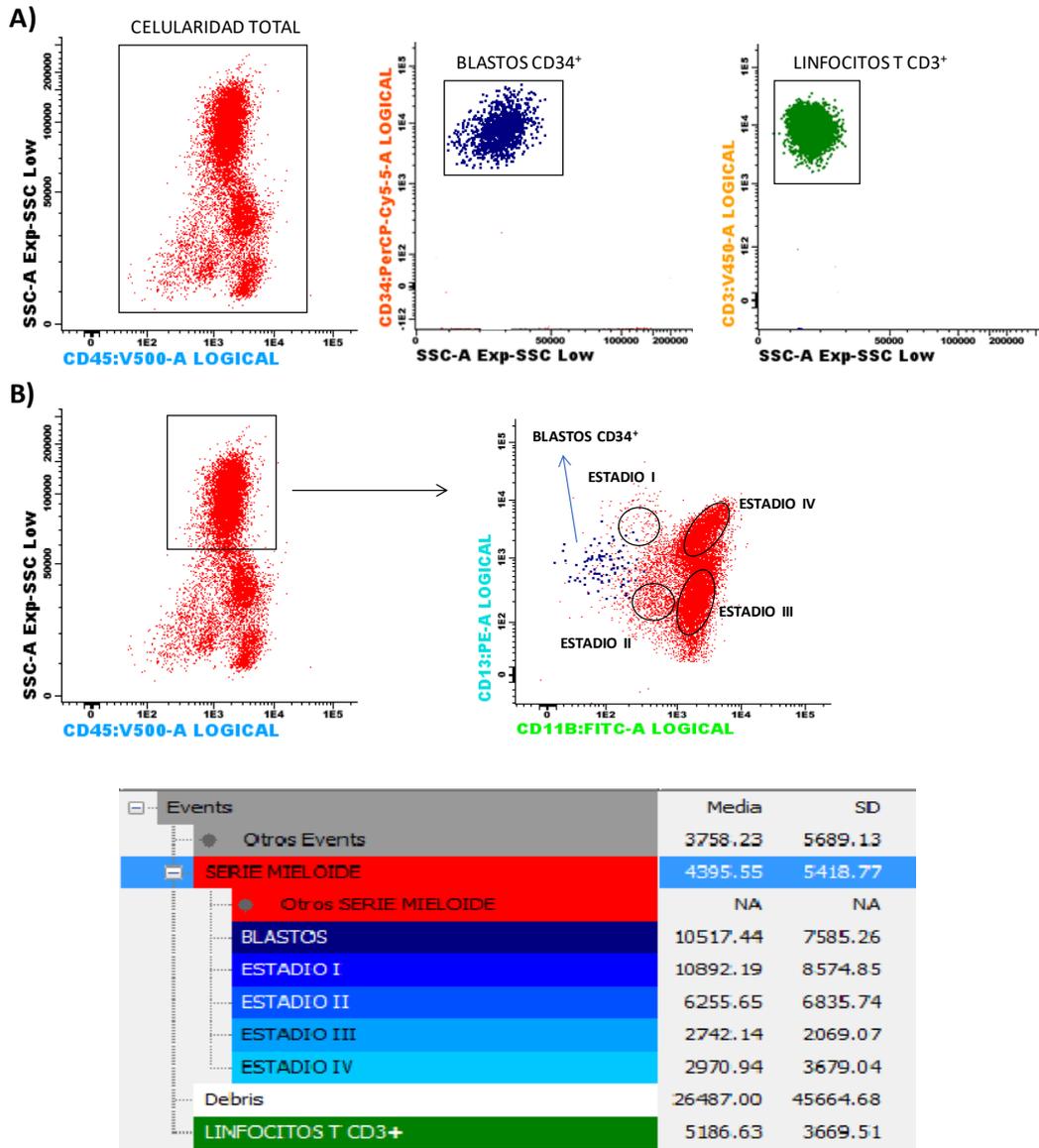


Figura 24. Tubo-8: Análisis de los niveles de IMF de moléculas HLA-I sobre la célula tumoral CD34⁺ y sobre los diferentes estadios de maduración mieloide.

Adicionalmente, se estudió la frecuencia de células CD34⁺ con expresión positiva de ligandos PD-L1 (*Figura 25*). Para ello, una vez seleccionada la población celular CD34⁺ sobre la totalidad CD45⁺, se seleccionó la fracción celular CD34⁺ positiva para el marcador CD274 (PD-L1).

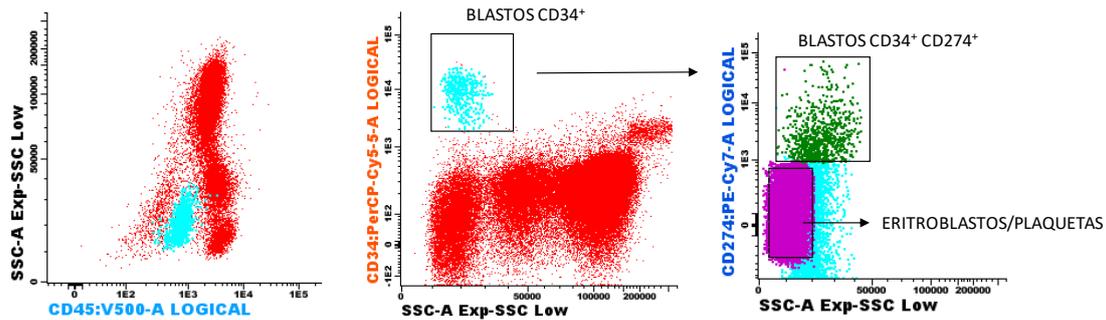


Figura 25. Tubo-3: diseñado para analizar la expresión de receptor CD274 sobre blastos CD34⁺.

3.3. AISLAMIENTO DE CÉLULAS CD34⁺ Y CÉLULAS T CD3⁺

La purificación de células CD34⁺ y linfocitos autólogos T CD3⁺ se llevó a cabo mediante un sistema magnético automatizado de inmunoselección directa (AutoMACS Pro Cell Separator, Miltenyi Biotec) a partir de muestras procedentes de MO y SP.

La purificación de las células CD34⁺ se llevó a cabo en muestras que presentaban un porcentaje de blastos superior al 5%, empleando el Kit comercial (CD34⁺ MicroBead Kit, human, Miltenyi Biotec, Germany) (nº referencia 130-046-702), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células mononucleares de SP fueron aisladas tras previa centrifugación con la solución Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden). La incubación de las muestras con las bolitas magnéticas (*beads*) conjugadas con ab anti-CD34-PE y posteriormente, el proceso de separación magnética se llevó a cabo en el AutoMACS Separator, utilizando para ello MACS buffer (Miltenyi Biotec). El aislamiento de los linfocitos T CD3⁺ se llevó a cabo de igual forma a la que se procedió para el aislamiento de la fracción celular CD34⁺, pero usando en este caso el Kit comercial CD3⁺ MicroBead Kit, human, Miltenyi Biotec.

Ambas fracciones celulares (células CD34⁺ y linfocitos T CD3⁺) fueron recogidas por separado en un volumen final de 500 μ L, de los cuales se tomaron una muestra de 20 μ L para su cuantificación mediante citometría de flujo multiparamétrica. En todos los casos, el grado de pureza de las muestras fue superior al 96%. Finalmente, se llevó a cabo la extracción y cuantificación del ADN del pellet obtenido.

3.4. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ADN

3.4.1. EXTRACCIÓN DEL ADN

La extracción del ADN de muestras de MO, SP y células CD34 aisladas, se llevó a cabo mediante el kit comercial *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen, Germany).

En primer lugar, se resuspendió la muestra en 200µl de PBS. A continuación, se añadió en un nuevo ependorf: 20µl de proteinasa K (lisis), 200 µl de la muestra anterior y 200µl de buffer AL (buffer de lisis). Esta mezcla se incubó a 56° durante 10 min, se añadió 200µl de etanol 70% y se homogeneizó con la ayuda de un vórtex. Posteriormente, se vertió sobre una columna de silica-gel y se centrifugó a 8000rpm durante 1min. El tubo se desechó y se añadió a la columna 500 µl de buffer de lavado AW1. Se centrifugó de nuevo a 8000rpm durante 1 min, se desechó de nuevo el tubo y se añadió en esta ocasión 500µl de buffer de lavado AW2. Se centrifugó a 14000rpm durante 3 min y posteriormente se pasó la columna a un nuevo ependorf previamente rotulado. Se añadió 50 µl de buffer de elución AE y se centrifugó a 8000rpm durante 1 min. Finalmente, el ADN obtenido se almacenó a -80°C.

3.4.2. CUANTIFICACIÓN DEL ADN

La cuantificación de ADN se llevó a cabo mediante el Kit comercial *Qubit® dsDNA BR Assay* (Invitrogen Life Technologies), RANGO 1 ng /µl – 100 ng/µl, y el fluorímetro *Qubit 3.0* (Life Technologies, USA).

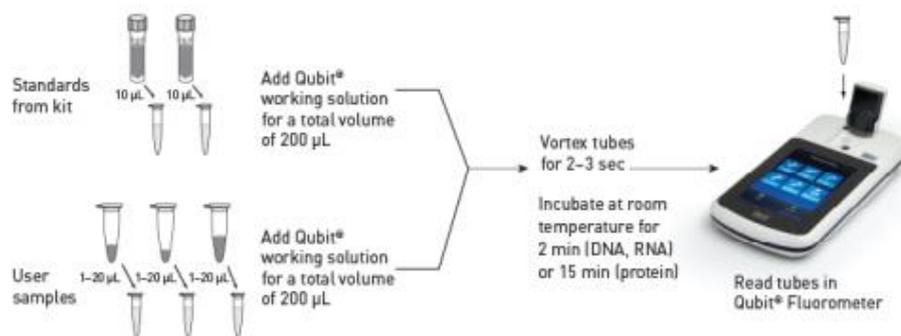


Figura 26. Protocolo para la cuantificación de ADN por fluorimetría Qubit® 3.0 Fluorometer.

El primer paso para la cuantificación del ADN consiste en la preparación de la solución fluorescente: 1/200 del reactivo fluorescente (PicoGreen, Qubit reagent) en una solución tampón (Qubit Buffer) (por el nº de muestras). A continuación, se prepararon las 2 soluciones de calibrado, para ello se añadió 10 µl de cada solución de calibrado de concentración conocida (standards) (0 ng/µl y 100 ng/µl) a 190 µl de la solución fluorescente. Posteriormente, se procedió a la preparación de la(s) solución(es) problema(s): se añadió 2 µl de cada una de las muestras problema a 198 µl de la solución fluorescente. Se homogeneizó con la ayuda de un vórtex, se transfirió a un tubo de 600 µl adaptado a la lectura de fluorescencia y se incubó 2 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Para la calibración del lector se seleccionó el ensayo a realizar y se introdujo una a una las muestras de calibrado del ADN de concentración conocida. Finalmente, se realizó la lectura de la concentración de las muestras problema, expresadas en ng/µl.

3.5. ESTUDIO DEL PERFIL MUTACIONAL

El perfil mutacional de los pacientes incluidos en el estudio se llevó a cabo mediante técnicas de NGS, usando un panel comercial (*TruSight Myeloid Sequencing Panel, Illumina, USA*), que incluye 54 genes asociados a neoplasias mieloides: *ABL1, ASXL1, ATRX, BCOR, BCORL1, BRAF, CALR, CBL, CBLB, CBLC, CDKN2A, CEBPA, CSF3R, CUX1, DNMT3A, ETV6/TEL, EZH2, FBXW7, FLT3, GATA1, GATA2, GNAS, HRAS, IDH1, IDH2, IKZF1, JAK2, JAK3, KDM6A, KIT, KRAS, MLL, MPL, MYD88, NOTCH1, NPM1, NRAS, PDGFRA, PHF6, PTEN, PTPN11, RAD21, RUNX1, SETBP1, SF3B1, SMC1A, SMC3, SRSF2, STAG2, TET2, TP53, U2AF1, WT1, ZRSR2*.

Tras posterior extracción y cuantificación del ADN, se prepararon las librerías de amplicones de un tamaño de 250 pares de bases (pb), siguiendo el protocolo *TruSeqCustomAmplicon* y usando los oligos *TruSightMyeloidSequencing Pan Oligos* (Illumina, EEUU), partiendo de 50ng totales de ADN por muestra.

Lo primero que se lleva a cabo para la formación de las librerías es la hibridación de los adaptadores específicos *upstream* y *downstream* de las secuencias de ADN diana. Tras una fase de purificación, en la que se eliminan los oligos que no han hibridado con las secuencias diana, se lleva a cabo el proceso de extensión-ligación de los que sí lo han hecho; este proceso consiste en la conexión de los oligos *upstream* y *downstream* mediante una ADN polimerasa y una ADN ligasa, de forma que se obtienen productos que contienen las regiones de interés flanqueadas por secuencias requeridas para la amplificación posterior. A continuación, se realiza una amplificación utilizando adaptadores que hibridan con las secuencias flanqueantes anteriores. Estos adaptadores contienen regiones esenciales para posteriores procesos de amplificación y secuenciación en la plataforma *MiSeq*, así como las secuencias *Index*, que permiten identificar de forma específica los fragmentos generados para cada paciente. De tal manera que, como resultado de la PCR, se generan amplicones de 250pb que contienen la región de interés, flanqueados por las secuencias adaptadoras comentadas. Tras la PCR, se realiza un nuevo proceso de purificación mediante el kit *AMPure XP*, que emplea unas bolitas paramagnéticas que utilizan la tecnología de inmovilización reversible en fase sólida (SPRI) para purificar muestras de ADN.

A continuación, se normalizan las librerías de amplicones a 4 nM, para que todas tengan igual representación en el pool de muestras, y se juntan en grupos de 8. Finalmente, se realiza la carga del pool de librerías en la plataforma *MiSeq* (Illumina), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez comenzado el *run* en el *MiSeq*, primero se da una fase de amplificación en puente de los fragmentos del pool de librerías (generación de clusters) para, a continuación, proceder a la secuenciación *paired-end* (2x150 ciclos (150 ciclos en sentido *forward* y 150 ciclos en sentido *reverse*)) de los fragmentos generados en cada clúster.

Los archivos *fastq* obtenidos de la secuenciación se cargaron en la aplicación *Sophia Genetics* (version 4.6.2) para el alineamiento de las secuencias, la anotación de variantes y el análisis posterior. Para la revisión y visualización de las secuencias, se usó el programa *Integrative Genomics Viewer* (version 2.3.68) (Broad Institute, Cambridge, MA).

3.6. PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD (LOH) Y FENÓMENOS DE DISOMÍA UNIPARENTAL ADQUIRIDA (aUPD) EN EL CROMOSOMA 6

La LOH en la región HLA localizada en el CRM 6 (6p21) y/o los fenómenos de aUPD se llevaron a cabo mediante un microarray-SNP “single nucleotide polymorphism” (ImmunoChip, Illumina Technology), comparando los resultados obtenidos de los linfocitos T CD3⁺ autólogos con las células blásticas CD34⁺.

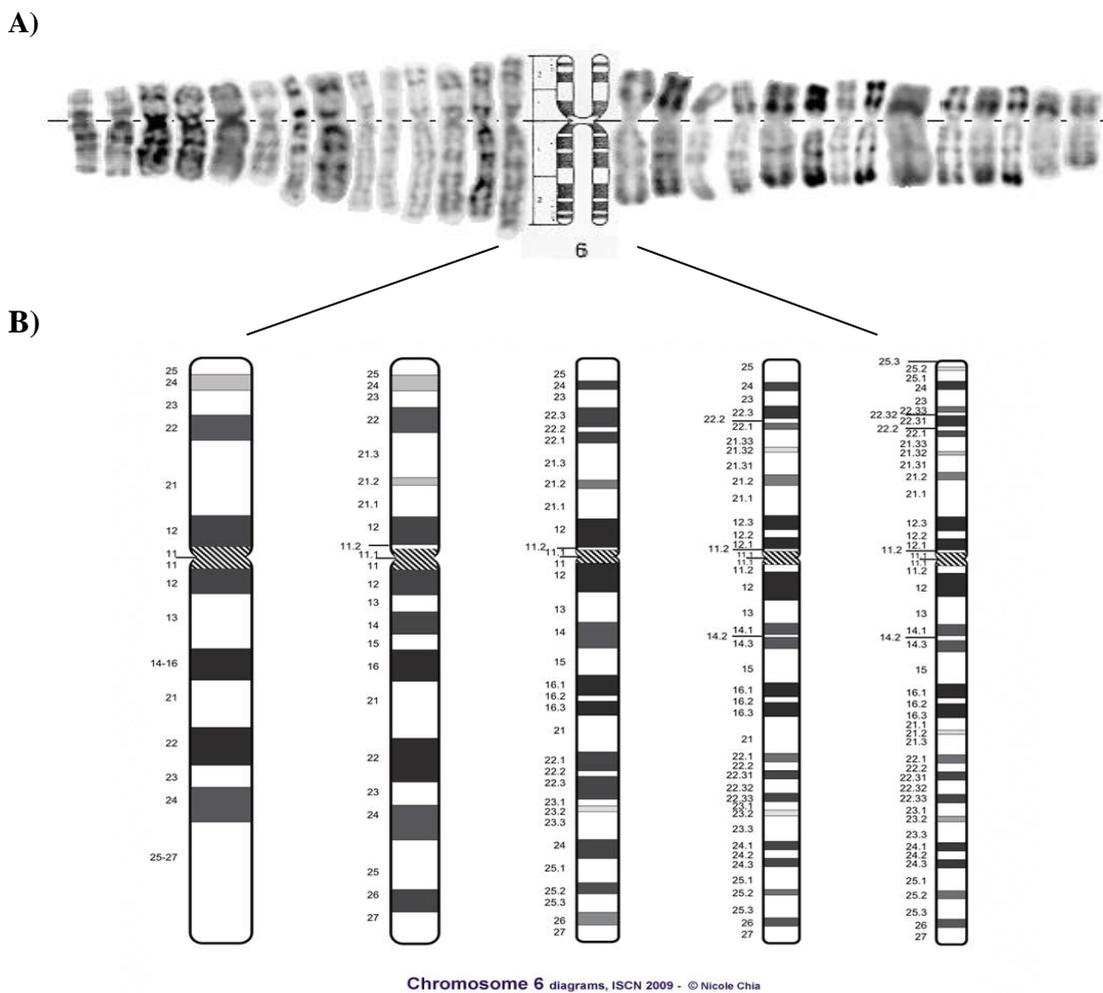


Figura 27. A) Esquema de los cromosomas humanos, tomada de <http://atlasgeneticsoncology.org>. B) Esquema del cromosoma 6, según ISCN 2009.

La extensión de la delección y el estudio de LOH/aUPD se llevaron a cabo en un total de 36 muestras seleccionadas, mediante el ImmunoChip Illumina Infinium (v2) (Illumina, cat# WG-357-1001), el cual detecta 253,703 SNPs seleccionados y basados en GWAS de enfermedades del sistema inmunitario. Posteriormente, las muestras se analizaron mediante el software Genome studio (Illumina) que nos permite establecer la LogR ratio, la zigosis y el número de copias de cada SNP.

Los datos de LOH y del número de copias (copy number, CN), fueron expresados como los valores "Theta" y "R", respectivamente. "Theta" representa la Frecuencia del Alelo B (FAB), mientras que "R" representa la intensidad de la fluorescencia procedente de ambos canales. Mientras que los valores de "Theta" pueden ser interpretados directamente para detectar LOH, gracias a la herramienta informática bcf [PMID:26826718], los "R" necesita compararse con unos valores de referencia standard para detectar regiones en las que existan pérdidas o ganancias en el CN. Los valores de referencia corresponden a un valor medio de fluorescencia por prueba de un total de 1632 muestras no relacionadas de ancestros europeos, obteniendo finalmente los Log-ratios (logR). Los valores de logR varían entre los valores: -1, 0 y +1. Una distribución de logR igual a cero puede considerarse como un CN neutral o conservado; mientras que los intervalos cromosómicos principalmente negativos o positivos, -1 y +1, pueden interpretarse como pérdidas o ganancias en el CN, respectivamente. Los tramos cromosómicos con valores de FAB de cero o uno pueden interpretarse como LOH. Así mismo, la presencia de SNP no heterocigotos (FAB de cero o uno) con un CN conservado, demostrará la presencia de aUPD.

Posteriormente, el ADN de muestras procedentes de blastos CD34⁺ y de muestras control (células T CD3⁺ autólogas) fueron genotipadas usando el Inmunochip Illumina Infinium, siguiendo las instrucciones del fabricante (Illumina, cat# WG-357-1001), el cual detecta 253,703 SNPs distribuidos por todo el genoma.

3.7. TIPAJE GENÓMICO HLA

3.7.1. TIPAJE HLA MEDIANTE TECNOLOGÍA LUMINEX

Así mismo, el ADN procedente de células tumorales y de células T autólogas se utilizó para llevar a cabo el tipaje genómico HLA-I y HLA-II, mediante SSO-PCR Luminex usando el kit comercial LIFECODES HLA-A, -B, -C, -DRB1 y -DQB1, Typing Kits–Rapid (IMMUCOR, Georgia), el cual emplea oligonucleótidos específicos de secuencia unidos a microesferas fluorescentes para la detección de los distintos alelos; siguiendo las instrucciones del fabricante.

El sistema Luminex, 100/200™ System, basado en la tecnología xMAP (Luminex) y el software Match-It DNA v1.2 (IMMUCOR) fueron usados para determinar el tipaje HLA y la posterior detección de pérdidas alélicas, de locus o de haplotipo en la célula tumoral con respecto a la muestra control (Linfocitos T CD3⁺).

3.7.2. TIPAJE HLA MEDIANTE SECUENCIACIÓN SANGER

La secuenciación Sanger fue llevada a cabo en aquellas muestras en las que se detectaron alteraciones en la región HLA mediante la técnica SNP-array. El ADN procedente de células leucémicas CD34⁺ y de células T CD3⁺ autólogas, se utilizó para la secuenciación de los exones 2, 3 y 4, para las moléculas HLA-I y del exón 2 para las moléculas de HLA-II (en el caso de HLA-DQB1 se secuenciaron los exones 2 y 3); utilizando el kit Gen Dx Allele SEQR (GENDX, Utrecht) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

El análisis de los datos y posterior tipaje HLA de alta resolución fue llevado a cabo utilizando el software CE-marked SBTengine.

3.8. ESTUDIOS CITOGENÉTICOS

El estudio de las principales anomalías citogenéticas relacionadas con el SMD del(5q), del(7q), del(20q), trisomía 8) se llevó a cabo mediante técnicas de Hibridación *in situ* Fluorescente (FISH), empleando las sondas comerciales (LSI 5q31 (EGR1); LSI 7q31 (D7S522); LSI 20q12 (D20S108); CEP 8) (Abbott), que emiten fluorescencia al hibridarse con regiones cromosómicas concretas.

Por otro lado, el cariotipo convencional de los pacientes incluidos en el estudio se llevó a cabo en un laboratorio externo.

3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de los datos se utilizó el software estadístico IBM SPSS Statistics 21.0.

Análisis descriptivo de los datos: Las variables de tipo cuantitativo se expresaron en media±EEM. Las variables categóricas (cualitativas) fueron expresadas en frecuencias relativas (porcentajes).

Análisis bivariante: Dependiendo de la normalidad de las variables cuantitativas, se utilizaron tests paramétricos o no paramétricos. Para comparar medias entre dos grupos se utilizó el test de T de Student y cuando no se cumplían las condiciones de validez (variables no normales y/o $n < 30$ en alguno de los grupos) se utilizó el test no paramétrico equivalente, U de Mann-Whitney.

Para comparar más de dos medias se utilizó el análisis de la varianza, ANOVA, cuando éste dio significativo, se utilizaron las comparaciones múltiples (post-hoc), y/o su equivalente no paramétrico de Kruskal Wallis.

Para relacionar dos variables cuantitativas se utilizaron el análisis de correlación en función de la normalidad de los datos: Test de correlación de Pearson o de Spearman.

El análisis de dos variables cualitativas (categóricas) se realizó mediante el test de Chi cuadrado (tablas de contingencia) dependiendo de las categorías de cada una de las variables (tabla de RxS o tablas de 2x2). Cuando dicho test no cumplía las condiciones de validez, se utilizó el test exacto de Fisher para tablas de 2x2.

El nivel de significación para este estudio fue de $P \leq 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

4.1.1. Características demográficas

Las principales características demográficas de los pacientes incluidos en el estudio están resumidas en la siguiente tabla:

Características		
<i>Síndrome Mielodisplásico</i>		
<i>Nº de pacientes</i>	166	
<i>Edad (media)</i>	72	
<i>Sexo</i>	59 mujeres	107 varones
<i>Leucemia Mieloide Aguda secundaria a SMD</i>		
<i>Nº de pacientes</i>	28	
<i>Edad (media)</i>	74	
<i>Sexo</i>	9 mujeres	19 varones
<i>Leucemia Mielomonocítica Crónica</i>		
<i>Nº de pacientes</i>	32	
<i>Edad (media)</i>	75	
<i>Sexo</i>	12 mujeres	20 varones
<i>Leucemia Mieloide Aguda de novo</i>		
<i>Nº de pacientes</i>	17	
<i>Edad (media)</i>	68	
<i>Sexo</i>	7 mujeres	10 varones

Tabla 10. Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio.

El estudio se centra en 194 pacientes totales, de los cuales 166 pacientes fueron diagnosticados de SMD y 28 pacientes fueron diagnosticados de LMAs. La media de edad observada en ambos grupos fue de 72 y 74 años, respectivamente; por lo que, tal y como se ha comentado anteriormente, la edad media de presentación fue tardía. De igual forma, en ambos grupos se observa que el porcentaje de hombres duplica al de las mujeres, reflejando una ratio aproximada 2:1, dato ampliamente documentado. A continuación, se muestra la distribución por subgrupos de la OMS, por clasificación pronóstica y por categorías de riesgo citogenético.

4.1.2. Clasificación OMS 2017

Los pacientes diagnosticados de SMD incluidos en el estudio fueron divididos en base a la reciente clasificación OMS 2017. Según dicha clasificación, el 81,1 % de los pacientes incluidos en nuestro estudio se concentran dentro de los grupos SMD con displasia multilineaje (57%) y en los grupos SMD con exceso de blastos (24,1%), tal y como se observa en la siguiente tabla (**Tabla 11**).

<i>Clasificación OMS 2017</i>	<i>Nº de pacientes SMD (%)</i>
<i>SMD-DU</i>	2 (1,2%)
<i>SMD-DM</i>	96 (57,8%)
<i>SMD-SA</i>	10 (6%)
<i>SMD del(5q)</i>	17 (10,3%)
<i>SMD EB-1</i>	23 (13,8%)
<i>SMD EB-2</i>	17 (10,3%)
<i>SMD-U</i>	1 (0,6%)
<i>Total</i>	166 (100%)

Tabla 11. Clasificación de los pacientes con SMD en base a la clasificación OMS 2017. SMD-DU: SMD con displasia Unilineal; SMD-DM: SMD con displasia Multilineal; SMD-SA: SMD con sideroblastos en anillo (DU/DM); SMD con delección 5q aislada: SMD del(5q); SMD-EB 1: SMD con exceso de blastos 1; SMD-EB 2: SMD con exceso de blastos 2; SMD-U: SMD Inclasificable.

4.1.3. Clasificación según IPSS/IPSS-R

En cuanto a los diferentes sistemas de clasificación pronóstica, los pacientes SMD fueron divididos en base a los dos *scores* pronósticas ampliamente utilizados que presentan utilidad en la práctica clínica, el IPSS y más recientemente, el IPSS-R (**Tabla 12**).

<i>Características</i>	
Nº de pacientes SMD	166
IPSS	
Bajo Riesgo	118 (71,1%)
<i>Bajo Riesgo</i>	77
<i>Intermedio-1</i>	41
Alto Riesgo	37 (22,3%)
<i>Intermedio-2</i>	24
<i>Alto Riesgo</i>	13
No clasificable	11 (6,6%)
IPSS-R	
Bajo Riesgo	86 (51,8%)
<i>Muy Bajo Riesgo</i>	25
<i>Bajo Riesgo</i>	61
Alto Riesgo	66 (39,8%)
<i>Intermedio</i>	32
<i>Alto Riesgo</i>	11
<i>Muy Alto Riesgo</i>	23
No clasificable	14 (8,4%)

Tabla 12. Clasificación de los pacientes con SMD según índices pronósticos IPSS e IPSS-R.

En algunos casos, no se ha podido calcular el valor pronóstico por el IPSS e IPSS-R debido a la falta de datos.

Los análisis estadísticos llevados a cabo en el estudio agrupan a los pacientes de acuerdo con el riesgo de progresión a leucemia, definiendo así dos grupos (Bajo Riesgo vs. Alto Riesgo) para cada uno de los sistemas, IPSS e IPSS-R:

IPSS: *Bajo Riesgo* (Bajo riesgo (BR)/Intermedio-1 (Int-1)); ***Alto Riesgo*** (Intermedio-2 (Int-2)/Alto Riesgo (AR)); e **IPSS-R: *Bajo Riesgo*** (Muy Bajo Riesgo (MBR)/Bajo Riesgo (BR)); ***Alto Riesgo*** (Intermedio (INT)/Alto Riesgo (AR)/Muy Alto Riesgo (MAR)).

Según el IPSS, observamos que el 22,3% de los pacientes pertenecen a los grupos de peor pronóstico (Int-2 y Alto Riesgo), mientras que según la clasificación IPSS-R, observamos un 39,8% de pacientes englobados dentro de esta categoría.

4.1.4. Clasificación según riesgo citogenético

En relación al riesgo citogenético, todos los pacientes con SMD que presentaban un riesgo citogenético “Favorable”, presentaban un cariotipo bueno; el 21,1% de los pacientes con SMD presentaban un cariotipo “Intermedio”, y finalmente, el 12% de los mismos están englobados dentro de un cariotipo complejo (riesgo citogenético “Pobre”). La siguiente tabla (**Tabla 13**) y figura (**Figura 28**) muestran la distribución de los pacientes en función del riesgo citogenético.

<i>Características</i>	<i>Nº de pacientes SMD (%)</i>
Riesgo Citogenético	
Favorable	100 (60,3%)
<i>Muy Bueno</i>	-
<i>Bueno</i>	100
Intermedio	35 (21,1%)
Pobre	20 (12%)
<i>Pobre</i>	5
<i>Muy Pobre</i>	15
Sin Datos	11 (6,6%)

Tabla 13. Clasificación de los pacientes con SMD según el riesgo citogenético. **Favorable** (Muy Bueno (-Y, del(11q) y Bueno (normal, del(20q), del(5q), del(12p) aisladas y anomalías dobles)), **Pobre** (Pobre (complejo con 3 alteraciones, der(3q) o alteraciones del CRM7) y Muy Pobre (complejo con ≥ 3 alteraciones)), o **Intermedio** (otras alteraciones no incluidas anteriormente).

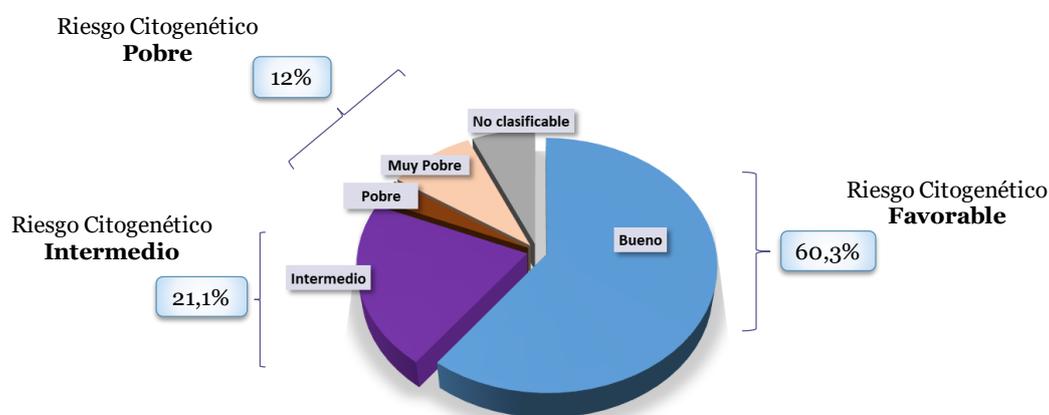


Figura 28. Distribución de los pacientes con SMD en función del Riesgo Citogenético

4. 2. ESTUDIO DEL MICROAMBIENTE TUMORAL

El estudio del microambiente tumoral se llevó a cabo en muestras de MO y/o SP de 130 pacientes diagnosticados de SMD (70 varones, 60 mujeres; media de edad 72 años), 23 pacientes con LMAs (12 varones, 11 mujeres; media de edad 72 años), 30 pacientes diagnosticados con LMMC (19 varones, 11 mujeres; media de edad 72 años) y 16 pacientes con LMA *de novo* (9 varones, 7 mujeres; media de edad 72 años). Para el estudio del microambiente en SP, se utilizó como grupo control 40 muestras de sujetos sanos (media de edad 70 años; rango 50-91 años).

4.2.1. Estudio de poblaciones leucocitarias en sangre periférica de pacientes diagnosticados con SMD

Con el fin de caracterizar las diferentes poblaciones leucocitarias y linfocitarias presentes en el microambiente tumoral de pacientes diagnosticados con SMD, se llevó a cabo un análisis en muestras de SP obtenidas al tiempo del diagnóstico durante un periodo de tiempo de dos años. Al final de la recogida de datos, los resultados fueron expresados en valores absolutos y porcentuales, bien referido al total de leucocitos, en el caso de linfocitos totales, monocitos y granulocitos, o bien referido al total de linfocitos (pool linfocitario), en el caso de las distintas subpoblaciones linfocitarias.

Se quiso valorar si los pacientes con SMD presentaban alteraciones en la composición de las diferentes poblaciones celulares relacionadas con la respuesta inmunitaria a nivel del microambiente tumoral con respecto a individuos sanos. Se determinaron las cifras correspondientes a leucocitos totales, y a continuación, de linfocitos totales y de linfocitos T, linfocitos B y células NK de todos los pacientes, y se compararon con las obtenidas en un grupo control, de edad similar al grupo de estudio. En las **Tablas 14 y 15** se resumen los datos obtenidos (media \pm error estándar de la media (EEM)).

4.2.1.1. Estudio de poblaciones leucocitarias

En primer lugar, se determinó el número total de leucocitos en SP de los pacientes con SMD, para posteriormente, llevar a cabo el cálculo de los valores absolutos de las diferentes poblaciones leucocitarias. El valor absoluto de leucocitos en el grupo de pacientes con SMD fue inferior y estadísticamente significativo al observado en el grupo de individuos control (Pacientes *vs.* control: 5552,2 células $\times 10^{-3}/\text{ml}$ *vs.* 8986 células $\times 10^{-3}/\text{ml}$, $P=0.0001$). Atendiendo a las poblaciones leucocitarias, la media de los valores absolutos de neutrófilos en el SMD fue significativamente menor al del grupo de individuos sanos (Pacientes *vs.* control: 5498,2 células $\times 10^{-3}/\text{ml}$ *vs.* 3200,6 células $\times 10^{-3}/\text{ml}$, $P=0.0001$). Así mismo, el porcentaje medio de neutrófilos disminuyó también significativamente con respecto al grupo control (Pacientes *vs.* control: 53,1% *vs.* 65,2%, $P=0.0001$).

4.2.1.2. Estudio de poblaciones linfocitarias

Al considerar el porcentaje de linfocitos dentro del grupo de pacientes con SMD y compararlo con el grupo control, se observó que los pacientes presentaban un porcentaje medio de linfocitos totales superior al del grupo control (Pacientes vs. control: 33,1% vs. 19,6%, $P=0.0001$). Sin embargo, el número absoluto de linfocitos en el grupo de pacientes SMD fue significativamente inferior que el observado en el grupo control (Pacientes vs. control: 1302,8 células $\times 10^{-3}/\text{ml}$ vs. 1658,2 células $\times 10^{-3}/\text{ml}$, $P=0.028$).

<i>Células $\times 10^{-3}/\text{mL}$</i>					
	<i>Control</i>	<i>SMD</i>	<i>P₁</i>	<i>LMAs</i>	<i>P₂</i>
Linfocitos totales	1658,2±144,1	1301,8±85,6	0.028	1590,0±304,0	0.641
Linfocitos T	1446,6±71,8	894,4±69,6	0.0001	1185,1±293,0	0.569
T CD4⁺	996,5±52,7	471,9±40,1	0.0001	633,2±187,5	0.026
T CD8⁺	530,8±48,6	365,6±34,9	0.007	408,3±83,2	0.400
Linfocitos B	174,6±18,5	106,0±26,1	0.035	107,5±39,3	0.110
Células NK	364,3±35,0	229,5±28,5	0.004	172,2±56,8	0.037

Tabla 14. Valores absolutos, media±EEM, de linfocitos T, linfocitos B y células NK en SP. *P₁*, comparación entre el grupo control y el grupo SMD. *P₂*, comparación entre el grupo control y el grupo LMAs. *P₁* entre grupos mediante el test paramétrico T de Student. *P₂* entre grupos mediante el test U de Mann Whitney.

<i>%</i>					
	<i>Control</i>	<i>SMD</i>	<i>P₁</i>	<i>LMAs</i>	<i>P₂</i>
Linfocitos totales	19,6±1,2	33,1±2,5	0.0001	27,0±3,6	0.004
Linfocitos T	72,3±1,0	68,7±2,1	0.093	74,4±7,4	0.157
T CD4⁺	43,0±1,2	35,7±1,5	0.001	36,1±4,9	0.251
T CD8⁺	23,0±1,1	28,4±1,6	0.007	32,6±5,4	0.083
Ratio CD4/CD8	2,2±0,1	1,3±0,09	0.001	1,4±0,2	0.025
Linfocitos B	8,4±0,6	7,3±1,5	0.474	6,7±1,4	0.221
Células NK	16,0±1,0	17,1±1,7	0.547	11,1±3,9	0.084

Tabla 15. Porcentajes (media±EEM) de linfocitos T, linfocitos B y células NK en SP. *P₁*, comparación entre el grupo control y el grupo SMD. *P₂*, comparación entre el grupo control y el grupo LMAs. *P₁* entre grupos mediante el test paramétrico T de Student. *P₂* entre grupos mediante el test U de Mann Whitney.

Linfocitos T

El estudio llevado a cabo en la subpoblación celular T CD3⁺ mostró que la media del porcentaje de linfocitos T en el grupo SMD no varió significativamente con respecto al grupo de individuos control ($P > 0.05$). Sin embargo, el número absoluto de linfocitos T fue significativamente menor en los pacientes con SMD en comparación con el grupo control (Pacientes vs. control: 894,4 células $\times 10^{-3}/\text{ml}$ vs. 1446,6 células $\times 10^{-3}/\text{ml}$, $P = 0.0001$). Como se puede observar en la *Tabla 14* y *Figura 29*, los valores absolutos disminuyeron casi a la mitad.

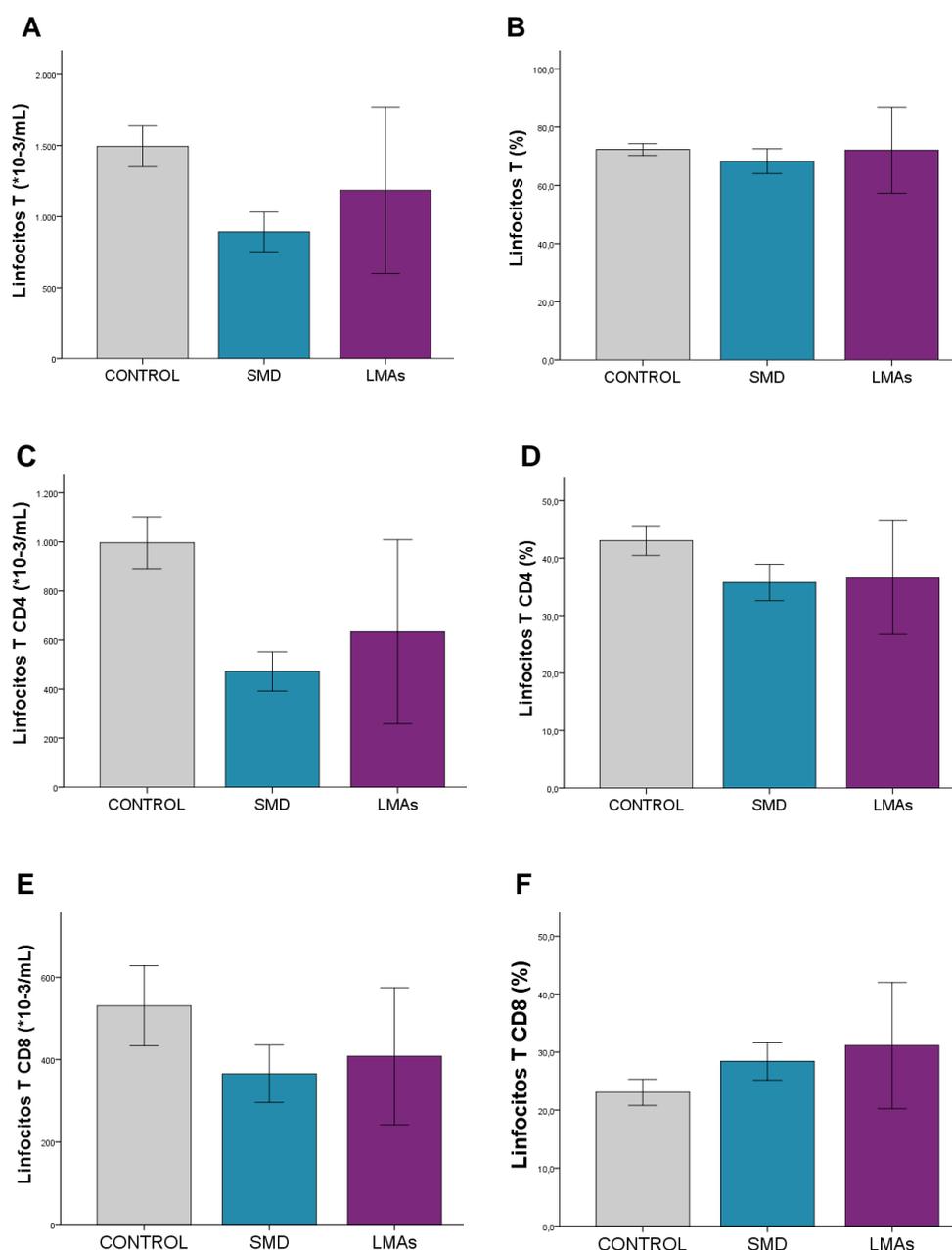


Figura 29. Porcentaje y valor absoluto de linfocitos T en SP de los grupos SMD y LMAs, y en el grupo control. Los datos representan media \pm EEM del: **A)** Valor absoluto de linfocitos T totales. **B)** Porcentaje de Linfocitos T totales. **C)** Valor absoluto de Linfocitos T CD4⁺. **D)** Porcentaje de Linfocitos T CD4⁺. **E)** Valor absoluto de Linfocitos T CD8⁺. **F)** Porcentaje de Linfocitos T CD8⁺.

Además, se analizaron las subpoblaciones linfocitarias T CD4⁺ y CD8⁺. En condiciones normales, las células T CD4⁺ se encuentran con una ratio 2-4 veces superior que las T CD8⁺ dentro del pool linfocitario T en SP.

En nuestro estudio, se observó una menor cantidad de células T CD4⁺ en el SMD en comparación con el grupo control (Pacientes vs. control: 471,9 células x10⁻³/ml vs. 996,5 células x10⁻³/ml, P=0.0001). Además, la media del porcentaje CD4⁺ en el grupo SMD fue significativamente inferior a la observada en el grupo control (35,7% vs. 56%, P=0.0001).

La población T CD8⁺ también se vio afectada. Aunque dicha población disminuyó significativamente con respecto al grupo control, este descenso fue más moderado (Pacientes vs. control: 365,6 células x10⁻³/ml vs. 530,8 células x10⁻³/ml, P=0.007). En esta línea, hemos encontrado una reducción de la ratio CD4/CD8 en pacientes con SMD en comparación con el grupo control (P=0.001). Nuestros resultados sugieren que los cambios en el pool linfocitario CD4⁺ son los responsables de la disminución de la ratio CD4/CD8 en estos pacientes.

En la LMAs, como se puede observar en la **Tabla 14**, existe una disminución en el número absoluto de linfocitos T CD4⁺ con respecto al grupo control, aunque no tan marcada como la que se observa en los pacientes con SMD (LMAs vs. control: 633,2 células x10⁻³/ml vs. 945,4 células x10⁻³/ml, P=0.026).

Células NK

En relación a las células NK, esta subpoblación linfocitaria disminuyó también de forma significativa en valores absolutos en pacientes con SMD con respecto al grupo control (Pacientes vs. control: 229,5 células x10⁻³/ml vs. 364,3 células x10⁻³/ml, P=0.004), pero sin afectar al valor porcentual (Pacientes vs. control, P>0.05).

Además, en el grupo LMAs también se vio afectada esta subpoblación linfocitaria, con una disminución significativa en el valor absoluto comparado con el del grupo control (LMAs vs. control: 172,2 células x10⁻³/ml vs. 364,3 células x10⁻³/ml, P=0.037).

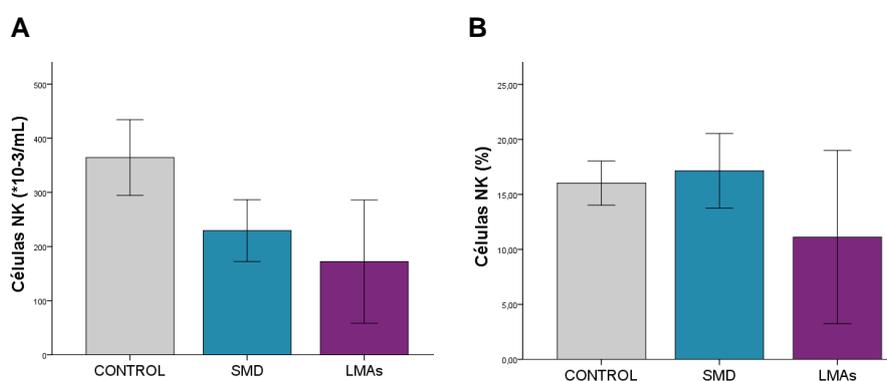


Figura 30. Porcentaje y valor absoluto de células NK en SP de los grupos SMD y LMAs, y en el grupo control. Los datos representan media±EEM del: A) Valor asoluto de células NK. B) Porcentaje de células NK.

Linfocitos B

El estudio del número absoluto de linfocitos B mostró una disminución significativa con respecto al grupo control (Pacientes *vs.* control: 106 células $\times 10^{-3}/\text{ml}$ *vs.* 174,6 células $\times 10^{-3}/\text{ml}$, $P=0.035$). Sin embargo, no se observaron diferencias en los valores porcentuales (Pacientes *vs.* control, $P>0.05$).

En general, los pacientes con SMD manifiestan linfopenias en SP, en relación a las tres subpoblaciones linfocitarias (linfocitos T, linfocitos B y células NK). Sin embargo, esta linfopenia afecta principalmente a la subpoblación celular T CD4⁺, con una marcada disminución en el número absoluto de ésta, la cual se manifiesta con una clara inversión de la ratio T CD4/CD8.

4.2.2. Estudio funcional de poblaciones leucocitarias en pacientes con SMD en sangre periférica

El estudio funcional de las diferentes poblaciones leucocitarias presentes en SP de pacientes diagnosticados de SMD con respecto al grupo control, se llevó a cabo mediante de citometría de flujo multiparamétrica utilizando un amplio panel de AcMo para la caracterización inmunofenotípica de las principales poblaciones funcionales T, células NK y componentes del sistema inmunitario innato (MDSCs).

El estudio de los marcadores asociados a función de células T se llevó a cabo considerando los receptores de quimioquinas, CCR10, CCR6 y CXCR3, dividiendo así a las células en diferentes poblaciones de células T efectoras: Th1 (CXCR3⁺), Th17 (CCR10⁺CCR6⁻) y Th22 (CCR10⁺CCR6⁺). También se llevó a cabo un estudio de marcadores asociados a activación de células NK (NKG2D, NKp46, CD161, KIR2DS1), así como de marcadores de inhibición NK (KIR2DL1, KIR2DL3). Además, se han estudiado marcadores asociados a inmunosupresión que pudieran estar involucradas en el proceso de progresión y/o transformación leucémica, como pueden ser: la presencia de células Treg, MDSCs o la presencia de linfocitos T (CD4/CD8) con expresión del marcador CD39.

El análisis en el patrón de expresión de las diferentes poblaciones celulares inmunitarias en pacientes con SMD (n=69) y pacientes con LMAs (n=11) con respecto a grupo control (n=40) en SP, reveló diferencias significativas en algunas de las poblaciones estudiadas:

Subpoblaciones de linfocitos T

De forma general, anteriormente se observaron diferencias en la composición linfocitaria (linfocitos T, B y NK) a nivel periférico (**apartado 4.2.1.2. estudio de poblaciones linfocitarias**) con respecto al grupo control, con una alteración de la ratio T CD4/CD8.

Sin embargo, no observamos diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la proporción funcional de células T en el SMD, donde el porcentaje de células Treg, Th1 y Th17 en el grupo de pacientes fue similar con respecto al grupo control, al igual que las diferentes ratios estudiadas (Th1/Th17, Treg/Th17, CD8/Treg) (SMD vs. control, $P > 0.05$). En la **Tabla 16**, se resumen los datos obtenidos.

	<i>Control</i>	<i>SMD</i>	<i>P₁</i>	<i>LMAs</i>	<i>P₂*</i>
Linfocitos T (%)					
<i>CD3</i>	72,3±1,0	68,7±2,1	0.093	74,4±7,4	0.569
<i>CD4</i>	43,0±1,2	35,7±1,5	0.001	36,1±4,9	0.251
<i>CD8</i>	23,0±1,1	28,4±1,6	0.007	32,6±5,4	0.083
Linfocitos T CD4 (%)					
<i>Th1</i>	24,2±1,2	22,4±1,5	0.447	19,9±2,9	0.345
<i>Th17</i>	11,9±1,0	14,1±1,5	0.299	10,2±1,2	0.395
<i>Th22</i>	3,6±0,4	7,0±1,0	0.004	5,5±1,3	0.143
<i>Treg</i>	6,3±0,4	7,1±0,3	0.190	8,8±1,3	0.058
<i>CD4⁺ CD39⁺</i>	3,3±0,5	5,3±0,8	0.273	7,5±1,2	0.010
Linfocitos T CD8 (%)					
<i>CD8⁺ CD39⁺</i>	1,3±0,3	4,8±1,2	0.006	3,3±0,9	0.022
Ratio células T					
<i>CD4/CD8</i>	2,2±0,1	1,3±0,09	0.001	1,4±0,2	0.025
<i>CD8/Treg</i>	4,3±0,2	4,7±0,1	0.747	6,4±0,7	0.698
<i>Th1/Th17</i>	2,5±0,3	2,6±0,5	0.334	2,3±0,6	0.620
<i>Th1/Treg</i>	4,2±0,3	4,3±0,5	0.884	4,7±2,5	0.124
Células NK (%)					
<i>CD56^{Bright}</i>	3,0±0,4	8,3±1,6	0.0001	10,9±4,0	0.006
<i>CD56⁺ CD16⁺</i>	80,9±1,4	73,3±2,9	0.023	70,9±6,5	0.111
<i>CD56⁺ CD16⁻</i>	3,4±0,3	8,7±2,1	0.043	5,6±2,6	0.781
<i>CD56⁻ CD16⁺</i>	12,3±1,2	8,7±1,2	0.035	12,4±2,9	0.489
Células NK CD56⁺ (%)					
<i>NKG2D</i>	79,0±1,5	61,9±3,3	0.0001	55,5±6,1	0.001
<i>NKp46</i>	80,7±2,1	71,02±3,1	0.013	75,8±7,4	0.520
<i>CD161</i>	77,9±2,2	68,2±3,6	0.025	60,4±4,7	0.010
MDSCs (%)					
<i>PMN-MDSCs</i>	0,04±0,006	0,13±0,02	0.001	1,3±0,3	0.0001
<i>Mo-MDSCs</i>	6,6±1,0	14,2±2,7	0.483	30,4±3,5	0.003
Células CD34⁺ (%)					
<i>PD-L1 (%)</i>	ND	30,5±4,6	-	3,1±1,4	-

Tabla 16. Porcentajes (media±EEM) de las diferentes poblaciones celulares y características inmunogénicas de la célula tumoral (PD-L1) en pacientes con SMD y LMAs, y en muestras control, en SP. *P₁*, comparación entre el grupo control y el grupo SMD. *P₂*, comparación entre el grupo control y el grupo LMAs. *P* entre grupos mediante T de Student. **P* entre grupos mediante U de Mann Whitney.

Curiosamente, las únicas diferencias encontradas en relación al conjunto celular T, fue cuando se realizó la comparación en el subconjunto de células Th22. Estas células se definen como una subpoblación de células Th17 que expresan además el marcador CCR10. Destacamos que no encontramos diferencias en relación a las células Th17, pero sí en la subpoblación de células Th17 conocidas como Th22, con una frecuencia mayor en pacientes de SMD con respecto al grupo control ($P=0.011$).

Por otro lado, cuando se estudiaron marcadores asociados a supresión de células T en SP, se observó un aumento en la frecuencia de células T CD4⁺ y células T CD8⁺ con expresión del marcador CD39 en pacientes con SMD y LMAs, respecto al grupo control. Este aumento fue significativo en la proporción de células T CD4⁺ en pacientes con LMAs ($P=0.01$) y de células T CD8 CD39⁺ en los grupos SMD ($P=0.006$) y LMAs ($P=0.022$).

Subpoblaciones de células NK

Inicialmente, el estudio del microambiente en SP de pacientes con SMD y LMAs (*apartado 4.2.1.2. estudio de poblaciones linfocitarias*), reveló un descenso en el número absoluto de células NK, comparados con el grupo control. Además, como veremos a continuación, se han observado diferencias en la proporción de las subpoblaciones NKs (CD56^{bright}, CD56⁺CD16⁺, CD56⁺CD16⁻, CD56⁻CD16⁺) y en la expresión de sus receptores activadores. En la **Tabla 16**, se resumen los datos obtenidos.

Basándonos en los diferentes subconjuntos de células NK, el análisis revela un aumento significativo de células NK CD56^{bright} en pacientes con SMD ($P=0.0001$) y con transformación leucémica ($P=0.006$) comparados con el grupo control. Además, en pacientes con SMD, se observa un aumento de células NK con fenotipo (CD56⁺CD16⁻) con respecto al grupo control ($P=0.043$), junto con una disminución del subconjunto citotóxico ($P=0.023$) y del subconjunto CD56⁻CD16⁺ ($P=0.035$).

En relación a los receptores activadores (NKG2D, NKp46 y CD161) expresados en células NK CD56⁺ (CD56^{bright} y CD56^{dim}), se observó que la frecuencia de los tres receptores activadores estudiados fue menor en pacientes con SMD con respecto al grupo control ($P=0.0001$; $P=0.013$; $P=0.025$, respectivamente) en SP. Además, el estudio llevado a cabo en pacientes con transformación leucémica reveló una disminución significativa con respecto al grupo control en relación a la expresión de los receptores NKG2D y CD161 (LMAs vs. control; $P=0.001$; $P=0.01$, respectivamente) (**Figura 31**).

Por otro lado, se investigó la expresión de receptores KIR sobre células NK CD56⁺ en pacientes con SMD y LMAs. Los receptores KIR reconocen ligandos HLA-C presentes en la célula tumoral y por ello, se llevó a cabo la identificación, mediante citometría de flujo, de la expresión de receptores KIR activadores, tales como KIR2DS1 y KIR2DS2; como de aquellos que presentan actividad inhibitoria (KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3). Se destaca que la expresión de los receptores KIR estudiados presentó una distribución equivalente entre los grupos de pacientes, SMD y LMAs, y entre cada uno de éstos y el grupo control, no observándose diferencias significativas entre ellos ($P>0.05$).

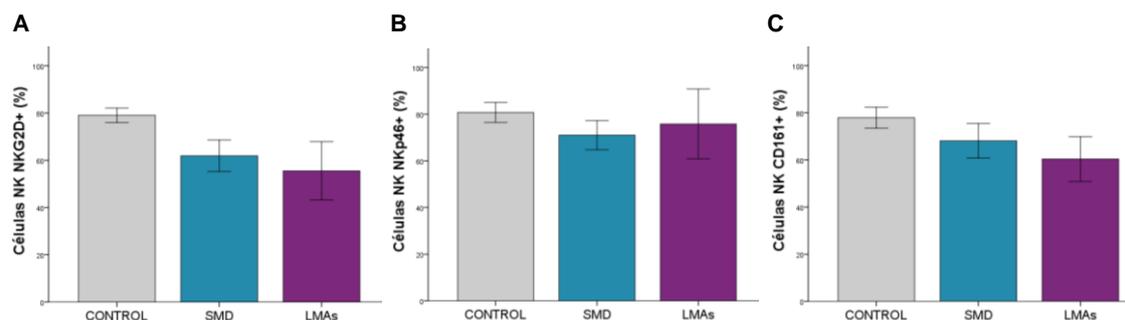


Figura 31. Porcentaje de células NK ($CD56^+$) en SP de los grupos SMD y LMAs, y en el grupo control. Los datos representan media \pm EEM del: **A)** Porcentaje de células NK positivas para el receptor NKG2D. **B)** Porcentaje de células NK positivas para el receptor NKp46. **C)** Porcentaje de células NK positivas para el receptor CD161.

Subpoblaciones de células mieloides supresoras

Además, se llevó a cabo, mediante citometría de flujo, un análisis de diferentes mecanismos que pudieran estar implicados en el SMD y que podrían generar un estado de tolerancia periférica. Por ello, se estudiaron las MDSCs, tanto de origen granulocítico como monocítico, en SP de pacientes diagnosticados de SMD y LMAs.

Tras el análisis, se observó que la frecuencia de células PMN-MDSC en SP en el SMD y en pacientes con LMAs fue mayor comparado con el grupo control (SMD vs. Control, LMAs vs. Control; $P=0.001$, $P=0.0001$; respectivamente). En cuanto a las células Mo-MDSCs, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el SMD y el grupo control; pero sí se observó un aumento en el grupo de pacientes con LMAs (LMAs vs. Control; $P=0.003$). En la **Tabla 16**, se resumen los datos obtenidos.

De forma simultánea, se realizó el estudio en el resto de las entidades (LMMC y LMA *de novo*) con respecto al grupo control. En términos generales, las diferencias observadas en el grupo LMMC con respecto al control se asemejan a las observadas en el SMD.

En relación a las subpoblaciones linfocitarias, se observa una disminución significativa en el número absoluto de células NK (LMMC vs. control: $218,5 \text{ células} \times 10^{-3}/\text{ml}$ vs. $364,5 \text{ células} \times 10^{-3}/\text{ml}$, $P=0.04$) y de linfocitos B (LMMC vs. control: $130,6 \text{ células} \times 10^{-3}/\text{ml}$ vs. $174,6 \text{ células} \times 10^{-3}/\text{ml}$, $P=0.009$), aunque en estos casos, el descenso es más moderado. Además, observamos también una disminución en el número absoluto de linfocitos T $CD4^+$ (LMMC vs. control: $814,0 \text{ células} \times 10^{-3}/\text{ml}$ vs. $996,5 \text{ células} \times 10^{-3}/\text{ml}$, $P=0.081$) pero, sin embargo, no llega a ser significativa, por lo que la ratio $CD4/CD8$ no se invierte de forma tan marcada con respecto al grupo control como ocurría en el SMD.

Destacamos que volvemos a encontrar diferencias en los subconjuntos de células NK, con un aumento de los fenotipos ($CD56^{\text{bright}}$ y $CD56^+CD16^-$; $P=0.021$; $P=0.001$, respectivamente) con respecto al control; y una disminución en los tres receptores activadores de células NK (NKG2D, NKp46 y CD161) ($P=0.031$; $P=0.029$; $P=0.044$, respectivamente).

Por otro lado, también se asemeja con el SMD en el aumento de PMN-MDSCs y Mo-MDSCs ($P=0.022$; $P=0.006$) con respecto a sujetos sanos. Este componente mielóide supresor se mantiene elevado en el grupo LMA *de novo*, donde de igual forma, encontramos un aumento en la frecuencia de dichos grupos celulares (PMN-MDSCs y Mo-MDSCs) con respecto al grupo control ($P=0.001$; $P=0.001$).

4.2.3. Diferencias en la composición de poblaciones leucocitarias en muestras de médula ósea y sangre periférica

En este apartado, se quiso investigar si existían diferencias en la distribución de las diferentes poblaciones y subpoblaciones leucocitarias entre muestras de MO y SP, en pacientes diagnosticados con SMD (MO=61; SP= 69) y aquellos con transformación leucémica (MO=12; SP= 11). Dicho estudio incluye también el análisis de 6 muestras pareadas de MO y SP de pacientes con SMD. En las **Tabla 17** se resumen los datos obtenidos.

Con respecto a la composición del microambiente en pacientes diagnosticados de SMD, se observa que el componente mielóide en SP está constituido fundamentalmente por neutrófilos (51%), monocitos (10%) y otras células mayoritariamente maduras. El componente linfocitario en SP representa el 32%, mientras que en MO representa el 17%. Por otro lado, en MO encontramos alrededor del 70% de componente mielóide y otras células de carácter inmaduro (precursores hematopoyéticos).

Lo más relevante de este estudio fue poner de manifiesto que no existen diferencias en el patrón de expresión de las diferentes subpoblaciones linfocitarias T entre muestras de MO y SP en pacientes con SMD. En la **Tabla 17**, se resumen los datos obtenidos.

Atendiendo a la distribución porcentual del conjunto linfocitario, observamos que la composición de linfocitos T en MO como en SP está formada de forma mayoritaria por células T CD3⁺, con un predominio de linfocitos T CD8⁺ sobre linfocitos T CD4⁺, y una inversión de la ratio CD4/CD8. Además, esta inversión se mantiene cuando estudiamos el microambiente medular y periférico en el grupo de pacientes autólogos, o lo que es lo mismo, no encontramos diferencias entre el componente medular y periférico cuando se observan variaciones en el cociente CD4/CD8. Por otro lado, destacamos que, dado que existe una estrecha correlación entre los valores porcentuales observados en MO y SP en el grupo de muestras pareadas, podemos extrapolar que, la linfopenia T CD4⁺ observada en SP es un reflejo de lo que ocurre en el compartimento medular.

De igual forma, en relación a la composición funcional de linfocitos T (Th1, Th17, Th22, Treg) y a las ratios estudiadas (Th1/Treg, Th1/Th17, CD8/Treg), no se observan diferencias entre ambos compartimentos; por lo que la composición funcional de los linfocitos T es similar en MO y SP ($P>0.05$). Además, se observa tanto en muestras de MO como SP, que la frecuencia de células Th1 es superior a la frecuencia de células Th17 y a su vez de células Th22. Esta composición funcional y relación linfocitaria se vuelve a mantener en el grupo de muestras autólogas.

Sin embargo, como se puede observar en la **Tabla 17**, sí observamos un aumento en la frecuencia de marcadores asociados a supresión de células T en el microambiente medular con respecto a SP, como es el aumento significativo de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ con expresión del marcador CD39 (P=0.001 y P=0.0001).

	<i>Media (%)</i>		<i>P</i>
	<i>Médula Ósea</i>	<i>Sangre Periférica</i>	
Linfocitos T			
<i>CD3</i>	69,5±2,2	68,7±2,1	0.896
<i>CD4</i>	32,0±1,5	35,7±1,5	0.104
<i>CD8</i>	32,6±1,8	28,4±1,6	0.091
Linfocitos T CD4			
<i>Th1</i>	23,7±1,7	22,4±1,5	0.601
<i>Th17</i>	13,4±1,5	14,1±1,4	0.774
<i>Th22</i>	6,7±1,5	7,0±1,0	0.234
<i>Treg</i>	7,9±0,6	7,1±0,4	0.292
<i>CD4⁺ CD39⁺</i>	10,4±1,6	5,3±0,8	0.001
Linfocitos T CD8			
<i>CD8⁺ CD39⁺</i>	10,1±1,6	4,8±1,2	0.0001
Ratio Linfocitos T			
<i>CD4/CD8</i>	1,2±0,08	1,3±0,09	0.250
<i>CD8/Treg</i>	6,4±0,3	4,7±0,1	0.896
<i>Th1/Th17</i>	2,5±0,3	2,6±0,5	0.524
<i>Th1/Treg</i>	4,4±0,7	4,3±0,5	0.903
Células NK			
<i>CD56^{Bright}</i>	12,0±2,1	8,3±1,6	0.036
<i>CD56⁺ CD16⁺</i>	64,0±4,7	73,3±2,9	0.084
<i>CD56⁺ CD16⁻</i>	13,3±4,2	8,7±2,1	0.141
<i>CD56⁻ CD16⁺</i>	10,6±2,0	8,7±1,2	0.370
Células NK CD56⁺			
<i>NKG2D</i>	76,6±3,2	61,9±3,3	0.004
<i>NKp46</i>	72,5±3,4	71,0±3,1	0.766
<i>CD161</i>	76,8±3,0	68,1±3,6	0.104

Tabla 17. Porcentajes (media±EEM) de las diferentes subpoblaciones linfocitarias en pacientes con SMD en muestras de MO y SP. P, comparación del microambiente entre muestras de MO y SP. P entre grupos mediante T de Student.

Otro dato relevante y a destacar del estudio es que, a diferencia de lo observado en el conjunto celular T, sí hemos encontrado diferencias en relación al componente NK. Encontramos que las proporciones de células NK con fenotipo CD56^{Bright} varían en MO con respecto a SP, donde se observa un aumento de este fenotipo no citotóxico en el compartimento medular. Además, se observa una mayor presencia del marcador de activación NKG2D en MO con respecto a SP (P=0.004) (**Tabla 17**).

Por lo tanto, nuestros datos revelan que la composición celular del paquete linfocitario en MO en el SMD, es un fiel reflejo de lo que existe en SP; a excepción de las células NK y de algunos marcadores de activación de éstas.

Paralelamente, el estudio se realizó para el resto de entidades clínicas. El análisis llevado a cabo en pacientes con LMAs reveló que no existen diferencias a nivel del microambiente tumoral entre muestras de MO y SP para las subpoblaciones linfocitarias (linfocitos T y NKs) y la composición funcional de células T; salvo para la expresión del receptor activador NKG2D en células NK, donde igualmente, encontramos una mayor expresión de éste en el microambiente medular ($P=0.028$).

En relación a la LMMC, no se observaron diferencias en las diferentes subpoblaciones de células T y células NK estudiadas. De igual forma ocurre en la LMA *de novo*, salvo para las células NK, donde se observa una mayor proporción con fenotipo inmaduro CD56^{Bright} en el microambiente medular ($P=0.033$).

4.2.4. Distribución de las poblaciones leucocitarias en las distintas entidades clínicas OMS 2017

En este estudio pretendíamos evaluar si existían diferencias significativas entre las cuatro entidades clínicas definidas por la OMS e incluidas en el estudio (SMD, LMAs, LMMC y LMA *de novo*) en cuanto a la composición de las diferentes poblaciones inmunitarias. El estudio se llevó a cabo de forma independiente en muestras de MO y SP.

En MO, las diferencias observadas entre las cuatro entidades clínicas se concentran en las diferentes poblaciones leucocitarias: porcentaje de blastos medular, porcentaje de monocitos, promonocitos y serie mieloide madura.

Por el contrario, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el conjunto celular relacionado con la respuesta inmunitaria. A continuación, se detallan los resultados más relevantes del estudio:

Cuando se estudió el conjunto celular T, se observó una misma composición en cuanto a la frecuencia (%) de poblaciones linfocitarias (CD3, CD4, CD8) entre los cuatro grupos. En relación al componente funcional de linfocitos T (Th1, Th17, Th22, Treg) no existieron diferencias significativas entre los distintos grupos clínicos, y tanto las ratios (Th1/Th17 y Th1/Treg) son similares entre los grupos. Estos resultados descritos para el compartimento medular se reproducen en SP, donde la composición porcentual del paquete linfocitario T no difiere entre el SMD y el resto de entidades clínicas ($P>0.05$).

En cuanto a las poblaciones de células NK entre las cuatro entidades clínicas, se llevó a cabo también como en análisis anteriores, el estudio de las subpoblaciones celulares NK y de la frecuencia de expresión de sus receptores activadores/inhibidores. Nuestros resultados indican atendiendo a las distintas subpoblaciones de células NK, que el microambiente medular es similar y no difiere entre las cuatro entidades ($P>0.05$). Estos resultados descritos para el compartimento medular se reproducen, de igual forma, en SP.

Por otro lado, se conoce que diversas poblaciones celulares presentes en el microambiente tumoral contribuyen a crear un estado de inmunosupresión, alterando la efectividad de la respuesta inmunitaria. Por esta razón, se estudió también el conjunto de células mieloides supresoras presentes en SP en las cuatro entidades clínicas. En este caso, al contrario que para las poblaciones de células T y NK, sí hemos encontrado diferencias significativas relevantes cuando analizamos el componente mieloide supresor.

En la **Tabla 18** se muestra la frecuencia media (%) de ambos tipos celulares (PMN-MDSC y Mo-MDSC) en SP para cada uno de los cuatro grupos. Destacamos que, la frecuencia media de MDSCs es superior en el grupo LMAs que en el resto de entidades.

	(%)				<i>P</i>
	<i>SMD</i>	<i>LMAs</i>	<i>LMMC</i>	<i>LMA de novo</i>	
% PMN-MDSCs	0,13±0,02	1,29±0,37	0,23±0,13	0,27±0,09	0.0001
% Mo-MDSCs	14,25±2,7	30,35±9,8	4,7±1,8	20,50±7,5	0.002

Tabla 18. Porcentajes (media±EEM) de células MDSC (PMN-MDSC) y monocítico (Mo-MDSC) en SP en los grupos: SMD, LMAs, LMMC y LMA de novo. P, comparación entre las cuatro entidades clínicas mediante el test no paramétrico Krustal-Wallis.

El análisis de comparaciones múltiples (test no paramétrico Krustal-Wallis), reveló diferencias significativas en la frecuencia de MDSCs entre los cuatro grupos, con una P valor general, recogida en la **Tabla 18**, para las células PMN-MDSC (P=0.0001) y para las células Mo-MDSC (P=0.002). Llama la atención que, cuando se llevaron a cabo las comparaciones dos a dos (test no paramétrico Mann-Whitney), las diferencias encontradas principalmente se centraron en el grupo LMAs con respecto al resto de entidades:

En relación a las células PMN-MDSC se observaron diferencias en los rangos promedio entre los grupos SMD vs. LMAs (P=0.0001), LMMC vs. LMAs (P=0.022) y LMAs vs. LMA de novo (P=0.03), con rangos promedio superiores en el grupo LMAs. En relación a las células Mo-MDSC, las diferencias observadas se concentran principalmente entre los grupos LMAs vs. SMD (P=0.013) y LMAs vs. LMMC (P=0.001), y de igual forma, con un aumento en el grupo de pacientes con LMAs.

Inicialmente, los resultados obtenidos sugieren un componente mieloide supresor más evidente en las etapas tardías que en los estadios más iniciales de la enfermedad. Como veremos posteriormente, estos resultados se correlacionan con la blastosis en SP y con diferentes índices pronósticos.

4.2.5. Impacto del microambiente tumoral en pacientes con SMD sobre la progresión de la enfermedad

A continuación, se quiso investigar si la progresión de la enfermedad transcurre con cambios fenotípicos relevantes en las diferentes poblaciones inmunitarias. Para ello, se llevó a cabo un estudio de pacientes diagnosticados con SMD en diferentes fases de la progresión de la enfermedad.

En base a esto, los pacientes fueron divididos en tres grupos en relación al porcentaje de blastos medulares, según los criterios de la clasificación OMS 2017: SMD en fase temprana (<5% blastos MO), pacientes SMD en fase avanzada (5-19% blastos MO; SMD EB-1, SMD EB-2) y finalmente, pacientes que debutan con LMAs (>20 % blastos MO).

En un principio, los análisis estadísticos llevados a cabo en muestras de MO no revelaron diferencias significativas en las diferentes poblaciones celulares entre los grupos SMD vs. LMAs ($P > 0.05$). Estos resultados se mantuvieron cuando los pacientes fueron agrupados de acuerdo con la clasificación anteriormente establecida (fase temprana SMD, fase tardía SMD y LMAs). En base a esto, destacamos que no se observaron diferencias significativas a nivel medular en la composición del microambiente tumoral en base a las distintas poblaciones inmunitarias (linfocitos T y células NK) en MO ($P > 0.05$).

Los resultados más relevantes del estudio se obtuvieron en SP. El análisis llevado a cabo en muestras de SP reveló diferencias en el conjunto mieloide supresor, con afectación de las poblaciones mieloides granulocíticas y monocíticas; y de las células NK.

Inicialmente, los análisis en SP entre los grupos SMD vs. LMAs mostraron diferencias en la frecuencia de células PMN-MDSC ($P = 0.0001$) y Mo-MDSC ($P = 0.013$). Estos resultados se confirmaron cuando dividimos a los pacientes según la clasificación aquí establecida (fase temprana SMD, fase tardía SMD y LMAs). De forma general, estas diferencias se observaron entre la fase temprana y fases avanzadas de la enfermedad.

La **Tabla 19** refleja los valores medios del porcentaje de blastos, células MDSC y la frecuencia de expresión del receptor NKG2D sobre células NK, obtenidos en los diferentes estadios de la enfermedad, en muestras de SP. De igual forma, la **Tabla 19** muestra los niveles de significación P_1 , P_2 y P_3 , obtenidos al llevar a cabo las comparaciones dos a dos (test no paramétrico Mann-Whitney) para dichas variables de forma independiente entre los tres estados de progresión en el SMD establecidos (fase temprana SMD, fase avanzada SMD y LMAs).

Como se puede observar, el porcentaje de blastos en SP y la frecuencia de células (PMN-MDSCs y Mo-MDSCs) aumentan conforme progresa el SMD; alcanzando valores medios superiores en la LMAs en comparación con estados precoces de la enfermedad.

	<i>Fase Temprana SMD</i>	<i>Fase Avanzada SMD</i>	<i>LMAs</i>	<i>P₁</i>	<i>P₂</i>	<i>P₃</i>
% Células CD34 ⁺	0,35±0,1	5,5±1,3	27,37±3,5	0.0001	0.0001	0.0001
% PMN-MDSCs	0,1±0,01	0,3±0,07	1,3±0,9	0.011	0.0001	0.037
% Mo-MDSCs	8,4±2,1	33,2±0,4	30,4±9,8	0.002	0.001	0.702
% NKs NKG2D ⁺	68,7±3,4	43,8±7,0	55,5±6,1	0.007	0.063	0.165

Tabla 19. Porcentajes (media±EEM) de células CD34⁺, MDSCs y NKs NKG2D⁺ en muestras de SP, en la fase temprana SMD, fase avanzada SMD y LMAs. *P₁*, significación estadística entre los grupos (Fase temprana vs. Fase avanzada); *P₂*, significación estadística entre los grupos (Fase temprana vs. LMAs); *P₃*, significación estadística entre los grupos (Fase avanzada vs. LMAs). *P* entre grupos mediante U de Mann Whitney.

Adicionalmente, se observó una correlación positiva entre la frecuencia de células Mo-MDSC y el porcentaje de blastos en SP (Spearman R=0.564, p =0.00001).

Sin embargo, en relación a las células NK, cabe destacar que los resultados obtenidos en cuanto al receptor activador NKG2D son opuestos al conjunto supresor, presentando valores medios inferiores en fases avanzadas de la enfermedad, como se puede observar en la tabla anterior (**Tabla 19**). Esta disminución es significativa cuando se compara la fase inicial SMD vs. fase tardía SMD (P=0.007). Además, encontramos una correlación inversa entre la frecuencia de receptor NKG2D y el porcentaje de blastos en SP (Spearman R= -0.323, P=0.042).

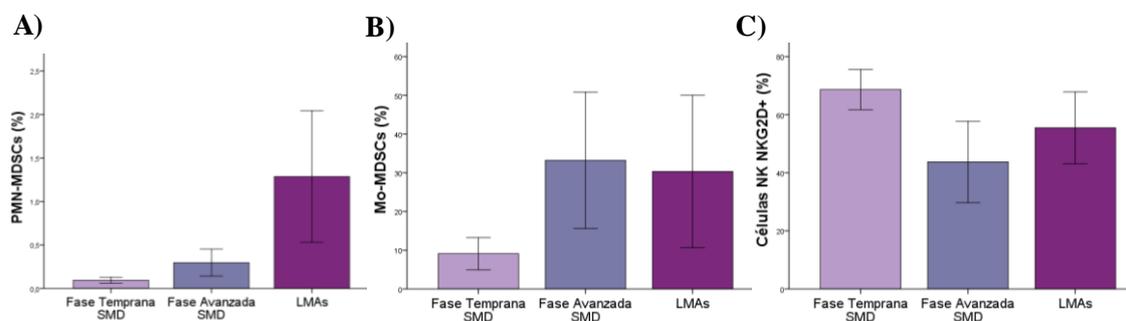


Figura 32. Gráficos en los que se representan las frecuencias de diferentes poblaciones celulares en SP, en función de la progresión de la enfermedad (fase temprana SMD, fase avanzada SMD y LMAs). Frecuencia (%) (Media±EEM) de células PMN-MDSC (A), Mo-MDSCs (B), y receptores NKG2D en células NK CD56⁺ (C). Comparación entre grupos mediante el test no paramétrico U Mann-Whitney.

Por otro lado, el análisis llevado a cabo en el (**Apartado 4.2.1.2. estudio de poblaciones linfocitarias**) mostró que los valores absolutos de células NK (células x10⁻³/ml) en SP en los grupos SMD y LMAs considerados por separado, fueron significativamente inferiores a la de los individuos control. Sin embargo, aunque los valores absolutos en el grupo LMAs fueron ligeramente inferiores a los observados en el SMD, no se observaron diferencias significativas con respecto a la progresión leucémica (P>0.05).

Concluimos que, de forma general, la progresión y transformación leucémica se acompaña de cambios sustanciales en el conjunto mieloide supresor y en las células NK, sin afectar a la población linfocitaria T.

4.2.6. Estudio de las poblaciones leucocitarias en relación a marcadores pronósticos (IPSS e IPSS-R), y riesgo citogenético

Otro de los objetivos presentes en el estudio consistió en analizar si existían diferencias en la composición de las subpoblaciones leucocitarias presentes en el microambiente tumoral de pacientes diagnosticados con SMD en base a los sistemas de clasificación pronóstica, IPSS e IPSS-R. Es decir, se quiso estudiar si los pacientes que presentaban un mayor riesgo de progresión leucémica presentaban diferencias en cuanto a la composición inmunitaria.

El estudio se realizó en el grupo de pacientes con SMD (n=130) a los que inicialmente se les llevó a cabo el estudio del microambiente tumoral, en muestras de MO y SP. En relación a los grupos IPSS/IPSS-R, los pacientes se agruparon en dos grupos (Alto Riesgo vs. Bajo Riesgo), basándonos en un amplio abanico de estudios previos, tal y como se detalla a continuación:

Según el *score* IPSS, los pacientes fueron divididos en dos grupos en función de las diferentes categorías de riesgo: **Alto Riesgo IPSS: AR (Alto Riesgo) + INT-2 (Intermedio-2) vs. Bajo Riesgo IPSS: INT-1 (Intermedio-1) + BR (Bajo Riesgo) + MBR (Muy Bajo Riesgo).**

De igual forma, de acuerdo con la categoría de riesgo IPSS-R, los pacientes fueron divididos en dos grupos de acuerdo al riesgo de progresión: **Alto Riesgo IPSS-R: MAR (Muy Alto Riesgo) + AR (Alto Riesgo) + INT (Intermedio) vs. Bajo Riesgo IPSS-R: BR (Bajo Riesgo) + MBR (Muy Bajo Riesgo).**

4.2.6.1. Score IPSS

Para llevar a cabo el análisis según la clasificación anterior establecida, los pacientes se agruparon en: **Alto Riesgo IPSS** (29 pacientes, 23,4%) vs. **Bajo Riesgo IPSS** (95 pacientes, 76,6%).

Los análisis llevados a cabo en MO revelaron que los pacientes con Alto Riesgo de progresión presentaban una disminución en la frecuencia de células Treg (P=0.037). Sin embargo, los datos más relevantes los encontramos en SP.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos. Como se observa en la **Tabla 20**, el grupo de Alto Riesgo IPSS presenta una mayor blastosis en comparación con el de Bajo Riesgo IPSS. Del análisis de las poblaciones celulares debe destacarse lo siguiente:

Los pacientes de Bajo Riesgo de progresión según *score* IPSS presentan un aumento en la frecuencia de células Th1 (P=0.041) y un aumento en la frecuencia de marcadores de activación (NKG2D) de células NK (P=0.009), en comparación con los de riesgo elevado. Además, en los pacientes de SMD con Alto Riesgo IPSS, se vuelve a confirmar la menor frecuencia de células Treg (P=0.022) en SP.

Sin embargo, como se observa en la **Tabla 20**, encontramos con una mayor significación, un aumento en la proporción de células supresoras de componente mieloide, PMN-MDSCs (P=0.002) y Mo-MDSCs (P=0.001), que podrían contribuir a explicar el Alto Riesgo de progresión en estos pacientes.

Por otra parte, cabe destacar que no se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos pronósticos para las células Th17 ni Th22 (P>0.05). Tampoco se observaron diferencias significativas para las diferentes subpoblaciones de células NK, ni para el resto de sus receptores activadores e inhibidores (P>0.05).

	<i>Media (%)</i>		<i>P</i>
	<i>Alto Riesgo IPSS</i>	<i>Bajo Riesgo IPSS</i>	
<i>Células CD34⁺</i>	<i>5,7±1,4</i>	<i>0,3±0,1</i>	<i>0.0001</i>
<i>Mo-MDSCs</i>	<i>36,0±8,5</i>	<i>8,4±2,0</i>	<i>0.001</i>
<i>PMN-MDSCs</i>	<i>0,3±0,07</i>	<i>0,07±0,01</i>	<i>0.002</i>
<i>Treg</i>	<i>5,5±0,7</i>	<i>7,6±0,4</i>	<i>0.022</i>
<i>Th1</i>	<i>17,8±1,9</i>	<i>23,2±1,5</i>	<i>0.041</i>
<i>NKs NKG2D⁺</i>	<i>44,3±7,2</i>	<i>68,7±3,5</i>	<i>0.009</i>

Tabla 20. Porcentajes (media±EEM) de células CD34⁺, MDSCs, Treg y Th1; y NKs NKG2D⁺ en SP, de pacientes con SMD de Alto Riesgo y Bajo Riesgo de progresión según score IPSS. *P*, significación estadística entre el grupo Alto Riesgo y Bajo Riesgo. *P* entre grupos mediante U de Mann Whitney.

4.2.6.2. Score IPSS-R

De igual forma, para el estudio según IPSS-R, los pacientes se agruparon de acuerdo a la clasificación anterior establecida: **Alto Riesgo IPSS-R** (42 pacientes, 34,4%) vs. **Bajo Riesgo IPSS-R** (80 pacientes, 65,6%).

Al igual que para el score IPSS, se obtuvo en MO un descenso de la frecuencia de células Treg (P=0.024) en pacientes de Alto Riesgo; y, además, una ratio T CD4/CD8 mayor (P=0.039) en comparación con los de Bajo Riesgo. De igual forma, volvemos a no obtener diferencias significativas entre los grupos IPSS-R para el resto de las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias estudiadas (P>0.05).

Resaltar que, en los análisis llevados a cabo en SP, el componente mieloide supresor sigue presente en pacientes con elevado riesgo de transformación, incluso al introducir parámetros citogenéticos. Tal y como podemos observar en la **Tabla 21**, existe un predominio importante de células mieloides de origen granulocítico (P=0.015) y monocítico (P=0.004) en el SMD de alto riesgo IPSS-R, en comparación con el grupo de Bajo Riesgo. Además, resaltamos que al igual que ocurre en MO, se observa una ratio T CD4/CD8 mayor en pacientes de Alto Riesgo (P=0.019), por lo que podemos observar que la linfopenia T CD4⁺ es más marcada en este último grupo de pacientes.

	<i>Media (%)</i>		<i>P</i>
	<i>Alto Riesgo IPSS-R</i>	<i>Bajo Riesgo IPSS-R</i>	
<i>Células CD34⁺</i>	<i>2,8±0,7</i>	<i>0,3±0,2</i>	<i>0.0001</i>
<i>Mo-MDSCs</i>	<i>25,8±5,3</i>	<i>6,2±1,6</i>	<i>0.004</i>
<i>PMN-MDSCs</i>	<i>0,2±0,04</i>	<i>0,06±0,01</i>	<i>0.015</i>
<i>Ratio CD4/CD8</i>	<i>1,6±0,1</i>	<i>1,3±0,1</i>	<i>0.019</i>

Tabla 21. Porcentajes (media±EEM) de células CD34⁺ y MDSCs en muestras de SP, de pacientes con SMD de Alto y Bajo Riesgo de progresión según score IPSS-R. *P*, significación estadística entre el grupo Alto Riesgo y Bajo Riesgo IPSS-R. *P* entre grupos mediante U de Mann Whitney.

4.2.6.3. Riesgo Citogenético

En esta línea, se quiso también investigar si existía una posible relación entre la presencia de diversas alteraciones cariotípicas en el clon tumoral y determinadas poblaciones inmunitarias presentes en el microambiente. Para llevar a cabo el estudio, los pacientes con SMD se agruparon según los diferentes grupos de riesgo citogenéticos establecidos por el grupo de Schanz.

En base a esto, los estudios del microambiente medular y periférico se llevaron a cabo en un total de 111 pacientes diagnosticados de SMD, y agrupados según la anterior clasificación: **Riesgo Muy Pobre** (10 pacientes, 9%), **Riesgo Intermedio** (30 pacientes, 27%) y **Riesgo Bueno** (71 pacientes, 64%). En algunos casos, los pacientes no se pudieron incluir en ningún grupo debido a la no disponibilidad de los datos o a la falta de crecimiento celular en cultivo (ausencia de metafases disponibles).

El estudio llevado a cabo en MO revela un aumento de blastos en el grupo de pacientes que presentan un mayor riesgo citogenético (Muy Pobre vs. Bueno, $P=0.034$). Los resultados vuelven a revelar en MO una menor frecuencia de células Treg ($P=0.021$) en pacientes que presentan cariotipos adversos, en comparación con el grupo de pacientes que presentan cariotipos de mejor pronóstico (Muy Pobre vs. Intermedio, $P=0.021$; Muy Pobre vs. Bueno, $P=0.013$).

La disminución en la frecuencia de células Treg en pacientes con pronóstico desfavorable se mantiene con los tres sistemas de clasificación estudiados: IPPS, IPSS-R y en función del riesgo citogenético. Por los que podemos concluir que, en base a los resultados obtenidos, las células Treg no son un parámetro relacionado con la progresión en el SMD.

De igual forma, los resultados más relevantes los volvemos a encontrar en SP. En la **Tabla 22**, se reflejan los valores medios del porcentaje de blastos, células Mo-MDSC y frecuencia de los receptores NKG2D e KIR2DL1 expresados por células NK, en los grupos de pacientes divididos en base a la complejidad del cariotipo y, por consiguiente, riesgo de progresión.

En base a que el control inmunitario a nivel periférico es ejercido principalmente por las células NK, cabe resaltar, como se puede observar en la **Tabla 22**, que existe una disminución en la frecuencia del receptor activador de células NK, NKG2D en SP, junto con un aumento en la frecuencia del receptor inhibidor KIR2DL1, en el grupo de pacientes que presentan cariotipos complejos (Muy Pobre). Adicionalmente, se observa una mayor frecuencia de células blásticas en SP en el grupo que presentan cariotipos adversos.

	<i>Muy Pobre</i>	<i>Intermedio</i>	<i>Bueno</i>	<i>P₁</i>	<i>P₂</i>	<i>P₃</i>
% células CD34 ⁺	6,6±2,7	4,6±2,1	0,4±0,1	0.041	0.0001	0.0001
% Mo-MDSCs	32,9±17,5	22,1±6,7	13,9±2,0	0.497	0.069	0.05
% NKs NKG2D ⁺	35,8±12,9	58,9±6,1	67,3±3,4	0.090	0.025	0.172
% NKs KIR2DL1 ⁺	21,8±6,8	7,6±3,3	13,8±3,5	0.043	0.095	0.080

Tabla 22. Porcentajes (media±EEM) de células CD34⁺, Mo-MDSCs y NKs NKG2D⁺ y KIR2DL1⁺, en muestras de SP en base al riesgo citogenético. P₁, significación estadística entre los grupos (Muy Pobre vs. Intermedio); P₂, significación estadística entre los grupos (Muy Pobre vs. Bueno); P₃, significación estadística entre los grupos (Intermedio vs. Bueno). P entre grupos mediante U de Mann Whitney.

Resaltamos, como se refleja en la **Tabla 22**, la presencia del componente mielóide supresor. Este componente se repite con los tres índices de clasificación pronóstica estudiados, donde encontramos un aumento en el grupo de pacientes con pronóstico desfavorable. Por lo que, a la vista de estos resultados, podemos concluir que las células MDSC constituyen a nivel periférico, un parámetro indicativo de progresión en pacientes con SMD.

4.2.7. Estudio de las poblaciones leucocitarias en SMD Hipoplásicos e Hiperplásicos

Otra forma posible de abordar el estudio consistió en analizar la composición linfocitaria en los diferentes tipos de SMD, según la celularidad presente en MO. Se sabe que la frecuencia de SMD Normo/Hipercelulares en la población es muy elevada, en torno al 70%; sin embargo, los SMD-h se encuentran en una forma minoritaria. Atendiendo a esto, el número total de casos Hipoplásicos en nuestro grupo de estudio fue muy limitado (n=8), en contraposición al número de casos observado en el grupo SMD Hiperplásico (n= 158).

A priori, con la limitación de un tamaño muestral pequeño, los análisis estadísticos no revelaron diferencias significativas en relación con las diferentes poblaciones inmunitarias del entorno tumoral (MO y SP) entre los dos grupos de estudio (SMD-NH vs. SMD-h; P>0.05).

Estos resultados iniciales sugieren que la composición (%) leucocitaria y linfocitaria del microambiente medular y/o periférico no varía entre el grupo de pacientes que presenta una MO Normo-Hiper celular frente al grupo con MO Hipocelular, aunque dicha celularidad se encuentre disminuida en número absoluto en éste último.

4.3. ESTUDIO DEL PERFIL MUTACIONAL

La adquisición de alteraciones genéticas por la célula tumoral le confiere una ventaja proliferativa sobre el resto de la celularidad normal medular, contribuyendo así a la expansión clonal y a la progresión neoplásica. En base a esto, se quiso analizar el perfil mutacional de los pacientes incluidos en nuestro estudio. Para ello, el estudio de mutaciones somáticas se llevó a cabo mediante técnicas de NGS, en muestras de MO y/o SP, en un total de 125 pacientes. Éstos fueron clasificados en diferentes grupos según la clasificación OMS 2017: 83 pacientes diagnosticados con SMD (50 varones, 33 mujeres; media de edad 72 años) y 14 pacientes diagnosticados con LMAs (10 varones, 4 mujeres; media de edad 72 años). Adicionalmente, dicho estudio genético se llevó también a cabo en otras neoplasias mieloides, tales como: LMMC (n=13) y LMA *de novo* (n=15).

4.3.1. Mutaciones somáticas en pacientes con SMD

Dentro del grupo de pacientes con SMD y LMAs (n=97), se identificaron mutaciones somáticas en 76 pacientes estudiados (78,4%), que afectaban a 30 genes diferentes. Por el contrario, no se detectaron mutaciones en los genes estudiados en 21 de los 97 pacientes (21,6%) incluidos en el estudio. La siguiente tabla (**Tabla 23**) recoge el número total de mutaciones acumuladas y la media de las VAFs detectadas en cada gen en el total de pacientes con mutaciones somáticas. En general, la carga alélica promedio del total de mutaciones identificadas en cada gen era elevada, sugiriendo una alta representación de estas mutaciones en las muestras analizadas.

GEN	N° MUTACIONES TOTALES	FRECUENCIA ALÉLICA (VAF)	
		(% promedio)	Rango
	189		
<i>TET2</i>	29	40	12-84.2
<i>SF3B1</i>	21	32	9.6-49.1
<i>ASXL1</i>	15	28	16.8-48.9
<i>DNMT3A</i>	14	30	7-47
<i>RUNX1</i>	14	42	9.2-63.9
<i>TP53</i>	13	44	7.2-88.7
<i>EZH2</i>	11	58	11.4-93.6
<i>U2AF1</i>	8	28	3.1-40.4
<i>ZRSR2</i>	7	69	21.4-95
<i>CUX1</i>	7	42	36-51.1
<i>SRSF2</i>	6	30	8.7-53.2
<i>BCOR</i>	6	29	14.2-49.9
<i>IDH2</i>	4	43	30.7-46.4
<i>CBL</i>	4	7	5.5-13.4
<i>ETV6</i>	4	29	10.2-52.6
<i>PTPN11</i>	4	22	7.1-41.2
<i>NRAS</i>	3	19	4.3-42
<i>SETBP1</i>	3	28	9.1-32
<i>FLT3</i>	2	20	8.3-31.4
<i>JAK2</i>	2	18	6-30.4
<i>KRAS</i>	2	26	12.7-38.8
<i>KDM6A</i>	1	50	
<i>ATRX</i>	1	49	
<i>KIT</i>	1	7	
<i>IDH1</i>	1	43	
<i>STAG2</i>	1	90	
<i>WT1</i>	1	50	
<i>BRAF</i>	1	8	
<i>ABL1</i>	1	10	
<i>MPL</i>	1	43	

Tabla 23. Carga tumoral por gen mutado (promedio, y rango) en el grupo de pacientes con SMD y LMAs.

No resultó infrecuente encontrar más de una variante somática en el mismo gen en varios pacientes, sobre todo en genes de gran tamaño como *TET2*. De los 23 casos con mutaciones en *TET2*, 6 de ellos (20%) presentaban dos mutaciones afectando a su secuencia.

A continuación, se determinó la frecuencia de mutaciones somáticas en el grupo de pacientes estudiados (SMD y LMAs). Como se puede observar en la siguiente figura (*Figura 33*), el gen que aparece mutado con mayor frecuencia es *TET2*, con un porcentaje del 25% sobre el total de casos estudiados. Seguidamente, otros genes mutados con alta frecuencia en nuestro grupo de estudio fueron *SF3B1* (23%), *ASXL1* (16%), *RUNX1* (15%) y *TP53* (14%).

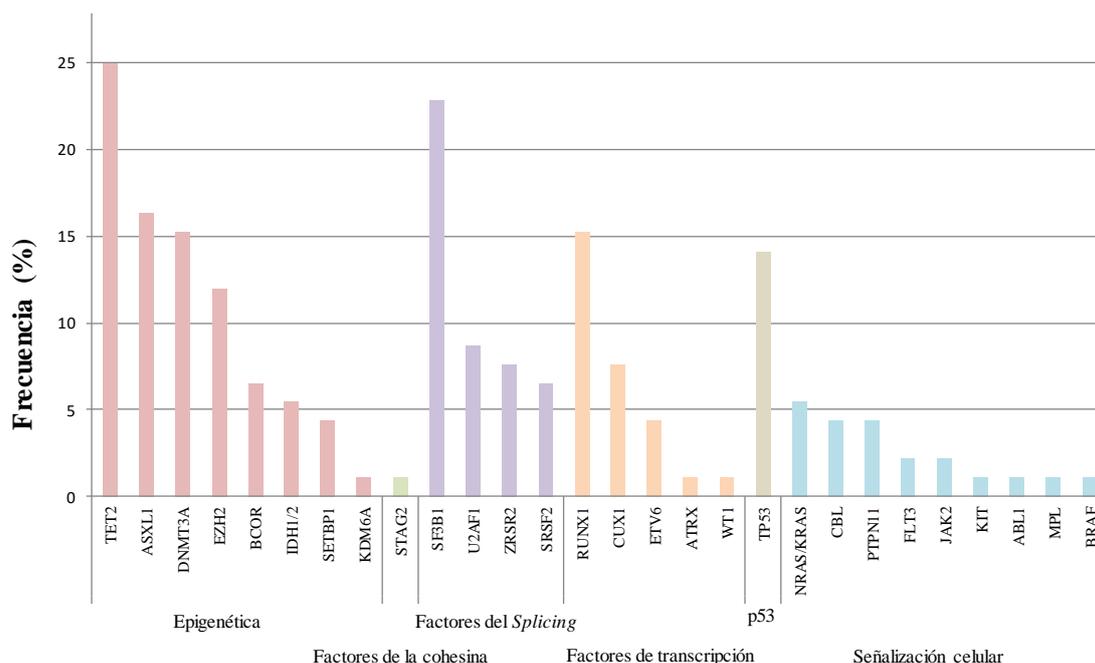


Figura 33. Frecuencia de mutación de los genes analizados en el grupo de pacientes con SMD y LMAs en función de la vía celular en la que participan.

Por otro lado, se agruparon los genes estudiados según la vía celular en la que participan. Encontramos que, del total de genes que aparecen mutados, los que aparecen con mayor frecuencia están involucrados en la regulación epigenética del ADN (43 %), seguido de genes que participan en el procesamiento del ARNm (22%), de secuencias génicas que codifican factores de transcripción (16%) y relacionados con la señalización celular (13%). Destacar que las mutaciones en *TP53* también aparecen muy representadas en el grupo de estudio (7%). Por el contrario, observamos una menor frecuencia de mutaciones que afectan a genes que codifican cohesinas (1%).

4.3.2. Estudio del perfil mutacional en relación con la progresión de la enfermedad

Así mismo, dentro del grupo de pacientes con SMD y LMAs, se llevó a cabo un estudio del perfil mutacional en base a los diferentes estados de progresión de la enfermedad.

Para ello, los pacientes fueron divididos según la clasificación OMS 2017; tal y como se indica a continuación: 55 pacientes en fases iniciales SMD (<5% blastos MO) (11 SMD del(5q), 44 SMD-DM); 28 pacientes en fase avanzada SMD (18 SMD EB-1, 10 SMD EB-2) y finalmente, 14 pacientes con LMAs.

En primer lugar, se observó que el 78,4% del grupo de pacientes con SMD y LMAs presentaban mutaciones somáticas en los genes estudiados. Según los diferentes estadios de progresión de la enfermedad, el 72,7% de los pacientes (40 de 55) en la fase inicial SMD presentaban mutaciones, mientras que, en la fase avanzada, el 82,2% de los pacientes (23 de 28 pacientes) y en el grupo LMAs, el 92,8% (13 de 14), fueron los que presentaron mutaciones somáticas.

El número medio de mutaciones totales (*score* mutacional) en el grupo SMD fue de 1,7 mutaciones somáticas detectadas. El *score* mutacional medio fue similar entre los grupos SMD en fase temprana y fase avanzada de la enfermedad (1,6 mutaciones SMD fase inicial; 1,8 mutaciones SMD fase tardía; $P>0.05$). Sin embargo, sí se observaron diferencias significativas en el número medio de mutaciones totales cuando comparamos los grupos SMD con respecto al grupo LMAs, con una media de 4,5 mutaciones en este último (SMD fase inicial vs. LMAs, $P=0.0001$; SMD fase tardía vs. LMAs, $P=0.001$).

De acuerdo con esto, observamos que el 72,2% de los pacientes en la fase temprana y el 75% de los pacientes en la fase tardía SMD presentaban ≤ 2 mutaciones totales, en comparación con el grupo LMAs (14,3% de los pacientes) ($P=0.0007$; $P=0.0002$, respectivamente). Por el contrario, en la LMAs, el 85,7% presentaron un *score* mutacional (≥ 3 mutaciones totales) en comparación con el 27,8% de los pacientes en la fase temprana SMD ($P=0.0007$) y el 25% de los pacientes en la fase tardía SMD ($P=0.0002$).

Además, las VAFs observadas en las fases temprana y tardía de la enfermedad, fueron menores al 30% en el 45,9% y 21,1% de los casos, respectivamente; en comparación con el grupo LMAs, 7,7% de los casos (Fase temprana SMD vs. LMAs; $P=0.018$). Resaltamos que, en este último grupo (LMAs), las VAFs detectadas fueron mayores al 30% en el 92,3% de los casos.

Centrándonos en el perfil mutacional dentro de los grupos de progresión, observamos que, en las fases iniciales, un elevado porcentaje de los pacientes SMD presentaron mutaciones en genes de no-alto riesgo molecular (N-HMR) (24 de 40; 60%), relacionados principalmente con los procesos de metilación del ADN (*TET2*, *DNMT3A*) y *splicing* del ARN (*SF3B1*, *ZRSR2*, *U2AF1*, *SRSF2*), en comparación con la fase avanzada de la enfermedad, donde el 26,1% de los pacientes (6 de los 23) presentaron únicamente mutaciones en genes N-HMR, $P=0.019$).

Además, observamos que una elevada proporción de pacientes en la fase tardía SMD, presentaban mutaciones en genes HMR (*TP53*, *ETV6*, *ASXL1*, *RUNX1*, *EZH2*) (17 de 23; 73,9%) en comparación con el grupo de pacientes en la fase temprana (16 de 40; 40%) ($P=0.019$). Destacamos que, 12 de los 17 pacientes en la fase avanzada, presentaban mutaciones en *TP53*, y a su vez, 9 de estos 12 pacientes mostraban *TP53* como mutación aislada. Además, las VAFs detectadas en genes HMR de pacientes en fases tardías de la enfermedad, fueron mayores del 40% en 13 de los 17 pacientes (76,5%); mientras que en la fase temprana SMD, las VAFs detectadas fueron menores al 40% en 13 de los 18 pacientes (72,2%).

El grupo LMAs se caracterizó por presentar una alta frecuencia de pacientes (9 de 13; 69,2%) con mutaciones asociadas a riesgo molecular, mientras que, por el contrario, se observó una baja frecuencia (7,1%) de pacientes con ausencia de mutaciones totales.

Del estudio se concluye que, la fase temprana del SMD se caracteriza, fundamentalmente, bien por la ausencia de mutaciones somáticas o bien por la presencia de mutaciones no asociadas a riesgo molecular. En cambio, en la fase avanzada de la enfermedad y en la transformación leucémica (LMAs), prevalecen mutaciones en genes HMR; añadiendo, además, que en la LMAs se observa un aumento en el *score* mutacional (≥ 3 mutaciones totales) con respecto a los grupos SMD.

A continuación, en la **Figura 34**, se muestra la distribución de los pacientes con SMD en función de características del perfil mutacional (Ausencia de mutaciones somáticas, ausencia/presencia de mutaciones en genes HMR), dentro de cada uno de los estadios de progresión de la enfermedad establecidos.

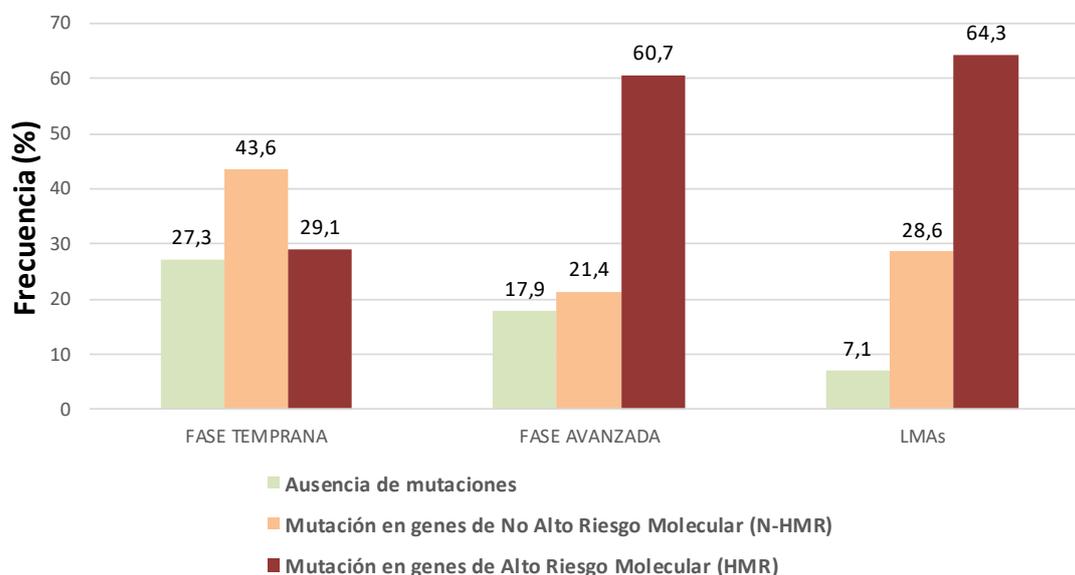


Figura 34. Distribución de los pacientes con SMD en función del perfil mutacional en los diferentes grupos de la enfermedad (Fase temprana SMD (n=55), fase avanzada SMD (n=28), LMAs (n=14)).

4.3.3. Estudio del perfil mutacional en relación con *score* pronóstico IPSS-R, y riesgo citogenético

Considerando las variables clínicas pronósticas reconocidas en el SMD y englobadas en el índice pronóstico IPSS-R (citopenias en SP, citogenética, y porcentaje de blastos en MO), agrupamos a los pacientes con SMD (n=83) en dos categorías de riesgo: Bajo riesgo (IPSS-R muy bajo y bajo) (n=45) y Alto riesgo (IPSS-R intermedio, alto y muy alto) (n= 38).

De forma general, se observa que la mayoría de los pacientes (81,5%) en el estado temprano de la enfermedad, presentaban IPSS-R de Bajo Riesgo; sin embargo, en el estado avanzado de la misma, encontramos que el 100% de los pacientes presentaban IPSS-R asociados a alto riesgo.

En relación al perfil mutacional, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos IPSS-R bajo riesgo vs. IPSS-R alto riesgo en relación al *score* mutacional, $P>0.05$. En cuanto a la distribución de las mutaciones en relación a dichos grupos de riesgo, en los pacientes con SMD de bajo riesgo (IPSS-R muy bajo, bajo), los genes que aparecían mutados con mayor frecuencia pertenecían a la vía de la metilación del ADN (*TET2*, *DNMT3A*) y a la del *splicing* del ARN (*SF3B1*, *ZRSR2*) (20 de 45; 44,5%), considerados genes N-HMR. Sin embargo, en pacientes clasificados como SMD de alto riesgo (IPSS-R intermedio, alto y muy alto), se observaba una mayor proporción de mutaciones en genes asociados a riesgo molecular elevado (16 de 38; 41,6%) (**Figura 35**), principalmente en genes supresores de tumores (*TP53*) y en secuencias génicas implicadas en el remodelamiento de la cromatina (*ASXL1*). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (IPSS-R bajo riesgo vs. IPSS-R alto riesgo) en relación al tipo de mutación, $P>0.05$.

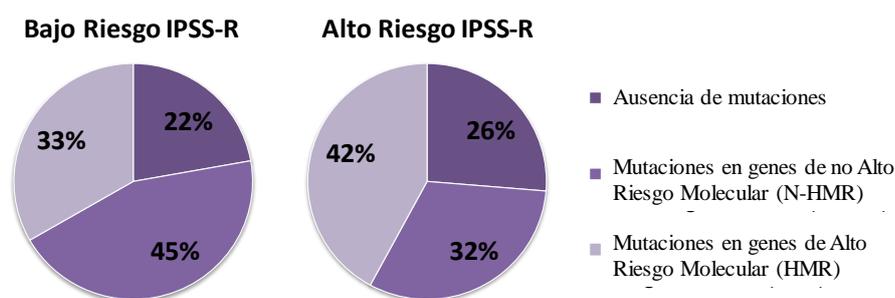


Figura 35. Distribución de las mutaciones somáticas en el grupo de pacientes con SMD en función del grupo de riesgo IPSS-R: Bajo Riesgo IPSS-R y Alto Riesgo IPSS-R.

Posteriormente, los pacientes con SMD (n=83) fueron agrupados en relación al riesgo citogenético; dividiendo así a los pacientes en las diversas categorías de riesgo: Riesgo Favorable (Bueno, n=57), Riesgo Intermedio (Intermedio, n=13), y Riesgo Pobre (Muy Pobre, n= 13).

Observamos que un 76% de los pacientes en las etapas iniciales de la enfermedad presentaban cariotipos Buenos, con ausencia de cariotipos Pobres/Muy Pobres; mientras que, en etapas avanzadas de la misma, prevalecían pacientes con “riesgo citogenético elevado” (87%): Intermedio (40%) y Muy Pobre (47%).

En relación al perfil mutacional, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de riesgo citogenético en relación al *score* mutacional, $P>0.05$. En cuanto a la distribución de las mutaciones, destacamos que, tal y como se puede observar en la **Figura 36**, dentro del grupo de riesgo citogenético favorable, se observa una mayor proporción de pacientes con mutaciones en genes no asociados a riesgo molecular (24 de 57; 42,1%) en comparación con los grupos de riesgo Intermedio y Muy Pobre.

Sin embargo, en éste último grupo de riesgo (Muy Pobre), encontramos una mayor frecuencia de pacientes que presentan mutaciones en genes HMR (10 de 13; 76,9%). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (IPSS-R bajo riesgo vs. IPSS-R alto riesgo) en relación al tipo de mutación, $P > 0.05$.

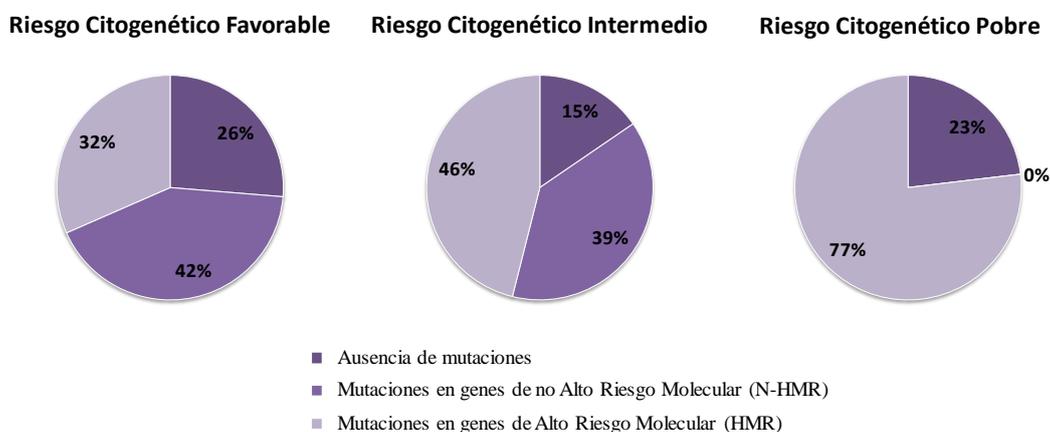


Figura 36. Distribución de las mutaciones somáticas en el grupo de pacientes con SMD en función del grupo de riesgo citogenético: Favorable (Bueno), Intermedio, Pobre (Muy Pobre).

4.4. RELACIÓN ENTRE EL MICROAMBIENTE TUMORAL Y EL PERFIL MUTACIONAL EN PACIENTES CON SMD

Una de las preguntas que surgieron durante el análisis del microambiente tumoral fue si existirían diferencias en cuanto a la composición leucocitaria en relación al perfil mutacional del clon displásico. Se conoce que la progresión tumoral en el SMD está relacionada con la presencia de un mayor número de mutaciones totales presentes en el clon patológico, mayor presencia de mutaciones HMR y, además, mayor VAF en los genes detectados. A continuación, el estudio del microambiente en relación con el *status* mutacional se abordó de tres formas posibles: en función del *score* mutacional (≤ 2 o > 3 mutaciones totales), del tipo de mutación (ausencia/presencia mutación HMR) y de la carga alélica de la mutación (VAFs $\leq 30\%$ ó $> 30\%$).

Para ello, el estudio se llevó a cabo en 50 pacientes diagnosticados de SMD (los pacientes diagnosticados con LMAs fueron excluidos), a los que se les realizó de forma conjunta el estudio inmunofenotípico del microambiente medular y/o periférico, y los estudios de NGS.

En la **Figura 37** y **Tabla Suplementaria 13**, se recogen las características clínicas de los 50 pacientes incluidos en el estudio.

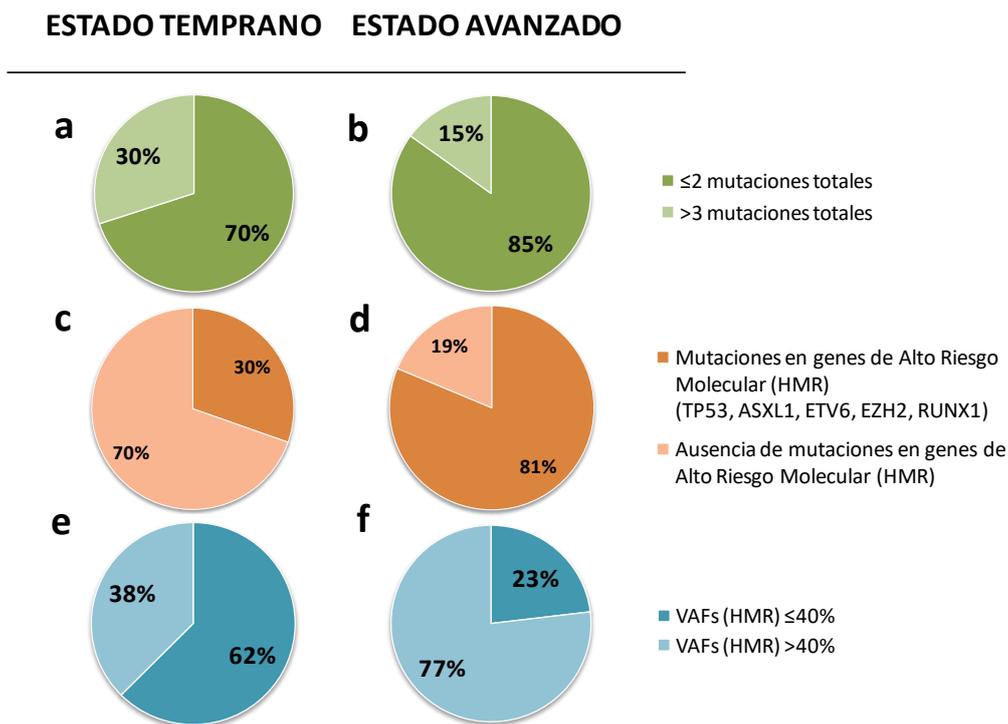


Figura 37. Distribución de los 50 pacientes con SMD previamente clasificados de acuerdo con el estado de progresión de la enfermedad (Estado Temprano vs. Estado avanzado) en función de las características del perfil mutacional. **a y b.** Score Mutacional (≤2 o >3 mutaciones totales); **c y d.** Presencia/ausencia de mutaciones de alto riesgo molecular (HMR); **e y f.** Frecuencia alélica de la variante (VAFs) ≤40% vs. >40% en genes HMR.

4.4.1. Relación del microambiente tumoral y n° total de mutaciones somáticas

De acuerdo con el *score* mutacional, en algunos trabajos se ha referenciado un riesgo elevado de progresión leucémica en pacientes con SMD con mayor número de mutaciones totales. En base a esto, se llevó a cabo un estudio de las diferentes poblaciones celulares presentes en el microambiente tumoral en función del *score* mutacional con el fin de evaluar el impacto de éste sobre el entorno leucocitario.

En primer lugar, los pacientes diagnosticados de SMD fueron divididos en dos grupos en base al número de mutaciones totales (≤2 **mutaciones** vs. >3 **mutaciones**), quedando agrupados de la siguiente manera: 38 pacientes con ≤2 **mutaciones totales** y 12 pacientes con >3 **mutaciones totales**. Tras llevar a cabo el análisis, el estudio no reveló diferencias significativas en las diferentes poblaciones celulares estudiadas ($P>0.05$).

Adicionalmente, se estudió si la composición leucocitaria difería entre el grupo de pacientes con Ausencia de mutaciones totales ($n=21$), frente a aquellos que presentaban, al menos, una mutación somática en alguno de los genes secuenciados ($n=29$). De nuevo, los análisis estadísticos no mostraron diferencias en el entorno leucocitario entre ambos grupos establecidos ($P>0.05$).

De forma general, estos resultados indican que no existen diferencias en la composición leucocitaria medular y periférica en función del *score* mutacional.

4.4.2. Relación del microambiente tumoral y mutaciones en genes de Alto Riesgo Molecular (*High Molecular Risk*, HMR)

Otra forma posible de analizar el microambiente tumoral en relación al perfil mutacional consistió en estudiar si la presencia de clones con mutaciones de alto riesgo molecular (*High Molecular Risk*, HMR) que afectan a los genes *TP53*, *RUNX1*, *ASXL1*, *EZH2* y *ETV6* podría alterar la inmunogenicidad de la célula tumoral, relacionándose así con cambios en el entorno leucocitario.

Para ello, los pacientes diagnosticados de SMD fueron divididos en dos grupos en base a la presencia o ausencia de mutaciones en genes HMR: **32 pacientes de Alto Riesgo** (presencia de al menos una mutación en genes HMR) y **18 pacientes de Bajo Riesgo** (Ausencia de mutaciones en genes HMR).

Los resultados en MO revelaron que el número de células CD34⁺ aumentaba significativamente en el grupo de pacientes con SMD que presentaban mutaciones HMR ($P=0.029$); poniendo de manifiesto que la presencia de dichas variantes patogénicas estaba relacionada con el riesgo de progresión leucémica.

Sin embargo, en el análisis del resto de las poblaciones celulares presentes tanto en el microambiente medular como periférico no se encontraron cambios significativos entre los grupos estudiados (presencia/ausencia HMR) ($P>0.05$) (**Figura 38**), por lo que, la presencia de clones con mutaciones en genes asociados a mayor riesgo de progresión, no se relacionan con cambios significativos en la composición leucocitaria y linfocitaria.

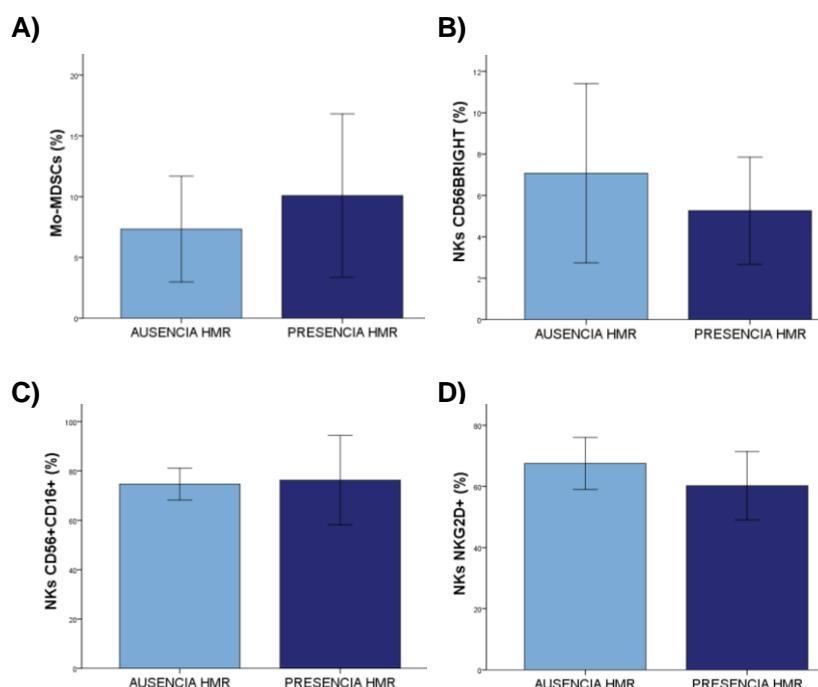


Figura 38. Gráficos en los que se representan las frecuencias de diferentes poblaciones celulares en SP, en función del perfil mutacional (ausencia/presencia de mutaciones en genes HMR). Frecuencia (%) (Media±EEM) de células Mo-MDSC (A), NKs CD56^{Bright} (B), NKs CD56^{CD56+CD16+} (C) y receptores NKG2D en células NK CD56⁺ (D), en función de la Ausencia/Presencia de mutaciones en genes HMR. La comparación de las distintas variables entre ambos grupos se llevó a cabo utilizando el test no paramétrico U Mann-Whitney.

4.4.3. Relación entre el microambiente tumoral y los valores de Frecuencia Alélica de la Variante (*Variant Allele Frequency*, VAF)

De igual forma, quisimos observar si aquellos tumores que presentaban VAFs inferiores se asociaban con un entorno inmunitario más o menos permisivo para el desarrollo del clon displásico. Para ello, los pacientes con SMD se agruparon en base a diferentes puntos de corte de frecuencias alélicas, VAFs. En primer lugar, el estudio se llevó a cabo agrupando a los pacientes con al menos una mutación somática en los genes estudiados, en aquellos con VAFs >30% vs. pacientes cuyas frecuencias alélicas no superaban el 30%. De tal forma, los pacientes se dividieron en: 18 pacientes con VAFs $\leq 30\%$ vs. 22 pacientes con VAFs >30%. Los análisis estadísticos no revelaron diferencias significativas en la composición leucocitaria en base a la carga alélica de las mutaciones detectadas ($P > 0.05$).

Adicionalmente, el estudio del microambiente se completó estableciendo otros puntos de corte de VAFs. Se comparó el entorno inmunitario entre aquellos pacientes con SMD que presentaban mutaciones somáticas con VAFs $\leq 10\%$ vs. VAFs >10%. Posteriormente, se comparó dicho microambiente entre pacientes con SMD que presentaban mutaciones con VAFs $\leq 20\%$ vs. VAFs >20%. De nuevo, los análisis estadísticos no revelaron diferencias significativas en la composición leucocitaria en ninguno de los análisis realizados ($P > 0.05$).

A la vista de los resultados obtenidos, y con la limitación de que el tamaño muestral del estudio es pequeño, nuestros resultados revelan que ni el número de mutaciones, ni la categoría de la mutación (mutación asociada a Alto/Bajo riesgo molecular), ni los valores de frecuencia alélica, se asocian con cambios relevantes en la composición inmunitaria presente en el microambiente medular y/o periférico; por lo que podemos concluir que las mutaciones somáticas por sí mismas contribuyen a la progresión de la enfermedad con independencia de los factores inmunitarios presentes en el microambiente tumoral.

4.5. CAMBIOS INTRÍNSECOS QUE AFECTAN A LA INMUNOGENICIDAD DE LA CÉLULA TUMORAL E IMPACTO EN LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD

4.5.1. Estudio de la expresión HLA y PD-L1 en la célula tumoral

Se conoce que las células tumorales adquieren una serie de mecanismos de escape tumoral al control ejercido por la inmunovigilancia. La pérdida o la *down*-regulación de las moléculas HLA-I, junto con el aumento de la expresión de ligandos PD-L1 en la superficie de la célula tumoral, representan dos de los mecanismos más importantes de inmunoevasión, contribuyendo así a la resistencia antitumoral. La pérdida de HLA-I permite a la célula tumoral escapar de la acción llevada a cabo por los CTLs; sin embargo, al mismo tiempo, origina cierta susceptibilidad al ataque mediado por células NK. Por ello, la relación entre ambos tipos celulares (CTLs y NKs) debe ser considerada en la defensa frente al cáncer.

➤ En este sentido, se analizaron los niveles de expresión total de HLA-I en la superficie de la célula tumoral CD34⁺ y durante el proceso de diferenciación mieloide, mediante citometría de flujo multiparamétrica; utilizando un AcMo (W6/32) dirigido frente la región monomórfica de la molécula HLA-I. Paralelamente, se analizó la expresión HLA en los linfocitos T CD3⁺ autólogos de cada uno de los pacientes. El estudio se llevó a cabo en un total de 46 pacientes diagnosticados de SMD y LMAs en muestras de MO; y en un grupo de 10 muestras de MO control.

A continuación, se destacan los resultados más relevantes del estudio:

En primer lugar, no se observaron pérdidas totales de expresión HLA-I en las células CD34⁺ en ninguno de los casos estudiados. De forma general, observamos que los niveles de IMF HLA-I detectados en las células CD34⁺ en el grupo de pacientes con SMD y LMAs fueron significativamente inferiores a los observados en el grupo de muestras control (SMD vs. Control: 14837 vs. 35765; P=0.003) (LMAs vs. Control: 16933 vs. 35765; P=0,025). No se observan diferencias significativas entre los grupos SMD y LMAs (P>0.05) (*Tabla 16 y Figura 39*).

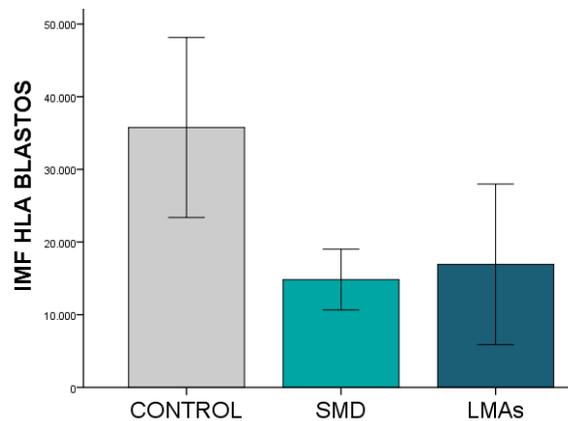


Figura 39. Media±EEM de los niveles de IMF de HLA en blastos CD34⁺ en muestras de MO de los grupos control, SMD, y LMAs. Comparación entre grupos mediante el test no paramétrico U Mann-Whitney.

A continuación, se observaron los niveles de IMF de la expresión HLA-I durante los diferentes estadios de maduración mieloide, determinados por la expresión de los marcadores CD11b y CD13, a través del programa de análisis Infinicyt.

La serie granulocítica presenta una expresión variable de determinados antígenos en función del grado de maduración. El antígeno CD13 se expresa de forma intensa en los promielocitos, pierde intensidad en los mielocitos, y vuelve a ganarla en los metamielocitos, para ser intensa de nuevo en los segmentados. El antígeno CD11b no se expresa en los estadios más inmaduros (promielocitos) y la expresión empieza en los mielocitos, para ser intensa en los segmentados. En base a esto, se establecieron varios estadios de diferenciación de la serie granulocítica, representados como: estadio I, estadio II, estadio III y estadio IV. Los estadios I, II, III, IV se corresponden, de forma general, con un predominio de células promielocíticas, mielocíticas, metamielocitos y neutrófilos maduros, respectivamente (*Figura 40*).

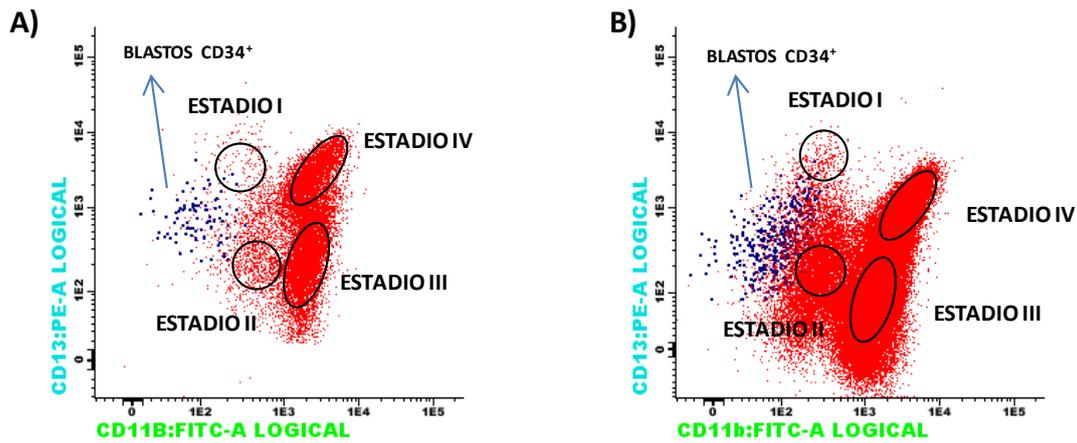


Figura 40. Caracterización de los diferentes estadios de diferenciación mieloide durante la mielopoyesis. Muestra MO control (A); paciente con SMD (B).

Aunque dichos antígenos pueden estar alterados en el SMD (disgranulopoyesis), no observamos expresión aberrante durante la mielopoyesis en el grupo de pacientes del estudio; es decir, la expresión de ambos marcadores sigue el mismo patrón de diferenciación que el observado en el grupo de muestras control. A continuación, los siguientes plots (Band Dot plots) muestran el patrón de expresión de los antígenos CD11b y CD13 durante el proceso de maduración de la serie granulocítica (estadio I, II, III, IV) en una muestra control (A), y en un paciente con SMD (B) (Figuras 41 y 42).

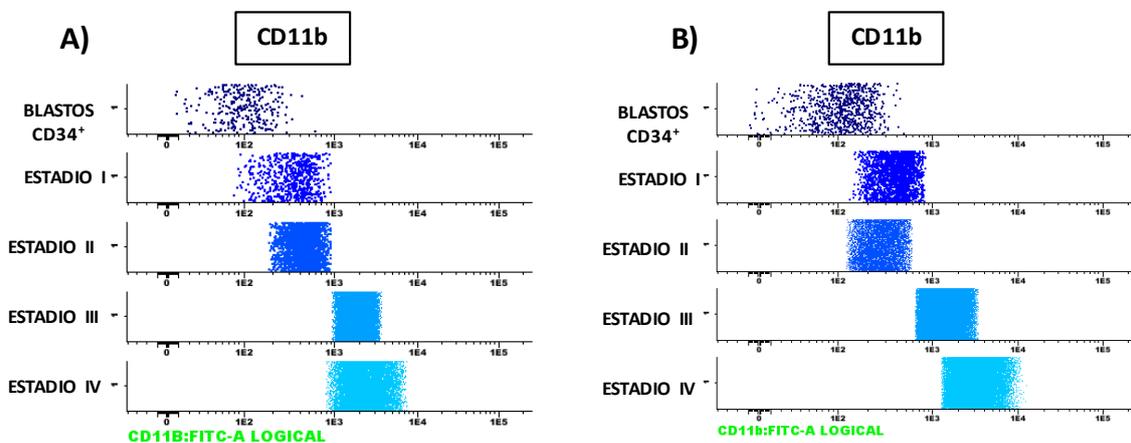


Figura 41. Band Dot plots en los que se representa los niveles de IMF del marcador CD11b a lo largo de los distintos estadios de maduración de la serie granulocítica. (A) en una MO control; (B) en un paciente con SMD.

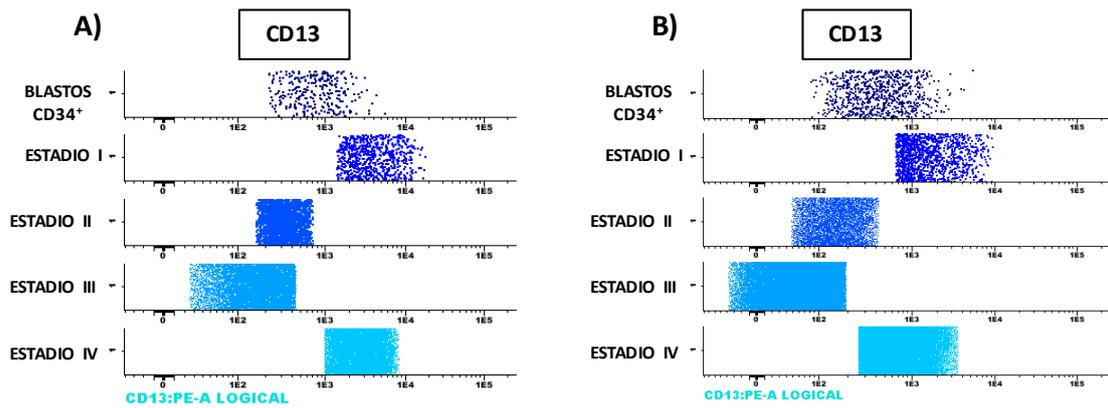
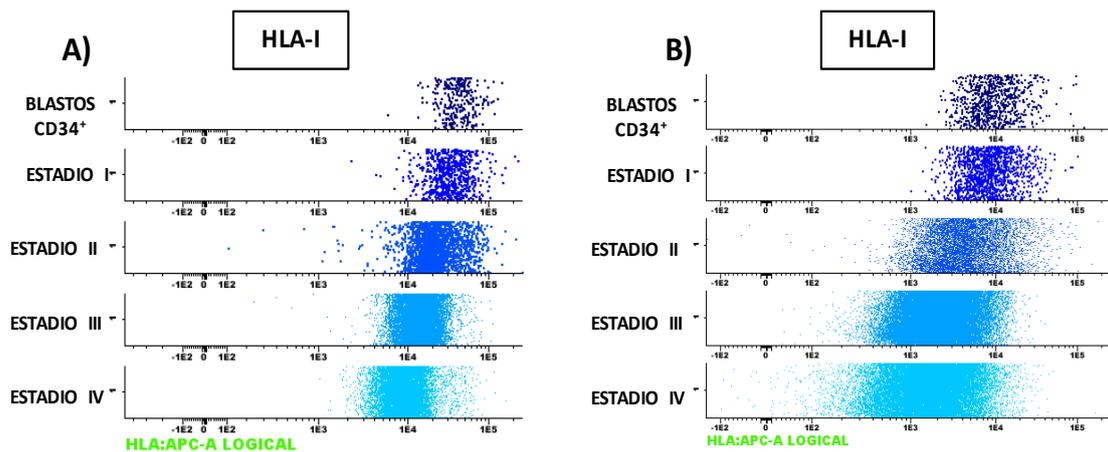


Figura 42. Band Dot plots en los que se representa los niveles de IMF del marcador CD13 a lo largo de los distintos estadios de maduración de la serie granulocítica. (A) en una MO control; (B) en un paciente con SMD.

En relación a los niveles de IMF de expresión HLA-I durante los estadios de maduración establecidos (*Figura 40*), como se puede observar en la siguiente figura (*Figura 43, Apartados B y D*) (“Band plots” obtenidos mediante el programa Infinicyt), no detectamos expresión aberrante en los niveles de IMF HLA-I durante la mielopoiesis en pacientes con SMD. Los niveles de expresión de IMF HLA-I decaen a lo largo del proceso de diferenciación granulocítico, observando una *down*-regulación gradual equivalente a lo observado en el grupo de muestras control (*Figura 43, Apartados A y C*). Observamos que el precursor mieloide CD34⁺ (mieloblasto) expresa los niveles más altos de HLA-I y dicha expresión va disminuyendo durante los diferentes estadios de diferenciación granulocítica (Estadio I, II, III, IV).



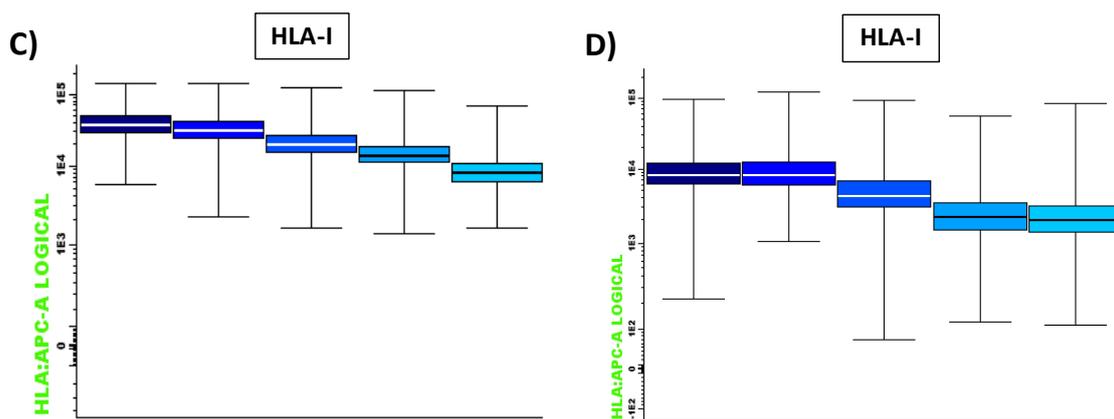


Figura 43. Análisis de la expresión HLA (IMF) en la célula tumoral CD34⁺ y en los diferentes estadios durante el proceso de diferenciación mieloide. Muestra MO control (A, C); paciente con SMD (B, D).

Además, destacamos que la disminución en los niveles de expresión HLA-I globales observados en pacientes con SMD no son específicos de la célula tumoral CD34⁺, sino que afectan también a los linfocitos T CD3⁺ autólogos. De forma general, se observa que los niveles de IMF HLA-I en los linfocitos T autólogos son significativamente inferiores a los del grupo de muestras control (SMD vs. Control: 17676 vs. 32662; P=0.018). Sin embargo, aunque no se observa una disminución significativa en las LMAs con respecto al grupo control (LMAs vs. Control: 20339 vs. 32662; P>0.05), observamos que la IMF HLA-I decae notablemente. De igual forma que para la célula tumoral CD34⁺, no se observan diferencias significativas en los niveles IMF HLA-I en los linfocitos T entre los grupos SMD y LMAs (P>0.05) (**Figura 44**).

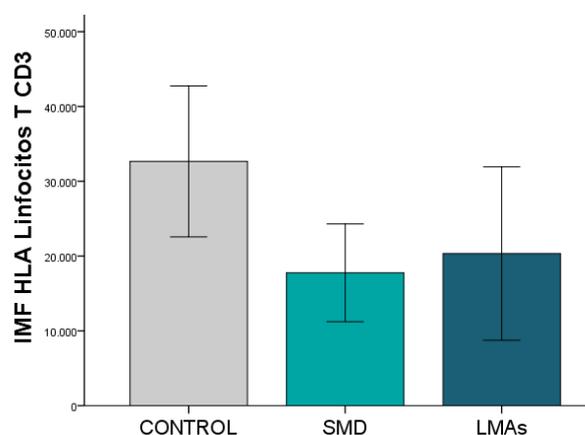


Figura 44. Media±EEM de los niveles de IMF de la expresión HLA-I en los linfocitos T CD3⁺, en muestras de MO de los grupos control, SMD y LMAs.

Sin embargo, destacamos que, aunque los niveles de expresión HLA-I en los blastos son variables, se observa una constante: la expresión de HLA-I en la célula tumoral CD34⁺ se mantiene o es ligeramente superior con respecto a los linfocitos T CD3⁺ autólogos, dentro de cada paciente. Estos resultados se observan de igual forma en el grupo de muestras control, por lo que la expresión HLA-I en la célula tumoral se conserva en todos los casos SMD estudiados (**Figura 45**).

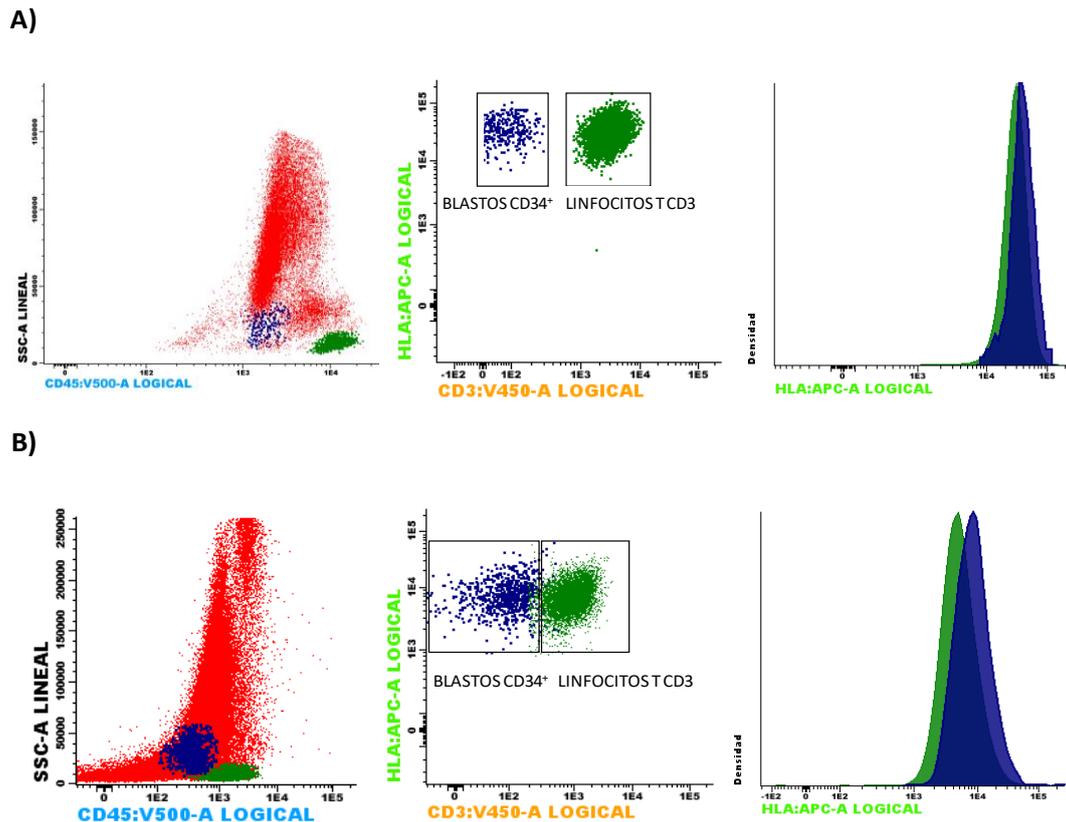


Figura 45. Plots en los que se representa la expresión de HLA en la célula tumoral CD34⁺ y en los linfocitos T CD3⁺ autólogos. (A) en una MO control, con 1% blastos; (B) en un paciente con SMD.

Los resultados obtenidos revelan y/o ponen de manifiesto que, probablemente, mutaciones en el gen de la $\beta 2m$ o en otros componentes de la APM que originen la ausencia total de expresión HLA en la superficie de la célula tumoral, no sean seleccionados por el clon patológico. Por ello, nos propusimos explorar otros mecanismos posibles que pudiesen generar una disrupción en la expresión HLA-I. En este sentido, como veremos en apartados posteriores, se llevaron a cabo estudios de LOH en el CRM 6, concretamente en la región 6p21, donde se encuentran ubicados los genes del MHC.

➤ Por otro lado, se analizó también la expresión de PD-L1 en la célula tumoral CD34⁺ en el grupo de pacientes con SMD y LMAs, mediante citometría de flujo multiparamétrica.

Se observó un aumento significativo en la expresión de PD-L1 en el grupo de pacientes con SMD en comparación con el grupo de pacientes con LMAs, en muestras de MO (SMD vs. LMAs; $P=0.002$) y SP (SMD vs. LMAs; $P=0.0003$). Aunque los niveles de expresión no variaron entre la Fase temprana SMD vs. Fase tardía SMD ($P>0.05$), sí se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la Fase temprana SMD vs. LMAs en MO ($P=0.004$) y SP ($P=0.0004$); y entre la Fase tardía SMD vs. LMAs en MO ($P=0.017$) y SP ($P=0.001$). Sin embargo, la expresión PD-L1 no varió significativamente entre los grupos de Alto riesgo vs. Bajo riesgo según índices de riesgo IPSS, IPSS-R y/o Riesgo Citogenético ($P>0.05$).

Dada la elevada frecuencia en la expresión de PD-L1 sobre células CD34⁺ en el SMD, se analizó también la expresión del marcador PD-1 sobre los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Dicha proteína (CD279) se expresa en los linfocitos T activados y juega un papel importante en el mantenimiento de la tolerancia periférica. Sin embargo, aunque de forma general se observa un ligero aumento en la frecuencia de dicho receptor en el grupo de pacientes con SMD con respecto al grupo control y LMAs, estas diferencias no llegaron a ser significativas ($P > 0.05$).

4.5.2. Estudio de la pérdida de heterocigosidad (LOH) en la región HLA

En el apartado anterior se describe que no se detectaron pérdidas totales de expresión de moléculas HLA-I en las células tumorales en los casos analizados, sin embargo, quisimos comprobar si podía darse otro fenotipo HLA-I alterado que pudiese afectar la presentación antigénica. Para ello, se llevó a cabo un estudio de LOH en la región HLA (6p21) con el objetivo que investigar si este mecanismo de inmunoevasión pudiera explicar la progresión del SMD y/o posterior transformación leucémica.

En esta línea, se llevaron a cabo estudios de LOH en el CRM 6 mediante técnicas de SNP-Array, en un total de 36 pacientes en etapas avanzadas de la enfermedad. El estudio incluyó 24 pacientes diagnosticados de SMD (SMD-EB-1, SMD-EB -2 y LMAs) y, adicionalmente, se incorporaron pacientes diagnosticados de LMMC en etapas tardías (>40% monocitos en MO) (n=3) y pacientes con LMA *de novo* (n=9). Para ello, se utilizó el ADN procedente de blastos CD34⁺ previamente purificados, excepto en los casos diagnosticados con LMMC, en los que se utilizó el ADN procedente de monocitos CD14⁺ previamente purificados. En todos los casos, se utilizó como control el ADN extraído a partir de células T CD3⁺ autólogas de cada paciente.

- En relación a los resultados obtenidos, destacamos que **3 de los 36 pacientes** incluidos en el SNP-Array (**9,4%**) (2 LMAs y 1 LMA *de novo*), presentaban una LOH en el brazo corto del CRM 6, que incluía la región HLA (6p21). Curiosamente, los tres pacientes con LOH HLA presentaban características clínicas-biológicas favorables según la OMS 2017, con *scores* pronósticos IPSS-R y/o riesgos citogenéticos favorables. A continuación, se detallan las características cada uno de ellos:

- El **paciente 12** fue diagnosticado de SMD del(5q) aislado en abril de 2012, y fue clasificado de bajo riesgo según IPSS-R (*score* 2) (**Tabla 24**). Al momento del diagnóstico, no se llevaron a cabo estudios moleculares. Tras recibir 5 ciclos de lenalidomida, no se observó respuesta hematológica. Sin embargo, el paciente presentó una elevada toxicidad como efecto secundario, por lo que se sometió a un trasplante alogénico de MO (Alo-TPH) de un donante no emparentado HLA compatible (10/10) en octubre de 2012. En mayo de 2014, el paciente sufrió una recaída de la enfermedad con pérdida del injerto. En el momento de la recaída, los estudios de NGS revelaron la presencia de una mutación en *SF3B1*, con una frecuencia alélica del 40%. (**Figura 47**). Posteriormente, el paciente se sometió a un segundo Alo-TPH de donante emparentado HLA idéntico, obteniendo una respuesta completa (100% quimera del donante).

En noviembre de 2016, el paciente recayó de nuevo y progresó hacia LMAs (quimera mixta, 35% de receptor). En el momento de esta última recaída, los estudios genéticos revelaron el mismo perfil citogenético (del(5q)) y la misma variante mutacional *SF3B1* (VAF = 17%) (**Figura 47**) que antes del segundo Alo-TPH. Tras 2 ciclos de 5-AZA, en febrero de 2017, el paciente sufrió un EICH agudo de grado 4 y finalmente, falleció debido a fallo multiorgánico (**Figura 46**).

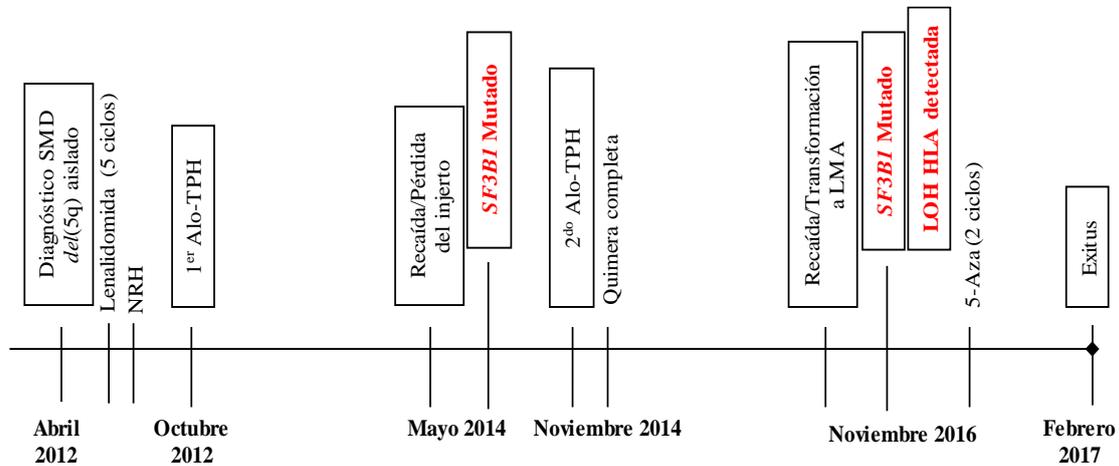


Figura 46. Representación gráfica de la progresión clínica del paciente 12. *NRH: No Respuesta Hematológica. 5-Aza: 5 Azacitidina.

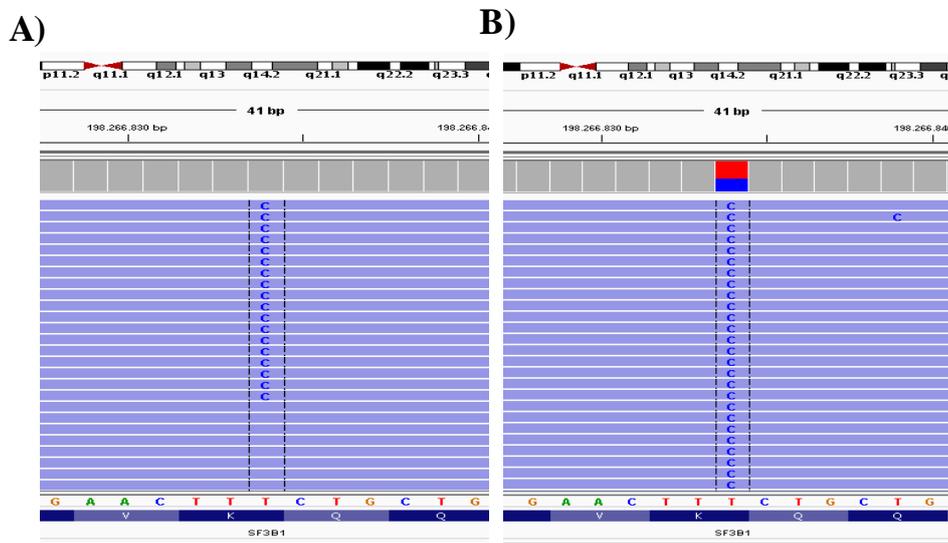


Figura 47. Imágenes del programa Interactive Genome Viewer (IGV) en el que se visualiza la variante patogénica en *SF3B1* detectada en el paciente 12. **A)** Imagen de la variante en *SF3B1* identificada tras la primera recaída y pérdida del injerto. La mutación *missense* (c.2098A> G) en el exón 15 dio como resultado un cambio de aminoácido en la posición 700 (p.Lys700Glu). La cobertura total fue de 7221 lecturas, con una VAF del 40% (2888 lecturas presentaban la mutación en *SF3B1*). **B)** Imagen de la misma variante en *SF3B1* (c.2098A> G) detectada en el momento de la recaída y progresión leucémica, con una VAF del 17%. La cobertura total fue de 2870 lecturas (detectando la variante en 488 lecturas). No se detectaron mutaciones adicionales.

Tras la segunda recaída post-TPH y transformación leucémica (22% blastos en MO), se aislaron las células CD34⁺ y linfocitos T CD3⁺ del paciente. Los estudios de quimera llevados a cabo en la totalidad de células CD34⁺ previamente purificadas mostraron que todas las células leucémicas eran del receptor. Posteriormente, se llevaron a cabo los estudios de LOH en el CRM 6 y el tipaje genómico HLA.

Los estudios de SNP-Array se realizaron tanto en la fracción celular CD34⁺ como en los linfocitos T CD3⁺ autólogos. Los resultados del SNP-Array mostraron, en las células CD34⁺, una deleción terminal de aproximadamente 38 Mb (p25.2 a p21.2), que englobaba gran parte del brazo corto del CRM6 e incluía la región HLA (*Figura 48, Apartado B*). Los plots que representan la frecuencia del alelo B (BAF plots) mostraron un patrón de homocigosidad en la distribución de SNPs (BAF= 0 o 1) en la región 6p de las células CD34⁺ (*Figura 48, Apartados B y D*), en comparación con los linfocitos T CD3⁺, que mostraron un patrón de heterocigosidad (BAF = 0, 0.5 o 1) (*Figura 48, Apartados A y C*).

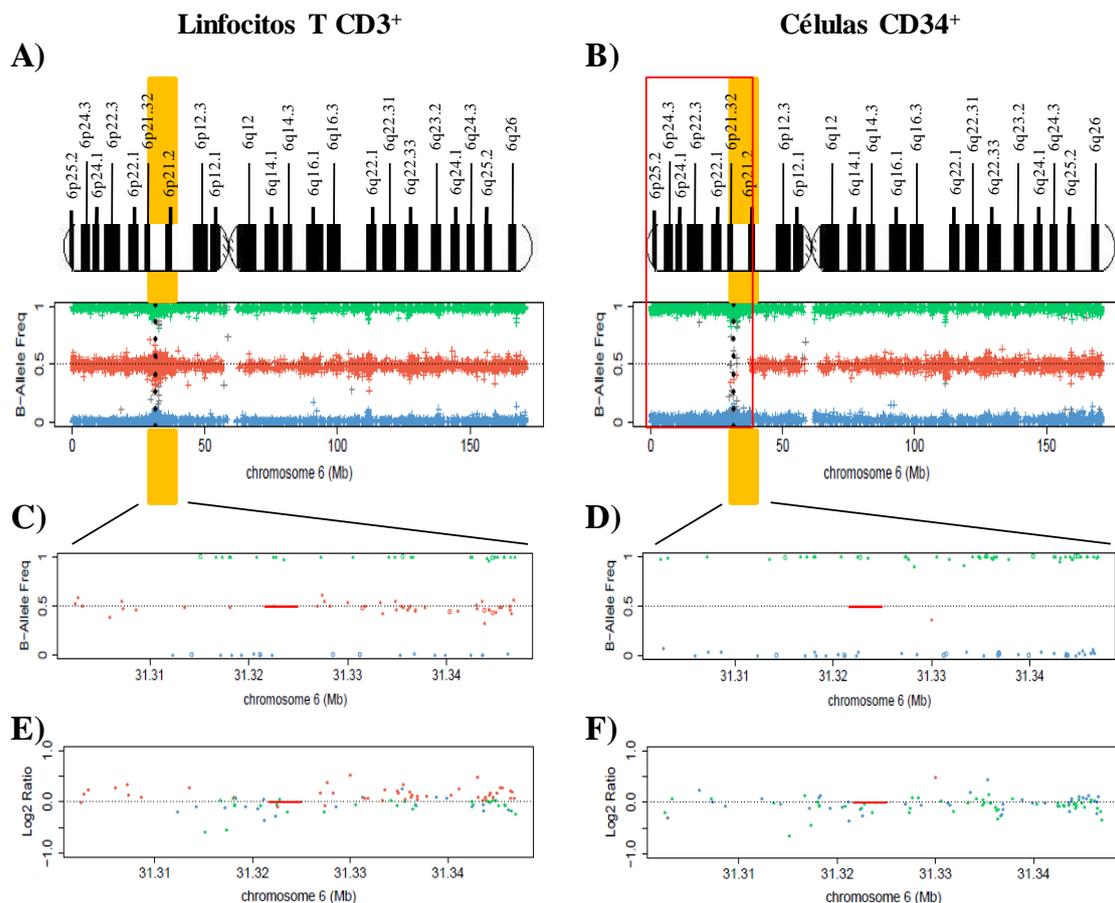


Figura 48. Resultados del SNP-Array del CRM 6 del paciente 12. (A) y (B). Los plots muestran la frecuencia del alelo B (BAF) en las células T CD3⁺ autólogas (A) y en las células CD34⁺ (B) del paciente 12. El genotipo BB presenta una BAF con valor de 1, el genotipo AB una frecuencia de 0.5, y el genotipo AA una frecuencia de 0. La imagen superior muestra una representación esquemática del CRM 6. La región HLA (6p21.1-21.3) se indica en amarillo. Los puntos negros indican la posición del locus HLA-B en el CRM 6. Se detecta una deleción terminal de aproximadamente 38 Mb (indicada en el rectángulo

rojo) que involucra los loci HLA en las células CD34⁺ (B), en comparación con (A), la muestra control. (C) y (D). Amplificación de la región 6p21 que involucra el locus HLA-B (línea roja). Los resultados del array indican un patrón de homocigosidad (genotipos AA=0 y BB =1) en (D) la fracción CD34⁺ en comparación con (C), la muestra control. (E) y (F) Los gráficos muestran el logR en los linfocitos T CD3⁺ (E) y células CD34⁺ (F). Las células CD34⁺ conservan el número de copias (logR ratio=0) a lo largo del CRM6. La falta de genotipos heterocigotos en el brazo corto del CRM 6 en ausencia de una alteración en el número de copias indica una CN-LOH.

Además, los plots en los que se representaba el log2R, revelaron que el número de copias aparecía conservado en las células CD34⁺, al igual que en la fracción control T CD3⁺ (log2R= 0) (Figura 48, Apartados E y F); sugiriendo que las células CD34⁺ presentaban una CN-LOH originada mediante mecanismos de aUPD.

Para verificar los resultados obtenidos del array, se realizó el tipaje genómico HLA mediante técnicas de secuenciación Sanger. Las imágenes del electroferograma obtenidas tras secuenciación Sanger revelaron una LOH en todas las posiciones polimórficas de los exones 2, 3 y 4 de los loci HLA-B, -C y del exón 2 del locus HLA-DRB1, en las células CD34⁺ en comparación con la muestra control. La secuencia nucleotídica detectada en las células CD34⁺ correspondía a los alelos retenidos: HLA-B*18:01, C*07:01 y DRB1*11:04; mientras que los alelos HLA-B*39:01, C*12:03 y DRB1*11:01 no se conservaron. El paciente era homocigoto para los loci HLA-A y -DQB1, por lo que dichos loci no fueron informativos.

A continuación, se muestran las imágenes del electroferograma del exón 2 del locus B, obtenidas tras la secuenciación de las células CD34⁺ y de los linfocitos T CD3⁺ autólogos del paciente 12 (Figura 49). Posteriormente, los resultados obtenidos mediante tipaje HLA Luminex confirmaron los datos de secuenciación (Tabla 26).

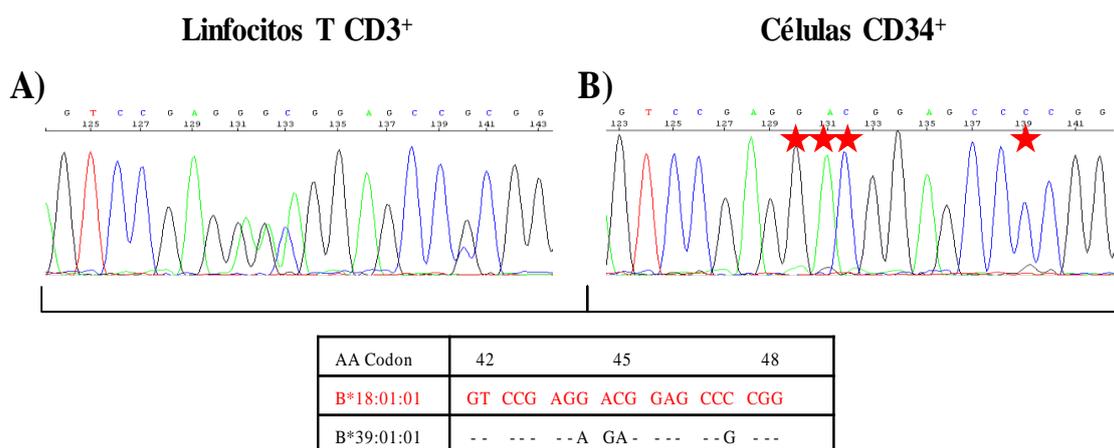


Figura 49. Fragmentos del electroferograma de la secuenciación del exón 2 (codon 42 a codon 48) del locus HLA-B obtenido tras la segunda recaída post-TPH (22% blastos MO) del paciente 12. Las células CD34⁺ (B) muestran una LOH en las posiciones polimórficas (marcadas con estrella roja) en comparación con las células CD3⁺ (A). La secuencia de nucleótidos detectada en las células CD34⁺ corresponde con el alelo HLA-B*18:01 (color rojo en la tabla), mientras que la secuencia correspondiente al alelo HLA-B*39:01 se ha perdido.

➤ El **paciente 11** fue diagnosticado de SMD *del(5q)* aislado en mayo de 2013, y fue clasificado de bajo riesgo según IPSS-R (*score* 2) (**Tabla 24**). Al momento del diagnóstico, no se llevaron a cabo estudios moleculares. Tras recibir 36 ciclos de lenalidomida, el paciente obtuvo respuesta hematológica y citogenética completa (Cheson et al., 2006). Posteriormente, en junio de 2016, el paciente sufrió una pérdida del injerto y progresó a LMA. Finalmente, el paciente falleció debido a fallo multiorgánico (**Figura 50**).

En el momento de la recaída y transformación leucémica (20% blastos en MO), los estudios moleculares mediante técnicas de NGS no revelaron mutaciones somáticas en ninguno de los genes secuenciados. Adicionalmente, se aislaron las células CD34⁺ y linfocitos T CD3⁺ del paciente para llevar a cabo los estudios de LOH en el CRM 6 y tipaje genómico HLA.

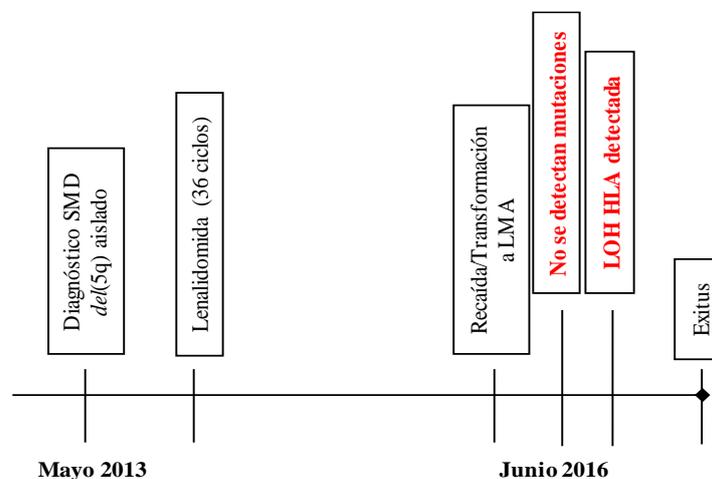


Figura 50. Representación gráfica de la progresión clínica del paciente 11.

Los estudios de SNP-Array se realizaron en la fracción celular CD34⁺ y en los linfocitos T CD3⁺ autólogos, ambos previamente purificados. Los resultados del array en las células CD34⁺ mostraron un patrón complejo de LOH, que afectaba a una región de, aproximadamente, 40Mb (p25.2 a p12.3) que incluía los loci HLA (**Figura 51, Apartado B**), en comparación con los linfocitos T CD3⁺ (**Figura 51, Apartado A**). Este patrón complejo posiblemente se deba a una doble eliminación no simultánea conservándose una pequeña región telomérica a los loci HLA con retención de heterocigosidad, de la cual desconocemos su localización ya que dicha técnica no puede revelar su ubicación a nivel cromosómico (**Figura 51, Apartado B**). En concreto, se observa una LOH parcial en la región HLA (los SNPs en los BAF plots se encuentran alejados de la línea de heterocigosidad (genotipo AB=0.5), y el grado de desviación se corresponde con el porcentaje de células tumorales que presentan LOH; representando un tamaño del clon del 50%). Además, las células CD34⁺ conservaban el número de copias (logR ratio=0) a lo largo del CRM 6 (datos no mostrados), por lo que, al igual que el paciente anterior (paciente 12), se observa una CN-LOH en las células CD34⁺.

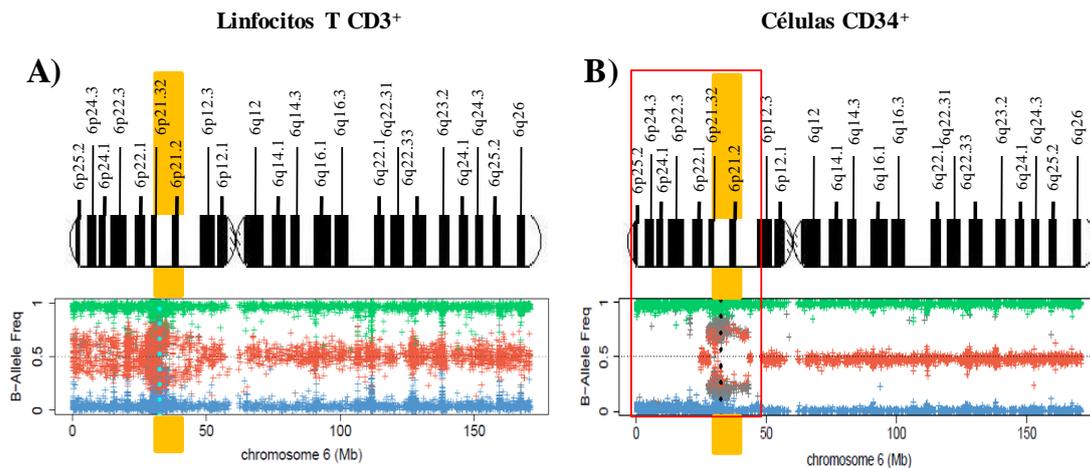


Figura 51. Resultados del SNP-Array del CRM 6 del paciente 11. (A) y (B). Los plots muestran la frecuencia del alelo B (BAF) en las células T CD3⁺ autólogas **(A)** y en las células CD34⁺ **(B)**. Los puntos azules (BAF plot, células CD3⁺) y los puntos negros (BAF plot, células CD34⁺) muestran la posición del locus HLA-DRB1. Se detecta una deleción terminal de ~40 Mb (rectángulo rojo) que involucra los loci HLA, en ~50% de células CD34⁺ **(B)**; en comparación con **(A)** la muestra control. Se detecta una pequeña región telomérica a los loci HLA con retención de heterocigosidad.

Los resultados del tipaje HLA en las células CD34⁺, obtenidos tras el genotipado mediante SNP-Array, mostraron una señal de amplificación más baja para los SNPs asociados con los alelos pertenecientes al haplotipo: HLA-A*66:01; HLA-B*51:01; C*07:01; DRB1*13:03; DQB1*03:01; en comparación con la señal obtenida para el haplotipo: HLA-A*30:02; HLA-B*18:01; C*05:01; DRB1*03:01; DQB1*02:01, haplotipo extendido en pacientes españoles con neoplasias hematológicas (Balas et al., 2011). Estos resultados fueron confirmados mediante tipaje genómico HLA utilizando secuenciación Sanger y tecnología Luminex.

A continuación, se muestran las imágenes del electroferograma de secuenciación del exón 2 de los loci HLA-DRB1, -DQB1, en células CD34⁺ (**Figura 52, Apartados A y B**). Como se puede observar, las imágenes revelan una notable reducción en la altura de los picos en todas las posiciones polimórficas de la secuencia de nucleótidos de los loci HLA-DRB1 y -DQB1, y que corresponden a la secuencia perteneciente a los alelos HLA-DRB1*13:03 y DQB1*03:01; en comparación con la intensidad de la señal obtenida para los alelos DRB1*03:01 y DQB1*02:01.

A su vez, el tipaje HLA mediante tecnología Luminex no asignó los alelos DRB1*13:03 o DQB1*03:01 en la fracción celular CD34⁺ (**Figura 52, Apartados C y D**).

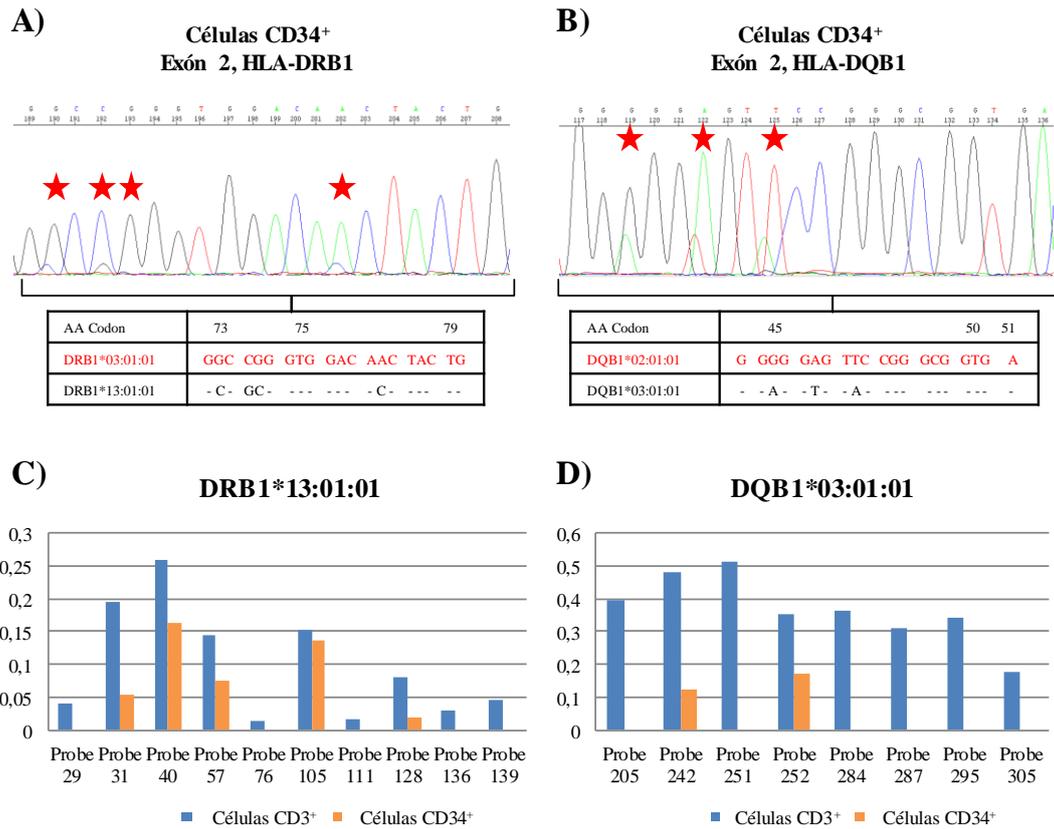


Figura 52. Resultados de la secuenciación Sanger y Tipaje HLA Luminex del paciente 11. (A) y (B) Fragmentos del electroferograma de secuenciación del exón 2 (codón 73 al codón 79) del locus HLA-DRB1 **(A)** y del exón 2 (codón 44 al codón 51) del locus HLA-DQB1 **(B)**, en las células CD34⁺. Se observa que la altura de los picos en los sitios polimórficos (señalados con estrella roja) de las secuencias de nucleótidos que corresponden a los alelos **(A)** DRB1*13:01 y **(B)** DQB1*03:01, se redujo en comparación con la intensidad de la señal de las secuencias de nucleótidos que corresponden con los alelos **(A)** DRB1*03:01 y **(B)** DQB1*02:01 (marcados en rojo en la tabla), sugiriendo que la LOH detectada no se encuentra presente en la totalidad de las células leucémicas aisladas. **(C) y (D)** Representación de la diferencia entre el valor de la IMF ajustado* de las sondas SSO (oligonucleótidos específicos de secuencia) y los valores de cut-off; para cada uno de los alelos **(C)** DRB1*13:01 y **(D)** DQB1*03:01; en las células CD34⁺ y células CD3⁺, mediante tipaje Luminex. Los valores obtenidos fueron próximos o por debajo del cut-off para la mayoría de las sondas SSO en las células CD34⁺.

* Valor medio ajustado: (IMF sonda – IMF sonda en blanco) / (sonda de control MFI - sonda de control en blanco MFI).

Estos resultados sugieren que la pérdida haplotípica no se produce en la totalidad de las células CD34⁺, sino en una clona de éstas; existiendo una pequeña proporción de células leucémicas con retención de heterocigosidad en la región HLA que conservarían ambos haplotipos.

➤ El **paciente 28** fue diagnosticado de LMA *de novo* (clasificación FAB LMA M1) en agosto de 2014 (**Tabla 24**). En el momento del diagnóstico, el paciente no presentaba ninguna anomalía citogenética. No se llevaron a cabo estudios de NGS al diagnóstico. Tras recibir tratamiento de inducción y dos ciclos de consolidación con quimioterapia, el paciente obtuvo respuesta morfológica completa con enfermedad mínima residual positiva; por lo que, en

febrero de 2015, se sometió a un trasplante hematopoyético autólogo (Auto-TPH). En julio de 2017, el paciente recayó y recibió terapia de inducción con tratamiento de segunda línea Flag-Ida (Fludarabina+Citarabina+GCSF+Idarrubicina), obteniendo respuesta morfológica con enfermedad mínima residual negativa. Posteriormente, en noviembre de 2017, el paciente se sometió a un Alo-TPH de un donante emparentado HLA compatible (10/10), obteniendo respuesta morfológica completa y quimera completa (Cheson et al., 2006). En enero de 2018 (52 días después), el paciente sufrió un EICH agudo, con afectación hepática, cutánea y digestiva; y finalmente, falleció debido a fallo multiorgánico y aspergilosis pulmonar invasiva (**Figura 53**).

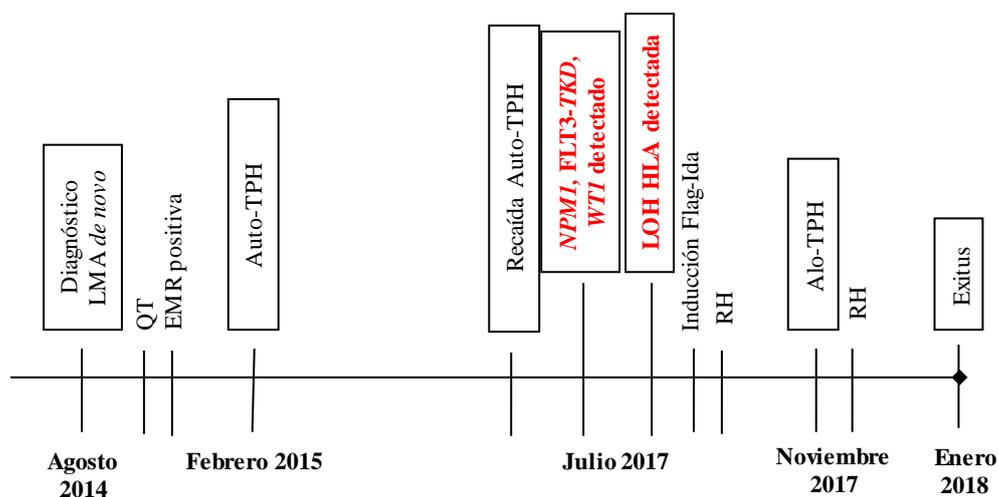


Figura 53. Representación gráfica de la progresión clínica del paciente 28. *QT: Quimioterapia; RH: Respuesta Hematológica.

Tras la recaída del Auto-TPH (99% blastos MO), los estudios de NGS revelaron que las células CD34⁺ fueron *FLT3-TKD*-positivas (VAF= 43%) y presentaban mutaciones en los genes *NPM1* (VAF=34%) y *WT1* (VAF=47.2%) (**Tablas 25 y 26**). Adicionalmente, se aislaron las células CD34⁺ y linfocitos T CD3⁺ del paciente para llevar a cabo los estudios de LOH en el CRM 6 y tipaje genómico HLA.

Los resultados del SNP-Array en las células CD34⁺ mostraron una LOH de aproximadamente 36 Mb (p25.2 a p21.2), que incluía la región HLA (**Figura 54, Apartados B, D**); en comparación con las células CD3⁺, donde se observa una retención de heterocigosidad a lo largo de todo el CRM 6 (**Figura 54, Apartados A, C**). Las células CD34⁺ mostraron un patrón de homocigosidad con un número de copias conservado ($\log_2 R=0$), sugiriendo una CN-LOH (**Figura 54, Apartado F**).

Posteriormente, los estudios de secuenciación Sanger en la fracción celular CD34⁺ revelaron una LOH en las posiciones polimórficas de todos los exones secuenciados para los loci HLA-I y HLA-II; reteniendo el haplotipo HLA-A*26:01; B*38:01; C*12:03; DRB1*01:03; DQB1*03:02; en comparación con el patrón de heterocigosidad presente en las células CD3⁺ (A*02:01, A*26:01; B*07:02, B*38:01; C*07:02, C*12:03; DRB1*01:03, DRB1*04:02; DQB1*03:02, DQB1*05:01). A continuación, se muestran las imágenes del electroferograma de secuenciación del exón 2 del locus B, en células CD34⁺ (**Figura 54, Apartado H**); y en linfocitos T CD3⁺ autólogos (**Figura 54, Apartado G**). Estos resultados fueron confirmados mediante tipaje HLA Luminex (**Tabla 26**).

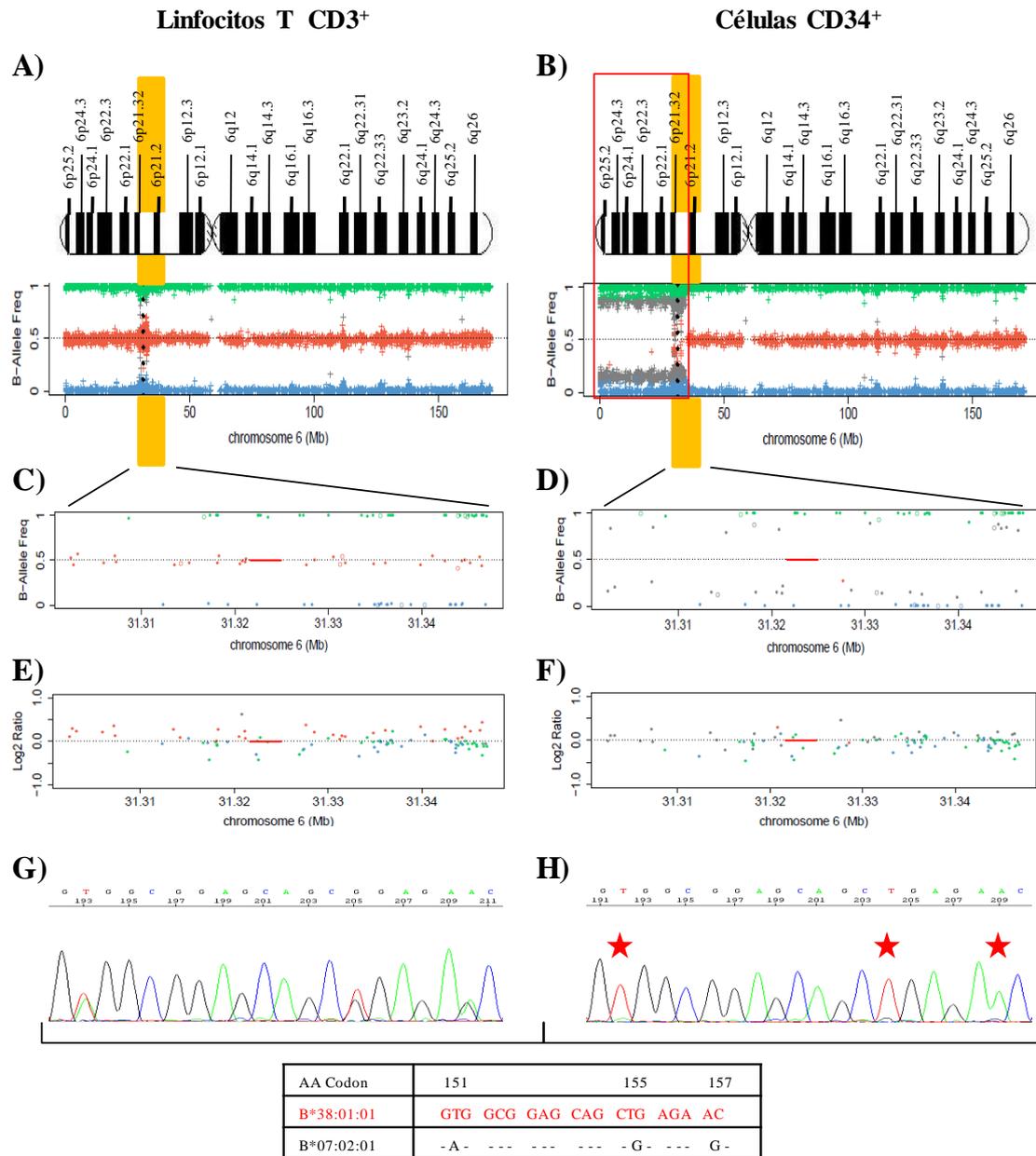


Figura 54. Resultados del SNP-Array del CRM 6 y secuenciación HLA Sanger del paciente 28. (A) y (B). Los plots muestran la frecuencia del alelo B (BAF) en las células T CD3⁺ autólogas (A) y en las células CD34⁺ (B) del paciente 28. La imagen superior muestra una representación esquemática del CRM 6. La región HLA (6p21.1-21.3) se indica en amarillo. Los puntos negros indican la posición del locus HLA-B en el CRM 6. Se detecta una deleción terminal de aproximadamente 36 Mb (rectángulo rojo) que involucra los loci HLA en las células CD34⁺ (B), en comparación con (A), la muestra control. (C) y (D). Amplificación de la región 6p21 que incluye el locus HLA-B (línea roja). Los resultados del array indican un patrón de homocigosidad (genotipos AA=0 y BB =1) en (D) la fracción CD34⁺ en comparación con (C), la muestra control (genotipos 0, 0.5 o 1). (E) y (F) Los gráficos muestran el logR en los linfocitos T CD3⁺ (E) y células CD34⁺ (F). Las células CD34⁺ conservan el número de copias (logR ratio=0) a lo largo del CRM 6. La falta de genotipos heterocigotos en el brazo corto del CRM 6 en ausencia de una alteración en el número de copias indica una CN-LOH. (G) y (H) Fragmento del electroferograma de secuenciación del exón 3 (codón 151 al codón 157) del locus HLA-B. Se observa una LOH en las posiciones polimórficas (indicado con estrella roja) en las células CD34⁺ (G), en comparación con las células CD3⁺ (H). La secuencia de nucleótidos conservada en las células CD34⁺ corresponde al alelo HLA-B*38:01 (marcado en rojo en la tabla), mientras que el alelo HLA-B*07:02 se pierde.

- Por el contrario, en **33 de los 36 pacientes** estudiados (91.6%), **no se detectaron alteraciones en la región HLA (6p21)** en la fracción de células CD34⁺ cuando se compararon con las células T CD3⁺ autólogas. En este grupo de pacientes, sin alteración en la región HLA, se observa una retención de heterocigosidad a lo largo de todo el CRM 6, presente también en las células T CD3⁺ autólogas. Estos resultados obtenidos mediante SNP-Array fueron confirmados posteriormente mediante tipaje HLA usando la tecnología Luminex (**Tabla 26**).

Hay que destacar que estos pacientes con ausencia de alteración en la región HLA (6p21) presentaban **características clínico-biológicas desfavorables**. Los pacientes con SMD y/o LMAs y los pacientes con LMMC, presentaban *scores* pronósticos IPSS-R de Alto Riesgo, cariotipos complejos y/o presencia de mutaciones en genes HMR; los pacientes diagnosticados de LMA *de novo* presentaban cariotipos alterados y/o mutaciones asociadas a riesgo molecular. En las **Tablas 29 y 30**, se detallan las características clínicas de este grupo de pacientes.

➤ Curiosamente, en **3 de estos 33 pacientes** (2 LMAs y 1 LMA *de novo*) sin alteración en la región HLA, se observaba una LOH en el resto del CRM 6, en comparación con los linfocitos T autólogos del paciente.

La siguiente imagen (**Figura 55**) muestra los resultados obtenidos del SNP-Array de uno de estos 3 pacientes (paciente 22, LMAs) con LOH en el CRM6, pero con retención de heterocigosidad en la región HLA. Los diferentes plots muestran la frecuencia del alelo B (BAF) en las células T CD3⁺ (**A**) y en las células CD34⁺ (**B y C**), en diferentes momentos de la evolución de la enfermedad: **B**) 40% de células CD34⁺ en MO, y **C**) 80% de células CD34⁺ en MO.

Tal y como se comentó en párrafo anterior, estos tres pacientes (paciente 13, paciente 22 y paciente 36) mostraban perfiles clínicos desfavorables: todos ellos presentaban mutaciones en *TP53*, y, además, los dos pacientes con LMAs presentaban cariotipos desfavorables y, al momento del diagnóstico, fueron considerados de Alto riesgo IPSS-R; y el paciente con LMA *de novo* presentaba anomalías citogenéticas asociadas a pronóstico desfavorable.

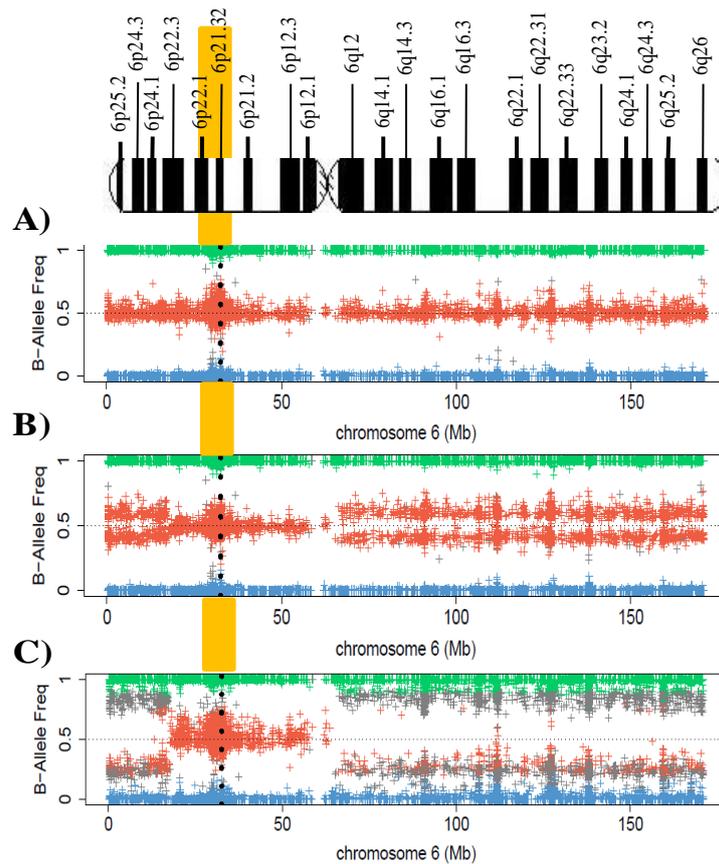


Figura 55. Resultados del SNP-Array del CRM 6 del paciente 22 (LMAs), obtenidos en diferentes momentos del proceso de transformación leucémica. Los plots muestran la frecuencia del alelo B (BAF) en las células T CD3⁺ autólogas (A) y en las células CD34⁺ (B-C) del paciente 22. Se observa un patrón de homocigosidad en la distribución de los SNPs, que no afecta a la región HLA, en una fracción de células CD34⁺, en diferentes momentos de la progresión de la enfermedad, 40% de blastos CD34⁺ en MO (B) y 80% de blastos CD34⁺ en MO (C). Los SNPs en los BAF plots se encuentran alejados de la línea de heterocigosidad (genotipo AB=0.5), y el grado de desviación corresponde con el porcentaje de células tumorales que presentan LOH; representando un tamaño del clon del B) ~25% y C) ~80%. La imagen superior muestra una representación esquemática del CRM 6. La región HLA (6p21.1-21.3) se indica en amarillo. Los puntos negros indican la posición del locus HLA-B en el CRM 6.

Tabla 24. Características de los 36 pacientes incluidos en el estudio SNP-Array.

PACIENTE	% BLASTOS MO	OMS-2017	TIEMPO DIAGNÓSTICO AL ANÁLISIS	IPSS-R	IPSS-R (Score)	RIESGO CITOGENÉTICO	PERFIL MUTACIONAL	TRATAMIENTO
1	7	SMD EB-1	<1 mes	MAR	6	Muy Pobre	<i>TP53, U2AF1, TET2</i>	Azacitidina
2	12	SMD EB-2	<1 mes	MAR	6	Muy Pobre	<i>TP53</i>	Azacitidina
3	11	SMD EB-2	1.5 años	MAR	7	Intermedio	ND	Azacitidina
4	12	SMD EB-2	6.5 años	INT	4,5	Intermedio	<i>RUNX1</i>	Azacitidina
5	13	SMD EB-2	<1 mes	MAR	8,5	Muy Pobre	No detectada	Tto. Soporte
6	10	SMD EB-2	ND	ND	ND	ND	<i>ASXLI, RUNX1, SRSF2, IDH1, TET2</i>	ND
7	10	SMD EB-2	<1 mes	MAR	8,5	Muy Pobre	<i>TP53</i>	Alo-TPH
8	10	SMD EB-2	<1 mes	INT	3	Intermedio	<i>SF3B1, NPM1</i>	Alo-TPH
9	17	SMD EB-2	<1 mes	ND	ND	Bueno	<i>ASXLI, RUNX1, EZH2, ZRSR2, PTPN11</i>	Tto. Soporte
10	15	SMD EB-2	<1 mes	INT	3	Intermedio	<i>SF3B1</i>	Azacitidina
11	20	LMAs	3 años	BR	2	Bueno	No detectada	Lenalidomida
12	22	LMAs	2 años	BR	2	Bueno	<i>SF3B1</i>	Alo-TPH
13	34	LMAs	<1 mes	ND	ND	Muy Pobre	<i>TP53</i>	Azacitidina
14	40	LMAs	1 año	INT	3	Bueno	<i>SF3B1, DNMT3A, TET2</i>	Azacitidina
15	45	LMAs	2 años	MAR	6,5	Intermedio	<i>ASXLI, EZH2, ETV6, KRAS, PTPN11, ABL1</i>	Azacitidina
16	30	LMAs	1.5 años	AR	5	ND	<i>TP53, U2AF1, NRAS</i>	Azacitidina
17	25	LMAs	ND	ND	ND	Bueno	<i>RUNX1, U2AF1, BCOR, NRAS, FLT3-TKD</i>	Azacitidina
18	40	LMAs	ND	ND	ND	ND	<i>RUNX1, EZH2, ASXLI, SF3B1, SETBP1</i>	Azacitidina
19	57	LMAs	ND	ND	ND	ND	<i>RUNX1, SF3B1, IDH2, DNMT3A</i>	Azacitidina
20	20	LMAs	ND	ND	ND	ND	<i>TP53</i>	Azacitidina
21	86	LMAs	ND	ND	ND	ND	<i>RUNX1, EZH2, IDH2, CUX1, STAG2</i>	Azacitidina

PACIENTE	% BLASTOS MO	OMS-2017	TIEMPO DIAGNÓSTICO AL ANÁLISIS	IPSS-R	IPSS-R (Score)	RIESGO CITOGENÉTICO	PERFIL MUTACIONAL	TRATAMIENTO
22	40	LMA	3 meses	AR	9	Muy Pobre	TP53	Azacitidina
	80	LMA	3 meses	AR	9	Muy Pobre	TP53	Azacitidina
23	20	LMA	<1 mes	ND	ND	ND	<i>DNMT3A, IDH1, NRAS</i>	Tto. Soporte
24	20	LMA	<1 mes	ND	ND	Bueno	<i>ASXL1, RUNX1, EZH2, U2AF1</i>	Tto. Soporte
25 ^a	1	LMMC-0	1.5 años	MAR	1	Bueno	<i>ASXL1, SRSF2, TET2</i>	Tto. Soporte
26*	40	LMMC-0	5 años	INT	3.5	Bueno	<i>RUNX1, TET2, CBL, SRSF2</i>	Azacitidina
27 ^a	2	LMMC-1	2 años	BR	2	Bueno	TP53, KRAS	Azacitidina
28	90	LMA <i>de novo</i>	3 años	NA	NA	NA	<i>NPM1, FLT3-TKD, WT1</i>	Alo-TPH
29	26	LMA <i>de novo</i>	<1 mes	NA	NA	NA	No detectada	Quimioterapia
30	70	LMA <i>de novo</i>	<1 mes	NA	NA	NA	<i>NPM1, PTPN11</i>	Quimioterapia
31	56	LMA <i>de novo</i>	<1 mes	NA	NA	NA	<i>ZRSR2</i>	Quimioterapia
32	70	LMA <i>de novo</i>	<1 mes	NA	NA	NA	<i>DNMT3A</i>	Quimioterapia
33	20	LMA <i>de novo</i>	<1 mes	NA	NA	NA	TP53	Quimioterapia
34	38	LMA <i>de novo</i>	<1 mes	NA	NA	NA	TP53, DNMT3A	NA Fallece por neumonía
35	20	LMA <i>de novo</i>	<1 mes	NA	NA	NA	TP53, DNMT3A, TET2, NRAS	Azacitidina
36	70	LMA <i>de novo</i>	<1 mes	NA	NA	NA	TP53, SETBP1	Azacitidina

MO: Médula Ósea; SMD EB-1, -2: Síndrome Mielodisplásico con exceso de Blastos -1, -2; LMA: Leucemia Mieloide Aguda secundaria a SMD; LMMC-0: Leucemia Mielomonocítica Crónica con <5% blastos en MO; LMMC-1: Leucemia Mielomonocítica Crónica con 5-9% blastos en MO.

IPSS-R: Revised International Prognostic Scoring System; MAR: Muy Alto Riesgo; AR: Alto Riesgo, INT: Intermedio, BR: Bajo Riesgo; MBR: Muy Bajo Riesgo.

NA: No Aplicable; ND: No Datos.

Alo-TPH: Trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos.

En la columna perfil mutacional, los genes representados en negrita se corresponden con genes de Alto Riesgo Molecular (Béjar and Steensma 2014).

^a Paciente 25, Paciente 26 y Paciente 27, se usó ADN procedente de monocitos CD14⁺ (>40% monocitos en MO).

Tabla 25. Descripción del cariotipo y del perfil mutacional de los 36 pacientes incluidos en el estudio con SNP-Array

PACIENTE	OMS-2017	DESCRIPCIÓN CARIOTIPO	PERFIL MUTACIONAL			
			Gen	Nucleótido	VAF (%)	Proteína
1	SMD EB-1	44,XY, -5, -7, -13, Add(19), Add(21), +3mar/45,XY Add(16), -18	<i>TP53</i>	c. 659A>G	84	p.Tyr220Cys
			<i>TET2</i>	c.3635T>A	84	p.Leu1212*
			<i>U2AF1</i>	c.470A>G	3	p.Gln157Arg
2	SMD EB-2	44,XY, -5, -7	<i>TP53</i>	c. 455C>T	47	p.Pro152Leu
3	SMD EB-2	45,XY, -7(4)/46,XY(16)	ND	ND	ND	ND
4	SMD EB-2	45,X, del(11)(q21;q23)	<i>RUNX1</i>	c.86T>C	50	p.Leu29Set
5	SMD EB-2	46,XX, add(6), add(10), del(11), add(14), -15, -19, +1mar, +2mar	No Detectada			
			<i>ASXL1</i>	c.1934dupG	42	p.Gly646Trpfs*12
			<i>RUNX1</i>	c.519C>T	41	p.Arg177*
			<i>SRSF2</i>	c.284C>T	49	p.Pro95Leu
			<i>IDH1</i>	c.395G>A	36	p.Arg132His
6	SMD EB-2	ND	<i>TET2</i>	c.1648C>T	2	p.Arg550*
			<i>ASXL1</i>	c.1934dupG	42	p.Gly646Trpfs*12
			<i>RUNX1</i>	c.519C>T	41	p.Arg177*
			<i>SRSF2</i>	c.284C>T	49	p.Pro95Leu
7	SMD EB-2	46,XY, del(5)(q13;q33) (8)/45,XY, -1, del(5), add(10)(q26) (23)/49,XY, +1, del(5), +11, +14 (8)	<i>IDH1</i>	c.395G>A	36	p.Arg132His
			<i>TP53</i>	c.742C>T	89	p.Arg248Trp
			<i>SF3B1</i>	c.2098A>G	33	p.Lys700Glu
			<i>NPM1</i>	c.860_863dupTCTG	26	p.Trp288Cysfs*
			<i>RUNX1</i>	c.784C>T	72	p.Glu262*
8	SMD EB-2	46,XX, del(7q)	<i>ASXL1</i>	c.1934dupG	38	p.Gly646Trpfs*12
			<i>EZH2</i>	c.2216T>C	46	p.Leu739Pro
			<i>ZRSR2</i>	c.370C>T	81	p.Gln124*
			<i>PTPN11</i>	c.215C>A	11	p.Ala72Asp
			<i>SF3B1</i>	c.1972T>A	24	p.Trp658Arg
9	SMD EB-2	46, XY	<i>SF3B1</i>	c.2098A>G	33	p.Lys700Glu
10	SMD EB-2	ND	<i>NPM1</i>	c.860_863dupTCTG	26	p.Trp288Cysfs*
			<i>RUNX1</i>	c.784C>T	72	p.Glu262*
			<i>ASXL1</i>	c.1934dupG	38	p.Gly646Trpfs*12
			<i>EZH2</i>	c.2216T>C	46	p.Leu739Pro
			<i>ZRSR2</i>	c.370C>T	81	p.Gln124*
11	LMAAs	46,XX, del(5q)	<i>PTPN11</i>	c.215C>A	11	p.Ala72Asp
			<i>SF3B1</i>	c.1972T>A	24	p.Trp658Arg
			No Detectada			
			<i>SF3B1</i>	c.2098A>G	17	p.Lys700Glu
			<i>TP53</i>	c.844C>T	59	p.Arg282Trp
12	LMAAs	46,XX, del(5q)	<i>SF3B1</i>	c.2098A>G	17	p.Lys700Glu
13	LMAAs	45,XY, -3, del(5)(q13;q33), add(6)(p25), +8, add(17)(p13), del(20)(q11.2), -22	<i>TP53</i>	c.844C>T	59	p.Arg282Trp
			<i>SF3B1</i>	c.2098 A>G	49	p.Lys700Glu
			<i>DNMT3A</i>	c.2612C>T	45	p.Pro871Leu
14	LMAAs	47,XY, +8	<i>TET2</i>	c.4570C>T	51	p.Gln1524*
			<i>DNMT3A</i>	c.2612C>T	45	p.Pro871Leu

RESULTADOS

15	LMAs	47,XY, +8	<i>ASXL1</i>	c.1934dupG	42	p.Gly646Trpfs*12
			<i>EZH2</i>	c.2003A>G	50	p.Asn668Ser
			<i>ETV6</i>	c.1079G>C	13	p.Trp360Ser
			<i>KRAS</i>	c.35G>T	29	p.Gly12Val
			<i>PTPN11</i>	c.1508G>A	7	p.Gly503Glu
			<i>ABL1</i>	c.820G>A	10	p.Glu274Lys
16	LMAs	ND	<i>TP53</i>	c.638G>T	67	p.Arg213Leu
			<i>U2AF1</i>	c.467G>A	40	p.Arg156His
			<i>NRAS</i>	c.35G>C	11	p.Gly12Ala
17	LMAs	46, XY	<i>RUNX1</i>	c.1016_1017insGT	60	p.Ile339Metfs*
			<i>U2AF1</i>	c.101C>T	42	p.Ser34Phe
			<i>BCOR</i>	c.4871_4872delAG	43	p.Gln162Argfs*13
			<i>NRAS</i>	c.356G>A	22	p.Gly12Asp
			<i>FLT3-TKD</i>	c.2503G>A	13	p.Asp835Asn
18	LMAs	ND	<i>RUNX1</i>	c.404G>A	9	p. Lys580Glu
			<i>EZH2</i>	c.1975G>A	41	p.Asp659Asn
			<i>ASXL1</i>	c.2122C>T	44	p.Gln708*
			<i>SF3B1</i>	c.2342A>G	44	p.Asp781Gly
			<i>SETBP1</i>	c.2608G>A	9	p.Gly870Ser
19	LMAs	ND	<i>RUNX1</i>	c.416G>A	44	p.Arg139Gln
			<i>SF3B1</i>	c.2098A>G	46	p.Lys700Glu
			<i>IDH2</i>	c.419G>A	46	p.Arg140Gln
			<i>DNMT3A</i>	c.2645G>A	46	p.Arg882His
20	LMAs	ND	<i>TP53</i>	c.1043delT	57	p.Leu348Trpfs*22
21	LMAs	ND	<i>RUNX1</i>	c.792_803del10ins2	48	p.Ile264Metfs*17
			<i>EZH2</i>	c.857G>A	47	p.Cys286Tyr
			<i>EZH2</i>	c.619C>T	48	p.Arg207*
			<i>IDH2</i>	c.419G>A	48	p.Arg140Gln
			<i>CUX1</i>	c.764A>T	47	p.Glu255Val
			<i>STAG2</i>	c.226C>T	90	p.Gln76*
22	LMAs	47,XX,del(5)(q13q33),add(8)(p22)x2,add(12)(p11.2),+13,-16[7]/46,XX,add(1)(q22),del(5),add(8),der(8)t(1;8)(p22;q21),add(12),-16,-17,+mar1,+mar2[4]	<i>TP53</i>	c.526T>C	43.6	p.Cys176Gly
	LMAs		<i>TP53</i>	c.526T>C	88.6	p.Cys176Gly
23	LMAs	ND	<i>DNMT3A</i>	c.1126G>A	44.3	p.Ala376Thr
			<i>DNMT3A</i>	c.1228C>G	44.7	p.Ala410Pro
			<i>IDH1</i>	c.394C>T	42.6	p.Arg132Cys
			<i>NRAS</i>	c.181C>A	42	p.Gln61Lys
24	LMAs	46, XX	<i>ASXL1</i>	c.2656A>T	32	p.Lys886*
			<i>RUNX1</i>	c.498_508+1dup	35	
			<i>EZH2</i>	c.261-262delTG	34	p.Ser87Argfs*38
			<i>U2AF1</i>	c.470A>C	33	p.Gln157Pro

RESULTADOS

25	LMMC-0	46, XY	<i>ASXL1</i>	c.1773C>A	51	p.Tyr591*
			<i>SRSF2</i>	c.284C>A	51	p.Pro95His
			<i>TET2</i>	c.3732_3733del CT	50	p.Tyr1245Glyfs*22
			<i>TET2</i>	c.3733_3737delTACTC	43	p.Tyr1245Glyfs*21
26	LMMC-0	46, XY	<i>RUNX1</i>	c.777dupT	40.6	p.Asn260*fs*1
			<i>RUNX1</i>	c.593A>G	31.4	p.Asp198Gly
			<i>TET2</i>	c.3764dupA	45.1	p.Tyr1255*fs*1
			<i>TET2</i>	c.3986T>G	48.3	p.Leu1329Arg
			<i>CBL</i>	c.1249C>T	80.6	p.Pro417Ser
			<i>SRSF2</i>	c.284C>A	41.7	p.Pro95His
27	LMMC-1	46,XX, del(5q)	<i>TP53</i>	c.393_395delCAA	97	p.Asn131del
			<i>KRAS</i>	c.35G>T	16	p.Gly12Val
28	LMA de novo	46, XY	<i>NPM1</i>	c.860_863dupTCTG	34	p.Trp288Cysfs*
			<i>FLT3</i>	c.2503G>T	43	p.Asp835Tyr
			<i>WT1</i>	c.1307G>A	47	p.Cys436Tyr
29	LMA de novo	45, X (5) / 46, XY (15)	No Detectada			
30	LMA de novo	47, XY, +8	<i>NPM1</i>	c.860_863dupTCTG	29	p.Trp288Cysfs*
			<i>PTPN11</i>	c.205G>A	10.4	p.Glu69Lys
31	LMA de novo	ND	<i>ZRSR2</i>	c.1354C>T	51	p.Arg452Cys
32	LMA de novo	46, XX, del(5)(q13;q33)	<i>DNMT3A</i>	c.2711C>T	50	p.Pro904Leu
33	LMA de novo	ND	<i>TP53</i>	c.488A>G	46	p.Tyr163Cys
			<i>TP53</i>	c.919+1G>A	42	
34	LMA de novo	46,XX,add(3)(q22),del(5)(q13q33),del(7)(q22),add(12)(p13),-18,+mar[4]/46,XX,del(5),-7,der(12)t(1;12)(q21;p13),-17-19,+3mar[10]	<i>TP53</i>	c.737T>G	56	p.Met246Arg
			<i>TP53</i>	c.659A>G	26	p.Tyr220Cys
			<i>DNMT3A</i>	c.493-1G>A	23	
35	LMA de novo	46,XX, del(5q)	<i>TP53</i>	c.826_843del18	19.7	p.Ala276_Asp281del
			<i>TP53</i>	c.832C>A	24.3	p.Pro278Thr
			<i>DNMT3A</i>	c.1126G>A	30.4	p.Ala376Thr
			<i>TET2</i>	c.2528_2535del8	29.7	p.Glu843Glyfs*7
			<i>NRAS</i>	c.35G>A	14	p.Gly12Asp
36	LMA de novo	44,X,add(X)(p22),t(3;5)(q27;q15),-6,del(7)(q22),-8,-9,der(12)t(12;17)(p12;q11.2),-16,-17,del(20)(q11.2),+22,+2mar[20]	<i>TP53</i>	c.421T>C	42.6	p.Cys141Arg
			<i>TP53</i>	c.920-2A>G	44.9	
			<i>SETPB1</i>	c.3962G>A	49.8	p.Arg1321His

VAF: Variant Allele Frequency; ND: No Datos.

Los genes representados en negrita corresponden a genes de Alto Riesgo Molecular (Béjar and Steensma 2014).

Tabla 26. Tipaje HLA genómico de los 36 pacientes incorporados en el estudio de SNP-Array.

Paciente	Muestra	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DRB1	HLA-DQB1					
1	#1	A*03:01	A*26:01	B*07:02	B*35:01	C*03:03	C*07:02	DRB1*15:01	DRB1*15:01	DQB1*05:02	DQB1*06:02
	#2	A*03:01	A*26:01	B*07:02	B*35:01	C*03:03	C*07:02	DRB1*15:01	DRB1*15:01	DQB1*05:02	DQB1*06:02
2	#1	A*11:01	A*31:01	B*13:02	B*51:01	C*06:02	C*15:02	DRB1*07:01	DRB1*08:01	DQB1*02:02	DQB1*04:02
	#2	A*11:01	A*31:01	B*13:02	B*51:01	C*06:02	C*15:02	DRB1*07:01	DRB1*08:01	DQB1*02:02	DQB1*04:02
3	#1	A*24:02	A*32:01	B*40:06	B*52:01	C*12:02	C*15:02	DRB1*04:07	DRB1*13:02	DQB1*03:01	DQB1*06:04
	#2	A*24:02	A*32:01	B*40:06	B*52:01	C*12:02	C*15:02	DRB1*04:07	DRB1*13:02	DQB1*03:01	DQB1*06:04
4	#1	A*02:02	A*13:01	B*07:02	B*15:16	C*07:02	C*14:02	DRB1*01:03	DRB1*07:01	DQB1*02:02	DQB1*05:01
	#2	A*02:02	A*13:01	B*07:02	B*15:16	C*07:02	C*14:02	DRB1*01:03	DRB1*07:01	DQB1*02:02	DQB1*05:01
5	#1	A*02:01	A*02:02	B*44:02	B*58:01	C*05:01	C*07:01	DRB1*04:05	DRB1*11:01	DQB1*03:01	DQB1*03:01
	#2	A*02:01	A*02:02	B*44:02	B*58:01	C*05:01	C*07:01	DRB1*04:05	DRB1*11:01	DQB1*03:01	DQB1*03:01
6	#1	A*01:01	A*24:02	B*13:02	B*44:02	C*05:01	C*06:02	DRB1*03:01	DRB1*04:08	DQB1*02:01	DQB1*03:01
	#2	A*01:01	A*24:02	B*13:02	B*44:02	C*05:01	C*06:02	DRB1*03:01	DRB1*04:08	DQB1*02:01	DQB1*03:01
7	#1	A*01:01	A*03:01	B*35:08	B*44:03	C*04:01	C*16:01	DRB1*07:01	DRB1*11:01	DQB1*05:01	DQB1*06:04
	#2	A*01:01	A*03:01	B*35:08	B*44:03	C*04:01	C*16:01	DRB1*07:01	DRB1*11:01	DQB1*05:01	DQB1*06:04
8	#1	A*02:01	A*02:01	B*35:03	B*44:03	C*04:01	C*04:01	DRB1*07:01	DRB1*07:01	DQB1*02:02	DQB1*02:02
	#2	A*02:01	A*02:01	B*35:03	B*44:03	C*04:01	C*04:01	DRB1*07:01	DRB1*07:01	DQB1*02:02	DQB1*02:02
9	#1	A*02:01	A*11:01	B*27:05	B*45:01	C*01:02	C*04:01	DRB1*01:01	DRB1*13:01	DQB1*03:01	DQB1*05:01
	#2	A*02:01	A*11:01	B*27:05	B*45:01	C*01:02	C*04:01	DRB1*01:01	DRB1*13:01	DQB1*03:01	DQB1*05:01
10	#1	A*24:02	A*29:02	B*13:02	B*44:03	C*06:02	C*16:01	DRB1*07:01	DRB1*13:01	DQB1*02:02	DQB1*06:03
	#2	A*24:02	A*29:02	B*13:02	B*44:03	C*06:02	C*16:01	DRB1*07:01	DRB1*13:01	DQB1*02:02	DQB1*06:03
11	#1	A*30:02	-	B*18:01	-	C*05:01	-	DRB1*03:01	-	DQB1*02:01	-
	#2	A*30:02	A*66:01	B*18:01	B*51:01	C*05:01	C*07:01	DRB1*03:01	DRB1*13:03	DOB1*02:01	DOB1*03:01
12	#1	A*02:01	-	-	B*18:01	C*07:01	-	-	DRB1*11:04	DQB1*03:01	-
	#2	A*02:01	A*02:01	B*39:01	B*18:01	C*07:01	C*12:03	DRB1*11:01	DRB1*11:04	DOB1*03:01	DOB1*03:01
13	#1	A*03:01	A*32:01	B*15:01	B*52:01	C*03:03	C*12:02	DRB1*04:04	DRB1*15:02	DQB1*03:02	DQB1*06:01
	#2	A*03:01	A*32:01	B*15:01	B*52:01	C*03:03	C*12:02	DRB1*04:04	DRB1*15:02	DQB1*03:02	DQB1*06:01
14	#1	A*30:02	A*33:01	B*14:02	B*40:01	C*03:04	C*08:02	DRB1*04:04	DRB1*13:03	DQB1*03:01	DQB1*03:02
	#2	A*30:02	A*33:01	B*14:02	B*40:01	C*03:04	C*08:02	DRB1*04:04	DRB1*13:03	DQB1*03:01	DQB1*03:02
15	#1	A*01:01	A*02:01	B*18:01	B*39:01	C*05:01	C*12:03	DRB1*14:01	DRB1*15:01	DQB1*05:03	DQB1*06:02
	#2	A*01:01	A*02:01	B*18:01	B*39:01	C*05:01	C*12:03	DRB1*14:01	DRB1*15:01	DQB1*05:03	DQB1*06:02

Paciente	Muestra	HLA-A		HLA-B		HLA-C		HLA-DRB1		HLA-DQB1	
16	#1	A*01:01	A*31:01	B*08:01	B*53:01	C*04:01	C*07:01	DRB1*01:01	DRB1*03:01	DQB1*02:01	DQB1*05:01
	#2	A*01:01	A*32:01	B*08:01	B*53:01	C*04:01	C*07:01	DRB1*01:01	DRB1*03:01	DQB1*02:01	DQB1*05:01
17	#1	A*25:01	A*30:02	B*18:01	B*44:02	C*05:01	C*05:01	DRB1*10:01	DRB1*13:01	DQB1*05:01	DQB1*06:03
	#2	A*25:01	A*30:02	B*18:01	B*44:02	C*05:01	C*05:01	DRB1*10:01	DRB1*13:01	DQB1*05:01	DQB1*06:03
18	#1	A*24:02	A*30:02	B*18:01	B*50:01	C*05:01	C*06:02	DRB1*03:01	DRB1*04:04	DQB1*02:01	DQB1*04:02
	#2	A*24:02	A*30:02	B*18:01	B*50:01	C*05:01	C*06:02	DRB1*03:01	DRB1*04:04	DQB1*02:01	DQB1*04:02
19	#1	A*02:01	A*02:05	B*18:01	B*50:01	C*05:01	C*06:02	DRB1*03:01	DRB1*11:01	DQB1*02:01	DQB1*03:01
	#2	A*02:01	A*02:05	B*18:01	B*50:01	C*05:01	C*06:02	DRB1*03:01	DRB1*11:01	DQB1*02:01	DQB1*03:01
20	#1	A*02:05	A*31:01	B*14:01	B*58:01	C*07:01	C*08:02	DRB1*03:01	DRB1*04:05	DQB1*02:01	DQB1*03:02
	#2	A*02:05	A*31:01	B*14:01	B*58:01	C*07:01	C*08:02	DRB1*03:01	DRB1*04:05	DQB1*02:01	DQB1*03:02
21	#1	A*29:02	A*33:03	B*44:02	B*44:03	C*05:01	C*16:01	DRB1*01:01	DRB1*12:01	DQB1*03:01	DQB1*05:01
	#2	A*29:02	A*33:03	B*44:02	B*44:03	C*05:01	C*16:01	DRB1*01:01	DRB1*12:01	DQB1*03:01	DQB1*05:01
22	#1	A*01:01	A*03:01	B*07:02	B*18:01	C*07:01	C*07:02	DRB1*03:01	DRB1*04:01	DQB1*02:01	DQB1*03:01
	#2	A*01:01	A*03:01	B*07:02	B*18:01	C*07:01	C*07:02	DRB1*03:01	DRB1*04:01	DQB1*02:01	DQB1*03:01
23	#1	A*02:01	A*23:01	B*37:01	B*49:01	C*06:02	C*07:01	DRB1*11:01	DRB1*11:03	DQB1*03:01	DQB1*03:01
	#2	A*02:01	A*23:01	B*37:01	B*49:01	C*06:02	C*07:01	DRB1*11:01	DRB1*11:03	DQB1*03:01	DQB1*03:01
24	#1	A*02:01	A*24:02	B*49:01	B*49:01	C*07:01	C*07:01	DRB1*07:01	DRB1*07:01	DQB1*02:02	DQB1*02:02
	#2	A*02:01	A*24:02	B*49:01	B*49:01	C*07:01	C*07:01	DRB1*07:01	DRB1*07:01	DQB1*02:02	DQB1*02:02
25*	#1	A*24:02	A*29:02	B*07:02	B*44:03	C*07:02	C*16:01	DRB1*07:01	DRB1*15:01	DQB1*02:02	DQB1*06:02
	#2	A*24:02	A*29:02	B*07:02	B*44:03	C*07:02	C*16:01	DRB1*07:01	DRB1*15:01	DQB1*02:02	DQB1*06:02
26*	#1	A*11:01	A*32:01	B*51:01	B*55:01	C*03:03	C*15:02	DRB1*04:07	DRB1*13:01	DQB1*03:01	DQB1*06:03
	#2	A*11:01	A*32:01	B*51:01	B*55:01	C*03:03	C*15:02	DRB1*04:07	DRB1*13:01	DQB1*03:01	DQB1*06:03
27*	#1	A*01:01	A*11:01	B*35:02	B*53:01	C*04:01	C*04:01	DRB1*13:01	DRB1*13:02	DQB1*06:04	DQB1*06:03
	#2	A*01:01	A*11:01	B*35:02	B*53:01	C*04:01	C*04:01	DRB1*13:01	DRB1*13:02	DQB1*06:04	DQB1*06:03
28	#1	-	A*26:01	-	B*38:01	-	C*12:03	DRB1*01:03	-	DQB1*03:02	-
	#2	A*02:01	A*26:01	B*07:02	B*38:01	C*07:02	C*12:03	DRB1*01:03	DRB1*04:02	DQB1*03:02	DQB1*05:01
29	#1	A*02:01	A*66:01	B*51:05	B*41:02	C*04:01	C*17:01	DRB1*04:03	DRB1*04:04	DQB1*03:01	DQB1*06:03
	#2	A*02:01	A*66:01	B*51:05	B*41:02	C*04:01	C*17:01	DRB1*04:03	DRB1*04:04	DQB1*03:01	DQB1*06:03
30	#1	A*11:01	A*11:01	B*27:05	B*35:01	C*01:02	C*04:01	DRB1*01:01	DRB1*14:01	DQB1*05:01	DQB1*05:03
	#2	A*11:01	A*11:01	B*27:05	B*35:01	C*01:02	C*04:01	DRB1*01:01	DRB1*14:01	DQB1*05:01	DQB1*05:03
31	#1	A*03:01	A*31:01	B*35:03	B*38:01	C*04:01	C*12:03	DRB1*13:01	DRB1*16:01	DQB1*05:02	DQB1*06:03
	#2	A*03:01	A*31:01	B*35:03	B*38:01	C*04:01	C*12:03	DRB1*13:01	DRB1*16:01	DQB1*05:02	DQB1*06:03

Paciente	Muestra	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DRB1	HLA-DQB1					
32	#1	A*24:02	A*32:01	B*35:03	B*35:08	C*04:01	C*04:01	DRB1*11:01	DRB1*13:02	DQB1*03:01	DQB1*06:09
	#2	A*24:02	A*32:01	B*35:03	B*35:08	C*04:01	C*04:01	DRB1*11:01	DRB1*13:02	DQB1*03:01	DQB1*06:09
33	#1	A*26:01	A*66:01	B*41:02	B*44:03	C*16:01	C*17:01	DRB1*03:01	DRB1*07:01	DQB1*02:01	DQB1*02:02
	#2	A*26:01	A*66:01	B*41:02	B*44:03	C*16:01	C*17:01	DRB1*03:01	DRB1*07:01	DQB1*02:01	DQB1*02:02
34	#1	A*02:01	A*29:02	B*44:02	B*44:03	C*05:01	C*16:01	DRB1*04:04	DRB1*17:01	DQB1*02:02	DQB1*03:02
	#2	A*02:01	A*29:02	B*44:02	B*44:03	C*05:01	C*16:01	DRB1*04:04	DRB1*17:01	DQB1*02:02	DQB1*03:02
35	#1	A*24:02	A*30:02	B*07:02	B*18:01	C*05:01	C*07:02	DRB1*01:01	DRB1*03:01	DQB1*02:01	DQB1*05:01
	#2	A*24:02	A*30:02	B*07:02	B*18:01	C*05:01	C*07:02	DRB1*01:01	DRB1*03:01	DQB1*02:01	DQB1*05:01
36	#1	A*02:01	A*68:02	B*35:02	B*53:01	C*04:01	C*04:01	DRB1*11:04	DRB1*13:02	DQB1*03:01	DQB1*06:04
	#2	A*02:01	A*68:02	B*35:02	B*53:01	C*04:01	C*04:01	DRB1*11:04	DRB1*13:02	DQB1*03:01	DQB1*06:04

Tipaje HLA mediante tecnología Luminex de las 36 muestras incluidas en el estudio array-SNP, utilizando el ADN proveniente de células purificadas CD34⁺ (Muestra #1) y de linfocitos T CD3⁺ autólogos (Muestra #2). (*): Pacientes 25, 26 y 27, el ADN usado en el análisis fue obtenido de monocitos CD14⁺ previamente purificados (Muestra #1). (-): Alelo no detectado/no asignado. Los cuadros en rojo indican los tres pacientes del estudio en los que se ha detectado una pérdida de un haplotipo HLA.

4.5.2.2. Grupos HLA-C y HLA-Bw en relación a receptores KIR en los pacientes con LOH

Tras llevar a cabo los estudios de array en el CRM 6 y el tipaje HLA de los 36 pacientes incluidos en el estudio, nos propusimos investigar si pudiese existir alguna relación entre la presencia de LOH en la región HLA y determinadas características de los alelos HLA que estuvieran relacionadas con la activación/inhibición de las células NK y, consecuentemente, con el inmunoescape.

En este contexto, como se ha comentado anteriormente, es conocido que diversos alelos HLA son ligandos de receptores inhibidores (KIR) presentes en las células NK, por lo que la ausencia y/o disminución de alguno de ellos en la célula tumoral conllevaría a la activación NK y a la eliminación por parte de ésta del clon patológico.

A la vista de los resultados anteriores, hemos detectado una CN-LOH en la región HLA en 3 de los 36 casos analizados. En otros tres pacientes del estudio, hemos observado una LOH a lo largo del CRM 6, sin llegar a afectar los loci HLA. Curiosamente, 2 de los 3 casos con CN-LOH HLA fueron homocigotos para los grupos HLA-C (HLA-C1/C1) (**Tabla 27**). En estos casos, en principio, la pérdida de cualquier haplotipo HLA y la posterior duplicación del existente, no alteraría el balance de señales inhibitoras, de tal manera que la célula tumoral no sería susceptible al ataque mediado por células NK.

Por otro lado, no observamos ningún caso con LOH completa en el CRM 6 en el grupo de pacientes heterocigotos para los grupos C (HLA-C1/C2). Solamente se observa un caso heterocigoto (HLA-C1/C2) que presenta una CN-LOH HLA parcial, es decir, que afecta a un subgrupo de células CD34⁺. En este paciente heterocigoto (HLA-C1/C2), la pérdida de un haplotipo conllevaría a una cierta activación de las células NK; pero, sin embargo, la progresión de la enfermedad podría explicarse por la duplicación de los ligandos de inhibición para el alelo HLA-C conservado, al producirse una CN-LOH, en lugar de una LOH.

Tabla 27. Caracterización de los grupos HLA C1/C2 en los 36 pacientes incluidos en el SNP-Array

PACIENTE	OMS-2017	HLA-C	HLA-C	GRUPOS HLA-C NKs	LOH CRM6
11	LMAs	C*05:01	C*07:01	C1/C2	*SI
3	SMD EB-2	C*12:02	C*15:02	C1/C2	NO
5	SMD -EB-2	C*05:01	C*07:01	C1/C2	NO
7	SMD EB-2	C*04:01	C*16:01	C1/C2	NO
15	LMAs	C*05:01	C*12:03	C1/C2	NO
16	LMAs	C*04:01	C*07:01	C1/C2	NO
21	LMAs	C*05:01	C*16:01	C1/C2	NO
30	LMA <i>de novo</i>	C*01:02	C*04:01	C1/C2	NO

RESULTADOS

31	LMA <i>de novo</i>	C*04:01	C*12:03	C1/C2	NO
33	LMA <i>de novo</i>	C*16:01	C*17:01	C1/C2	NO
34	LMA <i>de novo</i>	C*05:01	C*16:01	C1/C2	NO
9	SMD EB-2	C*01:02	C*04:01	C1/C2	NO
35	LMA <i>de novo</i>	C*05:01	C*07:02	C1/C2	NO
26	LMMC-0	C*03:03	C*15:02	C1/C2	NO
10	SMD EB-2	C*06:02	C*16:01	C1/C2	NO
23	LMAs	C*06:02	C*07:01	C1/C2	NO
12	LMAs	C*07:01	C*12:03	C1/C1	*SI
28	LMA <i>de novo</i>	C*07:02	C*12:03	C1/C1	*SI
13	LMAs	C*03:03	C*12:02	C1/C1	SI
22	LMAs	C*07:01	C*07:02	C1/C1	SI
1	SMD EB-1	C*03:03	C*07:02	C1/C1	NO
4	SMD EB-2	C*07:02	C*14:02	C1/C1	NO
14	LMAs	C*03:04	C*08:02	C1/C1	NO
20	LMAs	C*07:01	C*08:02	C1/C1	NO
25	LMMC-0	C*07:02	C*16:01	C1/C1	NO
24	LMAs	C*07:01	C*07:01	C1/C1	NO
36	LMA <i>de novo</i>	C*04:01	C*04:01	C2/C2	SI
2	SMD EB-2	C*06:02	C*15:02	C2/C2	NO
6	SMD EB-2	C*05:01	C*06:02	C2/C2	NO
8	SMD EB-2	C*04:01	C*04:01	C2/C2	NO
17	LMAs	C*05:01	C*05:01	C2/C2	NO
18	LMAs	C*05:01	C*06:02	C2/C2	NO
19	LMAs	C*05:01	C*06:02	C2/C2	NO
27	LMMC-1	C*04:01	C*04:01	C2/C2	NO
29	LMA <i>de novo</i>	C*04:01	C*17:01	C2/C2	NO
32	LMA <i>de novo</i>	C*04:01	C*04:01	C2/C2	NO

SMD EB-1, -2: Síndrome Mielodisplásico con exceso de Blastos -1, -2; LMAs: Leucemia Mieloide Aguda Secundaria a SMD; LMMC-0: Leucemia Mielomonocítica Crónica con <5% blastos en MO; LMMC-1: Leucemia Mielomonocítica Crónica con 5-9% blastos en MO. ***LOH detectada en la región HLA (6p21).**

En relación a las especificidades HLA-Bw, la siguiente tabla (*Tabla 28*) muestra los alelos HLA-B con sus respectivas especificidades (Bw4/Bw6), de los tres pacientes a los que se les detectó CN-LOH HLA.

Tabla 28. Caracterización de los grupos HLA-Bw en los 3 pacientes en los que se detectó CN-LOH HLA mediante SNP-Array

PACIENTE	OMS-2017	HLA-B (Bw)*	HLA-B (Bw)*	HLA-Bw conservado	CN-LOH HLA**
11	LMAs	B*18:01 (Bw6)	B*51:01 (Bw4)	Bw6	PARCIAL
12	LMAs	B*18:01 (Bw6)	B*39:01 (Bw6)	Bw6	COMPLETA
28	LMA <i>de novo</i>	B*07:01 (Bw6)	B*38:01 (Bw4)	Bw4	COMPLETA

* Los alelos HLA-B marcados en negrita pertenecen al haplotipo HLA conservado. **Completa: CN-LOH HLA se detectó en la totalidad de las células CD34⁺. Parcial: CN-LOH HLA se detectó en un subgrupo de las células CD34⁺.

En base a estos resultados, se postula que, en el paciente 28, la inhibición de las células NK se llevó a cabo, de forma adicional, gracias a la presencia del ligando inhibidor HLA-Bw4; ya que, en dicho caso, se conservó el haplotipo HLA que contenía el alelo HLA-B con dicha especificidad. Por otro lado, en el paciente 12, tampoco se generaría susceptibilidad NK, pero en este caso, debido a que la célula NK no reconoce pérdidas de alelos con especificidad Bw6, pues no presenta receptores para dichos ligandos. Sin embargo, el único caso en el que se generaría activación de las células NK en base a dichas especificidades, es en el paciente 11, ya que debido a la LOH HLA, la célula tumoral ha perdido los ligandos inhibidores Bw4.

4.5.3. Estudio de LOH en el CRM 15

Paralelamente, con el fin de comprobar que las alteraciones presentes en el gen de la $\beta 2m$ son infrecuentes en el SMD, se llevó a cabo un estudio mediante SNP-Array en el CRM 15, en los 36 pacientes a los que inicialmente se les llevó a cabo el estudio LOH CRM 6. De igual forma, se utilizó el ADN procedente de blastos CD34⁺ previamente purificados, excepto en los casos diagnosticados con LMMC, en los que se utilizó en ADN de monocitos CD14⁺ purificados. En todos los casos, se utilizó como control el ADN procedente de las células T CD3⁺ autólogas de cada paciente.

En base a los resultados, no se detectó LOH en el CRM 15 en ninguno de los 36 pacientes analizados. Los resultados del SNP-Array mostraron un patrón de heterocigosidad en la distribución de los SNPs a lo largo de todo el CRM 15, tanto en las células CD34⁺ como linfocitos T CD3⁺, en todos los casos estudiados. A continuación, se muestran los resultados del array en el CRM 15 de uno de los pacientes a los que inicialmente se le detectó una LOH en la región HLA (Paciente 12) (*Figura 56*).

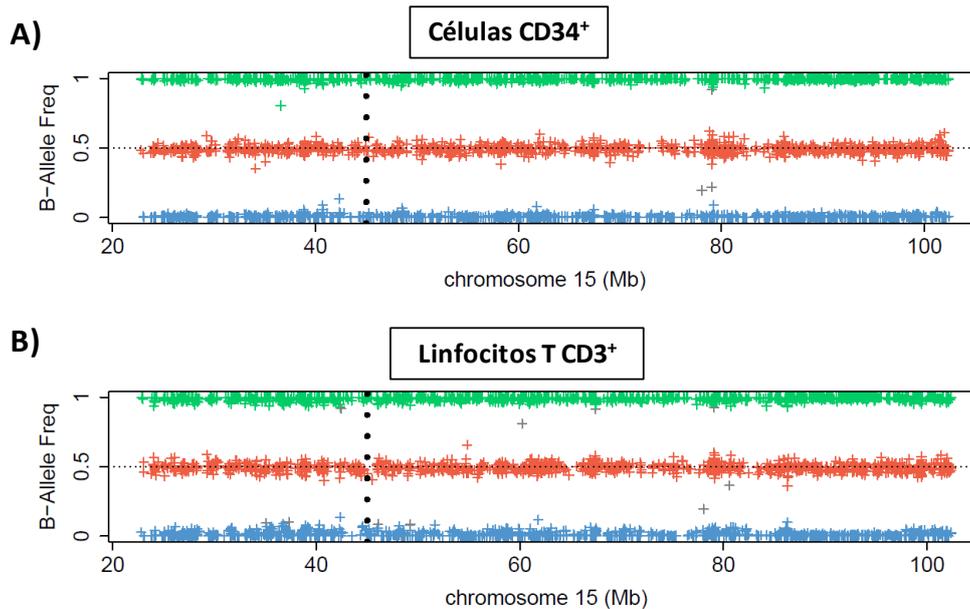


Figura 56. Resultados del SNP-Array del CRM 15 en el paciente 12 (SMD del(5q)). Los puntos negros indican la posición del gen de la $\beta 2m$ en el CRM 15. Los resultados del array indican un patrón de heterocigosidad (genotipos 0, 0.5, 1) en (A) la fracción $CD34^+$, que coincide con el patrón de SNPs observado en los (B) linfocitos T $CD3^+$ autólogos del paciente.

A diferencia de lo observado en el SMD y otras neoplasias hematológicas donde las alteraciones en el gen de la $\beta 2m$ son infrecuentes, en tumores sólidos estos eventos ocurren con elevada frecuencia. A continuación, se recogen los resultados obtenidos del array en el CRM 15 de una línea tumoral de melanoma. Como se puede observar en la **Figura 57**, se detecta una delección intersticial, de aproximadamente 25 Mb, que engloba el gen de la $\beta 2m$.

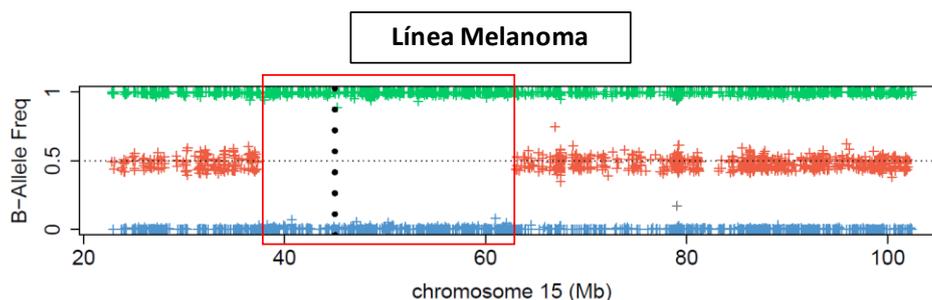


Figura 57. Resultados del SNP-Array del CRM 15 en una línea tumoral de melanoma. Los puntos negros indican la posición del gen de la $\beta 2m$ en el CRM 15. Se detectó una delección intersticial de aproximadamente 25 Mb (indicada en el rectángulo rojo) que involucra el gen de la $\beta 2m$. Los resultados del array indican un patrón de homocigosidad en esta zona (genotipos AA=0 y BB=1), en comparación con el patrón de heterocigosidad encontrado en el resto del CRM 15 (genotipos AA=0, AB=0.5, BB=1).

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Los SMD son un grupo heterogéneo de neoplasias clonales que afectan a la HSC, caracterizados por citopenia, displasia y hematopoyesis ineficaz; con riesgo variable de progresión a LMA. Diversos autores indican que dicha progresión puede estar mediada por un crecimiento selectivo del clon tumoral influenciado por un perfil genético determinado. En esta línea, las anomalías citogenéticas y las mutaciones somáticas recurrentes constituyen dos de los principales eventos génicos que dirigen el desarrollo y progresión de la enfermedad (Béjar and Steensma 2014; Papaemmanuil et al., 2013; Seliger et al., 2002).

Sin embargo, independientemente a la adquisición de factores de riesgo por parte de la célula displásica, el SMD puede desarrollarse con cambios progresivos que afectan a la inmunovigilancia tumoral. El papel del sistema inmunitario en el SMD es complejo e incluso puede resultar ambiguo o contradictorio como lo demuestra el hecho de que se plantean estrategias terapéuticas de inmunosupresión e inmunoestimulación (Glenthøj et al., 2016). Se postula que, en las fases iniciales de la enfermedad, existe un control inmunitario de la clona maligna; mientras que, en fases de progresión y expansión de la misma, prevalecen mecanismos de escape inmunológico.

El modelo de inmunoedición del cáncer, además de tener en cuenta la función protectora del sistema inmunitario ante la aparición de tumores, incorpora la idea de que el tumor es capaz de escapar al reconocimiento por parte de éste y originar de forma activa, mecanismos de escape tumoral (Dunn et al., 2002; Dunn et al., 2004). Así, el curso del SMD podría explicarse de acuerdo con el modelo de inmunoedición del cáncer, donde la fase crónica o etapas iniciales de la enfermedad representarían la fase de “equilibrio”, en la que el sistema inmunitario y la célula tumoral permanecerían en un equilibrio dinámico durante largos periodos de tiempo; y la transformación a leucemia representaría la fase de “inmunescape”. Por tanto, el SMD supone un buen modelo de estudio donde poder determinar los componentes implicados en esta transformación hacia la malignidad.

En este sentido, la progresión tumoral se vería condicionada por múltiples factores que dependen no sólo de cambios genéticos y epigenéticos adquiridos por la célula tumoral que afectan a diversas rutas bioquímicas clave (apoptosis, ciclo celular, etc.), sino también debido a cambios que afectarían la inmunogenicidad de la célula CD34⁺; para eludir así los mecanismos efectores que controlan el desarrollo neoplásico. No obstante, en este contexto de escape inmunológico, se debe considerar también el microambiente en el que se desarrolla el tumor.

Hasta la fecha, los estudios recogidos en pacientes con SMD han sido llevados a cabo de forma independiente. Esta es la primera vez en la que realiza un análisis conjunto de los factores genéticos e inmunológicos; y a la vez simultáneo, en el mismo grupo de pacientes, con el fin de obtener una perspectiva general de los diversos mecanismos implicados en la evolución del SMD y posterior transformación leucémica. Además, por otro lado, la mayoría de los autores se centran en el papel del microambiente tumoral. Sin embargo, nosotros quisimos estudiar otros posibles mecanismos de inmunoevasión, que pudiesen afectar a las características intrínsecas de la clona neoplásica. Por todo esto, se llevó a cabo de forma paralela, el estudio inmunofenotípico del microambiente tumoral, junto con un análisis de las características genéticas e inmunogénicas que pudieran afectar a la célula tumoral.

5.1. CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN IMMUNITARIA DEL MICROAMBIENTE TUMORAL

Los análisis inmunofenotípicos del microambiente medular y periférico revelan una alteración de la respuesta inmunitaria, tanto innata como adaptativa, presente desde las etapas iniciales de la enfermedad, y que se mantiene hasta los estados avanzados de la misma; creando un microambiente tumoral que promueve la inmunoevasión y la transformación leucémica. En general, destacamos cambios relevantes que afectan a diversas poblaciones leucocitarias.

El microambiente tumoral en pacientes con SMD revela una linfopenia que afecta a las tres subpoblaciones linfocitarias (linfocitos T, B y células NK); siendo marcada y profunda la disminución en el número absoluto de linfocitos T CD4⁺. Además, de forma general, se observa un aumento de marcadores asociados con células T exhaustas, cambios inmunofenotípicos relacionados con una alteración en la funcionalidad de células NK, y un microambiente enriquecido en células MDSC.

En relación con la población linfocitaria T CD4⁺, se observó una fuerte disminución en número absoluto y frecuencia en el grupo de pacientes con SMD en SP, en comparación con el grupo control. Además, dicha disminución se mantuvo entre los diferentes grupos de riesgo establecidos (IPSS/IPSS-R/Riesgo citogenético) y en el grupo de pacientes con LMAs. Los resultados sugieren que la disminución T CD4⁺ es la responsable de la alteración de la ratio CD4:CD8 observada en estos pacientes, tal y como ha sido descrita en estudios previos. Un trabajo reciente ha demostrado que la disminución de linfocitos T CD4⁺ en el SMD es un proceso que ocurre de forma independiente a la edad, observándose una ratio CD4:CD8 inversamente alterada tanto en el grupo de pacientes en edades jóvenes como en personas de edad avanzada (Zou et al., 2009). Además, en el SMD se ha observado un aumento de la fragilidad celular de los T CD4⁺ *naïve*, debido a un aumento de la apoptosis celular por la sobreexpresión de ligandos FAS/presencia de TNF- α , o por conversión hacia linfocitos TCD4 *de memoria*. A su vez, dicha disminución T CD4⁺ *naïve* se ha asociado con un aumento en la proliferación, siendo más marcada en el grupo jóvenes de pacientes con SMD, relacionándose así con una mayor respuesta a IST (Zou et al., 2009).

A diferencia de lo que ocurre con la subpoblación celular T CD4⁺, otros autores no encuentran diferencias en la frecuencia de linfocitos T CD8⁺ entre el grupo control y el SMD. En nuestro estudio, encontramos un ligero aumento de la frecuencia de linfocitos T CD8⁺ como consecuencia de la linfopenia T CD4⁺ observada. Sin embargo, observamos también que la subpoblación T CD8⁺ disminuye en número absoluto en SP con respecto al grupo control, aunque no de forma significativa. De igual forma, esta ligera disminución se mantiene entre los grupos de bajo y alto riesgo IPSS/IPSS-R y riesgo citogenético.

Atendiendo a la composición funcional de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD4 (Th1, Th17, Th22, Treg), nuestros resultados no revelan cambios significativos en la proporción de estas poblaciones T funcionales con respecto a los controles, a excepción de las células Th22. Las células Th22 son linfocitos T CD4⁺ que secretan IL-22, pero que no expresan IL-17 o IFN- γ . De forma similar a otros estudios, nuestros resultados demuestran que la frecuencia de este subtipo celular se encuentra aumentada en SP de pacientes con SMD, en comparación con el grupo control; sin embargo, a diferencia de lo recogido en la bibliografía, no observamos

diferencias significativas entre los grupo de pacientes bajo y alto riesgo de progresión según *scores* IPSS, aunque se observa un aumento no significativo de células Th22 en los grupos de riesgo elevado IPSS e IPSS-R. Nuestros resultados sugieren que las células Th22 están relacionadas con la inmunoevasión en el SMD, contribuyendo así a la progresión de la enfermedad. En esta línea, las células Th22 han sido implicadas en la patogénesis de varios tumores sólidos, y en un número de neoplasias hematológicas, tales como LMA o LLA (Tian et al., 2013; Yu et al., 2014).

A diferencia de los resultados obtenidos para las células Th22 periféricas, no observamos diferencias estadísticamente significativas para las células Th1 ni Th17 entre el grupo de pacientes diagnosticados con SMD y el grupo control. En relación a la frecuencia de células Th1, nuestros resultados están en consonancia con otros estudios. Se ha relacionado a las células Th1 con el desarrollo de procesos inflamatorios autoinmunes, tal y como se ha visto que ocurre en las etapas iniciales del SMD. Pero, aunque estudios previos muestran un aumento de citoquinas características de la respuesta celular Th1 (IFN- γ y TNF- α) en el SMD, posteriormente se ha confirmado que estas citoquinas derivan principalmente de los macrófagos medulares (Kitagawa et al., 1997). Por otro lado, en relación a las células Th17, estudios llevados a cabo por *Kordasti* y col. muestran un aumento en la frecuencia de estas células en el grupo de pacientes con SMD de bajo riesgo IPSS (Kordasti et al., 2009); sin embargo, las frecuencias observadas en nuestro grupo de pacientes no varían entre dichos grupos de riesgo. Además, a diferencia de otros grupos, tampoco observamos correlación estadística entre las células Th17 y las células Th22. A la vista de nuestros resultados, ambos tipos celulares no están relacionados con la patogénesis en el SMD.

Por otro lado, hay que destacar también la ausencia de significación estadística obtenida en el estudio para las células Treg en la progresión del SMD y los valores contradictorios en los diferentes grupos de riesgo. Las células Treg han sido identificadas en una gran variedad de tumores sólidos y neoplasias hematológicas, creando un microambiente inmunosupresor, y asociándose con el desarrollo neoplásico (Nishikawa et al., 2014). Mientras que algunos autores postulan un aumento en la frecuencia de dicho conjunto celular en el grupo de pacientes con SMD de alto riesgo IPSS y en etapas avanzadas de la enfermedad (>5% blastos MO) (Kordasti et al., 2007), nuestros resultados no confirman los datos recogidos hasta la fecha. No observamos diferencias durante la progresión de la enfermedad, con una ratio CD8:Treg constante. Contradictoriamente, se observa un aumento significativo de células Treg en el SMD de bajo riesgo IPSS-R, y/o en el grupo de pacientes que presentan riesgo citogenético elevado; por lo que, en base a nuestros resultados, las células Treg no son un parámetro indicativo de progresión en el SMD.

Por otro lado, se quiere enfatizar la elevada presencia de linfocitos T, principalmente CD8⁺, que expresan el marcador CD39, asociado a linfocitos T exhaustos. El antígeno CD39 expresado por los linfocitos T contribuye a la generación de un microambiente inmunosupresor; tal y como ha sido observado en tumores sólidos, o en neoplasias hematológicas, como la LLC, entre otras (Canale et al., 2018; Perry et al., 2012). En nuestro estudio, este marcador se encuentra significativamente aumentado en los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en pacientes con transformación leucémica, LMAs. Diversos autores postulan un aumento de la frecuencia de CTLs (aumento de expresión HLA-DR y CD25) en el SMD de bajo riesgo en comparación con el alto riesgo, responsables de los fenómenos de autoinmunidad medular (Epling-Burnette et al., 2007b).

En consonancia con esto, es lógico pensar que el marcador CD39 se encuentre aumentado en las etapas tardías de la enfermedad, donde encontraríamos un aumento de linfocitos T CD8⁺ exhaustos tras activación crónica. Además, datos provenientes de otros autores sugieren que la disminución de los CTLs podría estar relacionada con el aumento de la expresión de PD-1 en linfocitos T y su ligando, PD-L1, expresado sobre la célula tumoral CD34⁺. Estas moléculas se encuentran aumentadas en el grupo de pacientes con SMD (se discutirá posteriormente). En esta línea, se ha observado en tumores sólidos, que las células T CD8⁺ exhaustas (CD39⁺) aumentan la expresión de múltiples receptores inhibidores, tales como PD-1, LAG-3, entre otros; por lo que es posible que en el SMD participen en la disminución de la respuesta celular T CD8⁺ citotóxica observada por otros autores.

Con respecto a la subpoblación linfocitaria B, nuestros datos son consistentes con otros estudios, donde se observa una disminución en la frecuencia de esta población celular. En la línea de lo observado por *Sternberg* y col., encontramos una disminución en pacientes con SMD. Este grupo ha demostrado que la HSC presenta un menor potencial de diferenciación hacia células B progenitoras y paralelamente, un aumento en los niveles de apoptosis intramedular de células CD19⁺ en los diferentes estadios de diferenciación celular (*Sternberg et al.*, 2005).

Sin embargo, los hallazgos más importantes los encontramos en relación a la población de células NK y a las células MDSC. Basándonos en las células NK, parecen más importantes las alteraciones fenotípicas que puedan afectar a la funcionalidad de dicha célula, antes que a cambios en la célula diana (alteraciones en la expresión total o parcial de antígenos HLA en la superficie de la célula diana: el clon tumoral CD34⁺). Nuestros resultados revelan una importante reducción de receptores activadores de células NK y un aumento en la frecuencia de células NK con fenotipo no citotóxico, durante las fases temprana y tardía de la enfermedad. Se observó un aumento significativo del subconjunto celular NK CD56^{Brigh}, el cual presenta un papel principalmente inmunomodulador (*Freud et al.*, 2017), y una disminución en la expresión de receptores activadores, NKG2D, Nkp46 y CD161 en pacientes con SMD. Además, la frecuencia del receptor NKG2D disminuyó significativamente en el grupo de pacientes con elevado porcentaje de blastos según la OMS 2017, en el grupo de pacientes con *score* pronóstico IPSS de alto riesgo de progresión, y en el grupo de pacientes que presentan riesgo citogenético elevado. En base a estos resultados, se podría postular que la pérdida de receptores activadores en las células NK se relaciona con el grupo de pacientes de SMD que presentan un alto riesgo de progresión leucémica. Además, la disminución de estos receptores activadores es incluso más marcada en aquellos pacientes con transformación leucémica, LMAs.

Similar a nuestros hallazgos, la disminución en los niveles de expresión de receptores activadores en células NK ha sido observada en otras neoplasias hematológicas, como LMC, LMA, y en la leucemia de linfocitos grandes granulares, asociándose con una disminución en la función y citotoxicidad de células NK (*Costello et al* 2002; *Farnault et al.*, 2012). En pacientes con SMD, los defectos en la función NK se atribuyen a la expresión defectuosa de receptores NCR. *Epling* y col. encontraron una disminución del receptor NKG2D, relacionándola estrechamente con una menor citotoxicidad NK (*Epling-Burnette et al.*, 2007a). Sin embargo, la expresión del receptor Nkp46 no se encontró alterada. Además, observaron que la alteración de la citotoxicidad NK se relacionaba con el alto riesgo de progresión según *score* IPSS, cariotipos alterados y SMD con exceso de blastos.

Paralelamente, un estudio llevado a cabo por *Hejazi* y col. observó una elevada frecuencia del subconjunto celular inmaduro no citotóxico CD56^{Bright} en pacientes con SMD y una disminución del subconjunto CD56^{dim}, relacionando así la disminución de este último con un descenso en la citotoxicidad NK (118). Acorde con estos resultados, nosotros observamos un aumento del subconjunto CD56^{Bright}, junto con una disminución del subconjunto NK citotóxico (CD56⁺CD16⁺), por lo que, simultáneamente, la respuesta de células NK alterada en el SMD se podría relacionar con defectos en su maduración. Es conocido que, en condiciones normales, el subconjunto CD56^{dim} representa en SP aproximadamente el 90% de la totalidad de células NK. Similarmente, CD56^{dim} predomina también en el compartimento medular, mientras que el subconjunto CD56^{Bright} se concentra en los órganos linfoides secundarios. Sin embargo, se ha observado que, en sitios de inflamación periférica, las células NK CD56^{Bright} representan el 40-60% del total de células NK, y se caracterizan por la expresión del receptor CD69 (fenotipo activado) (Carrega et al., 2008; Dalberth et al., 2004).

De forma análoga, el SMD se caracteriza por un microambiente inflamatorio que acompaña a las fases iniciales de la enfermedad, por lo que nuestros resultados van en consonancia con los datos recogidos en la bibliografía. En base a esto, encontramos un aumento, aunque no tan pronunciado, de la proporción (%) de células CD56^{Bright} periféricas en pacientes con SMD, alcanzando hasta en algunos casos, valores del 20%. Los resultados no solo se restringen a pacientes con SMD, sino que el aumento CD56^{Bright} ha sido también observado en tumores sólidos, tales como cáncer de mama o pulmón (Carrega et al., 2008; Perea et al., 2017a).

Por otro lado, *Hejazi* y col. confirman la implicación de la familia de receptores inhibidores KIRs en la patogénesis del SMD; sin embargo, nosotros no hemos observado cambios significativos en la expresión de dichos receptores, tanto activadores como inhibidores estudiados. Por lo que, nuestros resultados sugieren que la expresión de receptores NKG2D y NCRs, y no las interacciones entre receptores KIRs y las moléculas HLA-C, se asocian con la progresión a LMA.

Por último, se confirma la disminución de células NK (nº absoluto y frecuencia) en pacientes con SMD con respecto al grupo control; siendo más marcada en los grupos SMD de riesgo elevado (exceso de blastos e IPSS).

En relación al componente mieloide supresor, se observó un aumento significativo de ambos conjuntos celulares (PMN-MDSCs y Mo-MDSCs) en pacientes con SMD y LMAs, en comparación con el grupo control. Por otro lado, el aumento de células Mo-MDSC se correlacionó con una mayor frecuencia de células CD34⁺ en SP en pacientes con SMD. El aumento de células MDSC favorecería el escape inmunitario por parte de las células tumorales y aumentaría el riesgo de progresión a LMA. Nuestros resultados son consistentes con los de otros grupos donde esta población celular se encuentra significativamente aumentada en el SMD y en muchos tipos de cánceres (cáncer de pulmón, colon, mama, ect.), asociándose con etapas avanzadas de la enfermedad (Draghiciu et al., 2015; Waldron et al., 2013). Además, parece ser que la frecuencia de MDSCs está aumentada en los pacientes con mieloma múltiple, correlacionándose con la progresión de la enfermedad. Un estudio reciente muestra un aumento de la frecuencia de Mo-MDSCs en pacientes con LLC, asociándose también a fases avanzadas de la enfermedad y pronóstico desfavorable (Liu et al., 2013).

Además, hemos observado un aumento en la frecuencia de células MDSCs en el grupo de pacientes con SMD de elevado riesgo de progresión (elevado porcentaje de blastos según OMS 2017, elevado *score* IPSS/IPSS-R y cariotipos complejos). En esta línea, Kittang y col. observaron un aumento de la frecuencia y número absoluto de células MDSC en el grupo de pacientes IPSS de alto riesgo en comparación con los de bajo riesgo, en SP. Además, dicho estudio publicado en 2015 revela que los porcentajes de MDSCs fueron más altos en los grupos SMD AREB en comparación con aquellos con bajo porcentaje de blastos; así como en donantes sanos (Kittang et al., 2015).

Por otro lado, se investigó si los cambios observados en las diferentes subpoblaciones linfocitarias presentes en el microambiente medular de pacientes con SMD, reproducían los datos observados en SP. Atendiendo a la composición del *pool* linfocitario T, se observó que tanto el microambiente medular como el periférico estaban compuestos principalmente por linfocitos T CD3⁺, con una elevada frecuencia de linfocitos T CD8⁺, y con una clara inversión de la ratio CD4:CD8. Enfatizamos que, los resultados obtenidos para dichas poblaciones linfocitarias, se mantienen cuando estudiamos el microambiente medular y periférico en el grupo de muestras pareadas.

De forma similar, no encontramos diferencias significativas en la composición funcional de las diferentes subpoblaciones linfocitarias T (Th1, Th17, Th22, Treg) y de sus respectivas ratios (Th1/Treg, Th1/Th17 y CD8/Treg), entre las muestras de MO y SP. Además, se confirmó que la frecuencia de dichas subpoblaciones celulares fue similar en el grupo de muestras pareadas. De acuerdo con estos resultados, sugerimos que la composición celular T y la linfopenia T CD4⁺ descrita previamente en SP en pacientes con SMD, son un reflejo de lo que ocurre en el compartimento medular.

Sin embargo, encontramos un aumento en MO de la frecuencia de marcadores asociados a inmunosupresión de células T o linfocitos T exhaustos (CD39), con respecto a SP. Además, observamos diferencias en relación al componente NK, con un aumento del fenotipo no citotóxico CD56^{Bright} y una mayor frecuencia del receptor activador NKG2D en el compartimento medular. En base a los datos obtenidos en el estudio, sugerimos que la composición del *pool* linfocitario en MO de los pacientes con SMD reproduce lo que ocurre en SP; con excepción de las células NK y de la expresión de algunos sus receptores activadores; predominando en el compartimento medular factores relacionados con la inmunosupresión.

5.2. MUTACIONES SOMÁTICAS EN EL SMD

En relación al perfil mutacional en pacientes con SMD, analizamos 54 genes asociados a neoplasias mieloides mediante técnicas de NGS, utilizando un panel comercial que permitía evaluar la presencia de todas las mutaciones relevantes comunicadas por el grupo Haferlach y col. en los grandes estudios. El análisis se llevó a cabo en 92 casos de pacientes diagnosticados con SMD y LMAs, donde se analizó la variabilidad mutacional y su posible relevancia en la progresión de las células malignas. Encontramos mutaciones somáticas en aproximadamente el 80% de los pacientes estudiados. Gracias a las técnicas de NGS, el conocimiento acerca de los genes con papel relevante en el SMD se ha expandido enormemente en los últimos 6 años, de manera que la identificación de pacientes con mutaciones somáticas ha ido amentando con el

paso del tiempo, tal y como se evidencia en diferentes publicaciones. *Béjar* y col. observaron un 51% de pacientes con al menos una mutación descrita (*Béjar et al., 2011*); *Papaemmanuil* y col. identificaron un 74% de pacientes con mutaciones por secuenciación (*Papaemmanuil et al., 2013*), y *Haferlach* y col., en su último estudio describieron que el 89,5% de los pacientes presentaban mutaciones somáticas (*Haferlach et al., 2014*), resultados similares a los observados en nuestro trabajo, donde casi el 80% de los pacientes presentaron mutaciones en los genes estudiados.

Los genes que aparecen mutados con mayor frecuencia en el grupo de pacientes con SMD coinciden con los publicados previamente por los distintos grupos (*Ver Figura 33 en Resultados*). *TET2* y *SF3B1* presentaban mayor frecuencia de mutación en nuestro estudio, en torno al 20-30% de los casos. Entre un 10-20% de los pacientes presentaban mutaciones en los genes *ASXL1*, *DNMT3A*, *RUNX1*; en torno al 10% de los pacientes presentaron *TP53* mutado; entre el 5-10% de los pacientes se detectaron mutaciones en *ZRSR2*, *EZH2* y *U2AF1*; y en el resto de genes del panel se encontraron mutaciones somáticas en menos del 5% de los pacientes.

Encontramos mutaciones somáticas en proporciones similares entre los pacientes de SMD de bajo y alto riesgo OMS (1,6 mutaciones/paciente en muestras de SMD bajo riesgo, 1,8 mutaciones/paciente en SMD alto riesgo), sin embargo, la media de mutaciones totales aumenta en la LMAs (4,5 mutaciones/paciente). Nuestros resultados difieren en parte de los hallados por *Haferlach* y col (*Haferlach et al., 2014*). En su estudio, la mayoría de los pacientes (73%) con SMD de bajo riesgo (AR, ARSA, CRDM) y citogenética normal presentaban una media de 1,5-2 mutaciones/paciente, similar a nuestros datos; pero, sin embargo, observaron en pacientes de SMD de alto riesgo (AREB-1 y -2) una media de 3,5-4 mutaciones/paciente; dato por el contrario obtenido en nuestro estudio en el grupo de pacientes con LMAs.

A pesar de encontrar un número similar de mutaciones en pacientes de alto y bajo riesgo, en lo que sí existen diferencias es en el tipo de genes afectados. Las mutaciones en genes correspondientes a la vía de la metilación del ADN (*TET2*, *DNMT3A*) y a la del procesamiento del ARNm (*SF3B1*) estaban representadas de manera notable en pacientes con SMD de bajo riesgo (IPSS-R muy bajo, bajo), mientras que las mutaciones en genes relacionados con la reparación del ADN (*TP53*) y en genes modificadores de cromatina (*ASXL1*) se encontraban en SMD de alto riesgo (IPSS-R intermedio, alto y muy alto). Estos resultados están en consonancia con los publicados previamente (*Haferlach et al., 2014*; *Papaemmanuil et al., 2013*).

La presencia de mutaciones en los genes *TP53*, *ETV6*, *ASXL1*, *RUNX1*, *EZH2* ha sido asociada con una menor SG y con un incremento en el riesgo de transformación aguda con independencia de los sistemas pronósticos convencionales (IPSS e IPSS-R) (*Béjar and Steensma 2014*). También, la acumulación de un mayor número de mutaciones totales y/o la presencia de elevadas frecuencias alélicas en el clon patológico, han sido asociadas con un aumento en el riesgo de progresión en pacientes con SMD (*Papaemmanuil et al., 2013*). En consonancia con estos datos, hemos encontrado un mayor número de pacientes con mutaciones en genes HMR en las fases más avanzadas del SMD (73.9% pacientes en la fase tardía vs. 40% pacientes en la fase inicial), asociándose la presencia de dichas mutaciones con la evolución de la enfermedad. Paralelamente, hemos encontrado mayores VAFs en los genes estudiados en la fases más tardías de progresión del SMD.

Además, se quiso comprobar si la aparición de mutaciones o un *status* mutacional definido en el clon patológico, pudiera tener un reflejo en la composición inmunitaria del microambiente tumoral. Por ello, dicho estudio recoge por primera vez, un análisis conjunto del perfil mutacional y del entorno en el cual se produce el desarrollo neoplásico. Destacamos que, ni el *score* mutacional, ni la categoría de la mutación (alto vs. bajo riesgo molecular), ni los valores de VAFs, están asociados con cambios relevantes en la composición del microambiente tumoral, por lo que, a la vista de nuestros resultados, podemos concluir que las mutaciones somáticas contribuyen a la progresión clonal en el SMD de forma independiente al entorno inmunitario.

Por otro lado, es conocido el elevado impacto pronóstico de las anomalías citogenéticas recurrentes asociadas a los SMD, presentes en aproximadamente un 45% de los pacientes al diagnóstico. Acorde con estos resultados, nosotros hemos identificado alteraciones en el cariotipo en el 50% de los pacientes, asociándose la presencia de cariotipos complejos con las etapas más avanzadas de la enfermedad (exceso de blastos).

A diferencia de lo que hemos descrito en referencia a las mutaciones somáticas (no observamos relación alguna entre el perfil mutacional y el microambiente tumoral en la progresión del SMD), hemos observado una asociación entre el perfil citogenético y/o *score* IPSS-R (el cual engloba dicha variable) y la composición inmunitaria; observándose así un microambiente mucho más alterado y favorable para el desarrollo neoplásico en aquellos casos con mayor riesgo citogenético de progresión (Alto riesgo IPSS-R y/o riesgo citogenético).

5.3. CAMBIOS INTRÍNSECOS QUE AFECTAN A LA INMUNOGENICIDAD DE LA CÉLULA TUMORAL

Se ha demostrado que la disfunción del sistema inmunitario del huésped representa uno de los principales mecanismos por los que los tumores evaden la inmunovigilancia, aunque esto también puede estar asociado a factores relacionados con el tumor, incluyendo la expresión deficiente de moléculas HLA-I o el aumento de la expresión del ligando PD-L1 (Fouad and Aanei 2017; Hanahan and Weinberg 2000).

Varios estudios revelan que la expresión de PD-L1 se encuentra aumentada en tumores sólidos y neoplasias hematológicas (Freeman et al., 2000; Keir et al., 2008), y dicho mecanismo parece estar implicado en la inmunoevasión en los pacientes con SMD (Yang et al., 2014). Un estudio llevado a cabo por Yang y col. reveló que el 36% de los 69 pacientes con SMD estudiados mostraron sobreexpresión de PD-L1 sobre precursores hematopoyéticos CD34⁺ (Yang et al., 2014). Nosotros confirmamos que las células CD34⁺ de pacientes con SMD expresan el ligando PD-L1, lo que puede suprimir tanto los procesos de la inmunidad innata como adaptativa, al unirse a su receptor en linfocitos T y células NK; y que, acorde con otros grupos, dicha expresión disminuye significativamente en pacientes con LMAs (Yang et al., 2014).

Además, quisimos estudiar la posibilidad de que diversas alteraciones en la expresión de moléculas HLA-I estuvieran involucradas en la patogénesis del SMD, sugiriendo un posible mecanismo de inmunoevasión que explicara la transformación y la rápida evolución en algunos

pacientes. Las moléculas HLA-I son vitales en el reconocimiento de la célula tumoral por los CTLs, por lo que su disminución reduce la presentación antigénica y permite a la célula tumoral evadir la inmunovigilancia. Este mecanismo ha sido observado en una amplia variedad de tumores (Garrido et al., 1997; Perea et al., 2017a; Seliger et al., 2000; Seliger et al., 2002).

Actualmente, la mayoría de las inmunoterapias están enfocadas a la inhibición de los *immuno checkpoints*, principalmente el complejo PD-1/PD-L1, favoreciendo así la respuesta inmunitaria y la eliminación tumoral; sin embargo, sólo se beneficia una pequeña proporción de pacientes (Chowell et al., 2018; Garrido et al., 2016). Se ha demostrado que la eficacia de la inmunoterapia depende de la expresión de las moléculas HLA-I, como ha sido recientemente observado en cáncer de pulmón, donde tumores HLA-I⁺ han sido asociados con una respuesta a la inmunoterapia, en contraposición de aquellos HLA-I⁻ (McGranahan et al., 2017). Dada que la expresión de moléculas HLA-I es estrictamente necesaria para que se desencadenen respuestas antitumorales efectivas por los CTLs, quisimos evaluar el nivel de expresión de estas moléculas en las células CD34⁺ de pacientes diagnosticados con SMD.

En nuestro estudio, se observó de forma general, una disminución en los niveles de expresión HLA-I globales en los blastos CD34⁺ y en linfocitos T CD3⁺ de pacientes con SMD, en comparación con el grupo control. Esta disminución generalizada en ambos tipos celulares puede atribuirse a la alteración del proceso de hematopoyesis medular observado en estos pacientes, donde la expresión de otros antígenos, como el CD11b, CD13, etc., decaen también en la serie granulocítica (disgranulopoyesis). En esta línea, otros autores han identificado mediante aCGH las mismas alteraciones citogenéticas en el blasto CD34⁺ que en los linfocitos T CD3⁺ (Vercauteren et al., 2012).

Sin embargo, no existe variación en la expresión de moléculas HLA-I entre las células CD34⁺ y los linfocitos T CD3⁺ autólogos cuando analizamos a cada paciente individualmente. Es decir, la expresión HLA-I se conserva en los blastos del SMD y, en consonancia con otros estudios llevados a cabo en células leucémicas de diversas neoplasias hematológicas, raramente se observa un descenso o pérdida completa de la expresión HLA-I en los blastos CD34⁺ (Masuda et al., 2007). De forma similar, en una publicación de 25 pacientes diagnosticados con LMA, la expresión HLA-I se conservó en todos los casos estudiados (Dubois et al., 2012). En nuestro estudio, el análisis de la expresión HLA-I se llevó a cabo utilizando AcMo dirigidos frente al complejo HLA-ABC/ β 2m, por lo que no se descarta la posibilidad de que puedan existir pérdidas alélicas o a nivel de locus.

Además, los niveles de IMF HLA-I en la célula CD34⁺ y durante los diferentes estadios de progresión definidos durante el proceso de maduración mieloide medular (estadio I, II, III y IV), no mostraron expresión aberrante alguna o asincronía. Es decir, estas moléculas mostraron durante el proceso de diferenciación celular una *down*-regulación gradual completamente equivalente a lo observado en las muestras control.

Acorde con estos resultados, nosotros no hemos observado ningún caso con pérdida total de expresión HLA. Nuestros resultados sugieren que las mutaciones u otras alteraciones que inactiven al gen de la β 2m o en otros componentes de la APM que originen la ausencia completa de expresión HLA en la superficie tumoral, no son seleccionadas positivamente por el clon patológico. De hecho, no hemos observado ningún caso de los 36 pacientes estudiados mediante SNP-Array, que presente una LOH en el cromosoma 15. Estos resultados conjuntamente con la expresión de antígenos HLA en superficie, revelan que en contra de lo

observado en tumores sólidos y en algunas neoplasias hematológicas de tipo linfoma, el gen $\beta 2m$ no es un gen conductor (“driver”) de las neoplasias hematológicas de estirpe mieloide con expresión leucémica.

Existen pocos estudios que refieran alteraciones HLA en leucemias, y sólo se han descrito mutaciones que afectan a alelos (Wetzler et al., 2011). Paradójicamente, sí existen datos que recogen la presencia de mutaciones en el gen de la $\beta 2m$ en pacientes con DLBCL y en otros tipos de linfomas (Riemersma et al., 2000). Es probable que la presencia de células HLA-I negativas en los linfomas esté permitida, al igual que en ocurre en otros tumores sólidos (Perea et al., 2017a). Nosotros especulamos que la ausencia completa de expresión de antígenos HLA o alteraciones que afecten al gen de la $\beta 2m$ no son permisivas en las leucemias linfoblásticas o mieloblásticas, debido a que la ausencia total de expresión HLA-I las haría susceptible a un ataque mediado por células NK.

Se conoce desde hace tiempo que la transformación maligna de la célula tumoral se asocia con una alteración en la expresión de moléculas de HLA-I (Garrido et al., 1997). Esta anomalía proporciona a las células neoplásicas la capacidad para escapar del reconocimiento por parte del sistema inmunológico adaptativo (Garrido et al., 1997; Seliger et al., 2002). Nuestro grupo ha participado activamente en la identificación de muchos de los mecanismos moleculares que están implicados en los distintos tipos de alteraciones HLA observadas, algunos de los cuales (LOH, mutaciones en el gen de la $\beta 2m$), suponen lesiones genéticas irreversibles con impacto negativo en la inmunoterapia (Garrido et al., 1997; Méndez et al., 2007; Paschen et al., 2003). Se han identificado desde pérdidas completas, a la pérdida de haplotipo, pérdida de locus o pérdida de alelo; y pueden ser explicadas en el contexto de la inmunoección del cáncer. De acuerdo con estudios recientes, el mecanismo de escape observado con mayor frecuencia en la mayoría de los tumores consiste en la pérdida de haplotipo HLA-I como consecuencia de una LOH, debido a mecanismos de aUPD; sugiriendo una estrategia común de inmunoevasión (Chowell et al., 2018; McGranahan et al., 2017). Este escenario conlleva la presentación de un menor repertorio antigénico por parte de la célula tumoral a los linfocitos T CD8⁺, en comparación con un estado de heterocigosidad, originando una disminución en la efectividad de la respuesta antitumoral llevada a cabo por los CTLs (Chowell et al., 2018; McGranahan et al., 2017).

Hasta la fecha, los estudios de inmunohistoquímica y las diferentes herramientas utilizadas para la determinación del número de copias han documentado pérdidas de HLA-I en una gran variedad de tumores sólidos, a pesar de la complejidad del estudio debido a la naturaleza de la muestra y a los polimorfismos de los loci HLA-I (McGranahan et al., 2017). Esta alteración HLA-I se ha reportado en un 90% de los casos con cáncer cervical (Koopman et al., 2000), en el 49% de los pacientes con carcinoma de pulmón (McGranahan et al., 2017; Perea et al., 2017a), y en el 20-70% de los casos con melanoma (Paschen et al., 2003) y carcinoma laríngeo (Maleno et al., 2002). Pese a esto, la mayoría de las investigaciones han sido llevadas a cabo en tumores sólidos, detectando una alta frecuencia de pérdidas HLA-I en comparación con las neoplasias hematológicas; siendo en estos casos la pérdida de haplotipo HLA-I un mecanismo infrecuente (Wetzler et al., 2001). Sin embargo, paradójicamente se ha detectado una elevada frecuencia de LOH HLA mediante aUPD (aproximadamente el 20%) en pacientes con LMA que han recaído tras haber recibido un TPH HLA Haploidéntico (Vago et al., 2009; Villalobos et al., 2010).

Llama la atención la baja frecuencia de LOH en la región 6p observada en un amplio número de casos con SMD y/o LMAs. Hemos detectado LOH que incluye la región HLA en una baja proporción de pacientes (3/36 casos), demostrando que esta alteración genética es un evento raro (Masuda et al., 2007) en relación con la frecuencia observada en otras neoplasias hematológicas, particularmente linfomas (Sebastián et al., 2016). De los 36 pacientes diagnosticados con SMD y otros trastornos hematológicos (LMA *de novo* y LMMC) a los que se les llevó a cabo el estudio de SNP-Array, detectamos una CN-LOH HLA en sólo 3 de los 36 casos estudiados (8,3%). Curiosamente, estos pacientes con CN-LOH HLA presentaban perfiles clínico-biológico favorables; con ausencia de factores de riesgo, como la presencia de mutaciones de alto riesgo molecular y/o cariotipos complejos. Destacamos que es el primer estudio en el que se detecta una CN-LOH HLA en dos pacientes (LMAs y LMA *de novo*), que recayeron tras un TPH “HLA Idéntico” (Montes et al., 2018).

El paciente 12, fue diagnosticado de SMD del(5q) aislado, con bajo riesgo de progresión leucémica según *score* IPSS/IPSS-R, y cariotipo bueno (bajo riesgo citogenético). Además, la misma mutación *SF3B1* fue detectada en el segundo pre-TPH, y tras la posterior recaída y transformación leucémica (20% blastos MO). Tal y como aparece recogido en la bibliografía, las mutaciones en *SF3B1* se asocian con buen pronóstico, y en esta línea, también han sido asociadas con un desarrollo clínico post-trasplante favorable (Béjar et al., 2014b). El otro paciente (paciente 11) fue diagnosticado de LMAs y, de forma análoga al paciente 12, presentaba un perfil clínico favorable. El último paciente al que se le detectó una CN-LOH HLA (paciente 28) fue diagnosticado de LMA *de novo* sin anomalías citogenéticas. Además, las mutaciones detectadas en el momento de la recaída post-TPH (*FLT3-TKD*, *NMP1*, *WT1*), no han sido recogidas en la bibliografía como marcadores moleculares asociados a pronóstico clínico desfavorable (Döhner et al., 2017).

Es probable que la pérdida selectiva de antígenos HLA en estos tres pacientes favorezca la inmunoevasión tumoral, y explique la expansión y proliferación leucémica. En esta línea, un estudio reciente llevado a cabo en pacientes con LMMC, observó un aumento en la ratio de homocigosidad de los loci HLA-A, -B, -C y -DRB1, en comparación con la población general; sugiriendo la LOH HLA como un posible mecanismo de inmunoevasión (Shah et al., 2011). Además, en un trabajo llevado a cabo por Katagiri y col. en pacientes con AA, se observó una CN-LOH en el CRM 6 que incluía la región HLA en la célula tumoral; sugiriendo un posible mecanismo de escape frente a los fenómenos de autoinmunidad llevados a cabo por los CTLs, reduciendo así la presentación de autoantígenos, hasta el momento desconocidos (Katagiri et al., 2011). Nosotros creemos que en ausencia de mecanismos que expliquen el comportamiento agresivo de la enfermedad en estos tres pacientes, todos ellos con características clínicas y perfiles mutacionales favorables, la LOH HLA podría ser un importante mecanismo de inmunoevasión que explicaría la evolución clonal y la transformación leucémica que experimentaron.

Hasta la fecha, como se ha comentado anteriormente, la pérdida del haplotipo HLA no coincidente en el clon patológico debido a fenómenos de aUPD, ha sido observado aproximadamente en el 20% de los pacientes tras haber recibido un TPH HLA haploidéntico (Vago et al., 2009; Villalobos et al., 2010). Sin embargo, este es el primer estudio en el que se ha detectado una LOH HLA en dos pacientes con LMAs que han recaído tras haber recibido un TPH HLA-Idéntico.

Sin embargo, quisimos investigar las características inmunogenéticas que reunían estos pacientes para que un fenómeno de LOH hubiera ocurrido, ya que como nos hemos referido anteriormente, estas alteraciones son excepcionales en neoplasias hematológicas y sólo descritas en el contexto del trasplante haploidéntico en el cual se ha destacado la importancia de las células NK, y la incompatibilidad en los grupos de HLA-C (HLA-C1/C2). En los dos pacientes de este estudio que habían recibido un trasplante HLA idéntico ocurrió que sus alelos HLA-C pertenecían al mismo grupo. En nuestra situación, la LOH resultó permisiva y la célula tumoral que perdió el haplotipo HLA resultó probablemente invisible a la acción de las células NK. Además, en estos pacientes, no se generó susceptibilidad NK en base a las especificidades HLA-Bw. Curiosamente, en uno de estos dos pacientes, la LOH HLA originó la pérdida del haplotipo HLA que contenía el alelo HLA-B con especificidad HLA-Bw6, mientras que el alelo perteneciente al grupo HLA-Bw4 fue conservado por la célula tumoral. En este sentido, los ligandos HLA-Bw4 se unen a receptores inhibidores KIR presentes en las células NK, por lo que la pérdida de alelos HLA-Bw6 ha sido previamente descrita como un mecanismo de escape no sólo de los CTLs, sino también de células NK (Demanet et al., 2004).

Curiosamente, el paciente con LMAs en el que se detectó una LOH HLA parcial (no presente en la totalidad de la fracción celular CD34⁺), presentaba alelos HLA-C pertenecientes a diferentes grupos C de células NK (HLA-C*07:01 (grupo C1) y HLA-C*05:01 (grupo C2)) (ligandos de receptores inhibidores KIR presentes en las células NK). Si bien la pérdida de un haplotipo HLA en la célula tumoral la haría susceptible al ataque por células NK, debido a la ausencia de la señal inhibidora de receptores KIRs específicos para el alelo HLA-C perdido, esto no ocurrió. Una posible explicación en este caso puede ser atribuible a la existencia de una CN-LOH antes que una LOH, lo que llevaría consigo una duplicación de las señales de inhibición por el alelo HLA-C conservado.

Por otra parte, no hemos detectado ningún caso con LOH HLA en el grupo de pacientes que presentaban un elevado riesgo de progresión según IPSS/IPSS-R, presencia de mutaciones asociadas a riesgo molecular y/o cariotipos complejos. En ausencia de LOH o pérdida completa de HLA, el mecanismo de escape de células tumorales que potencialmente pueden acumular la expresión de más neoepítomos antigénicos debido a la mayor presencia de mutaciones, necesariamente debe de hacerse en el contexto de los cambios que hemos observado en el microambiente inmunitario y que no favorecen el desarrollo de respuestas citotóxicas. Con independencia de que la acumulación de esos factores de riesgo le suponga a la célula tumoral una ventaja en la capacidad de proliferación celular que supere la resistencia del sistema inmunitario, parece obvio que el control inmunitario se ejercería en condiciones desfavorables por las alteraciones funcionales que hemos descrito en nuestro estudio y que también han sido observadas en otros en estudios previos.

En resumen, de nuestros estudios de HLA, creemos que el hecho de que las células leucémicas estén en contacto directo con las células NK en el SMD y otros desórdenes hematológicos, podría explicar por qué la pérdida total de expresión HLA o la pérdida de haplotipo HLA, son mecanismos infrecuentes y raramente observados en las neoplasias hematológicas, en contraposición a los tumores sólidos. De hecho, tal y como se ha comentado anteriormente, sólo se han observado mutaciones que afectan al gen de la $\beta 2m$ en linfomas (Challa-Malladi et al., 2011).

Una posible explicación es que la pérdida total de expresión HLA-I en la célula tumoral la haría susceptible al ataque por células NK, mientras que la pérdida parcial de alelos HLA-I la protegería de la respuesta simultánea de linfocitos T y células NK (Garrido et al., 1997; Watson et al., 2006). En este sentido, a diferencia de lo que ocurre en las leucemias, en los tumores sólidos la célula neoplásica estaría menos expuesta a la acción de las células NK (Carrega et al., 2008). En definitiva, ***es probable que existan también bastantes restricciones para que la LOH HLA se produzca en algunas neoplasias hematológicas.*** En esta línea, proponemos las siguientes razones:

- En primer lugar, que ***existan defectos o dificultades en el homing de las células NK***, que eviten el contacto directo con la célula tumoral. Recientemente, nuestro grupo ha identificado en cáncer de pulmón que los nidos tumorales HLA-I negativos están pobremente infiltrados por CTLs y células NK (Perea et al., 2017a).
- En segundo lugar, es probable que la LOH HLA ocurra preferentemente en aquellos ***grupos de pacientes que sean homocigotos para los alelos HLA-C*** (Dubois et al., 2012, Garrido et al., 1997, Middleton et al., 2007).
- En tercer lugar, la LOH podría ocurrir en individuos con incompatibilidad en HLA-C siempre que concurra ***una CN-LOH, es decir, que se conserve el número de copias en la región HLA*** (Dubois et al., 2012; Perea et al., 2017b). Si esto no ocurre, la LOH HLA conllevaría a una menor inhibición de la célula NK y a un mayor reconocimiento por parte de ésta de la célula tumoral.
- En cuarto lugar, la ***ausencia de una respuesta antitumoral efectiva en el microambiente tumoral***, donde las células NK muestran un fenotipo no citotóxico como hemos observado, podría ser la razón por la que ocasionalmente se observen pérdidas alélicas.

De este estudio se puede concluir que la progresión del SMD parece transcurrir con cambios que afectan a diferentes poblaciones inmunitarias, que inhibirían el desarrollo de una respuesta antitumoral efectiva. El escape inmunitario en el SMD se puede producir por el deterioro funcional de células T y NK y por la presencia de células MDSC, antes que por fenómenos de inmunoeedición que afecten al reconocimiento antigénico de la célula tumoral, y que se circunscriben, como se ha comentado anteriormente, a casos muy concretos. Paralelamente, las mutaciones somáticas representan eventos génicos que contribuyen a la progresión clonal, independientemente de factores inmunológicos y/o factores que afectan a la inmunogenicidad de la célula neoplásica (HLA), donde la presencia de mutaciones asociadas a riesgo molecular, tienen un gran impacto en la progresión tumoral. Estos resultados pueden constituir nuevos biomarcadores con valor pronóstico. Por ejemplo, la LOH HLA representaría un mecanismo de inmunoevasión con valor pronóstico desfavorable e impacto clínico negativo, no respondedor a inmunoterapia; por lo que sería razonable su estudio en aquellos pacientes con SMD catalogados inicialmente de bajo riesgo de progresión en los que la inmunoterapia pueda estar indicada. En definitiva, un mejor conocimiento de los distintos mecanismos implicados en la inmunoevasión tumoral en el SMD podrían ser de gran importancia a la hora de plantear nuevas estrategias terapéuticas que medien en la ruptura de la tolerancia inmunológica frente al tumor.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1) El análisis de poblaciones leucocitarias en el grupo de pacientes con SMD reveló que esta enfermedad transcurre con valores absolutos significativamente bajos en las tres subpoblaciones linfocitarias mayoritarias, siendo especialmente marcada la reducción de células T CD4. Por otra parte, la distribución de las poblaciones leucocitarias en sangre periférica es prácticamente un reflejo de lo que se observa en el microambiente medular de los pacientes con SMD, remarcándose, el deterioro funcional de células T y NK.

2) La progresión del SMD a LMA lleva consigo un deterioro funcional de células T (aparición de marcadores de células T exhaustas), de células NK (disminución de receptores de activación), y un aumento de células mieloides supresoras. Los cambios observados pueden explicar que en la progresión de la enfermedad se genere un microambiente inmunitario que no favorezca el desarrollo de respuestas citotóxicas frente al clon tumoral.

3) Las alteraciones en la expresión de moléculas HLA en la célula tumoral no son frecuentes en los pacientes con SMD. No hemos observado ningún caso con pérdida total de estos antígenos y solamente ha sido posible detectar, en casos muy concretos, pérdida de heterocigosidad debida a deleciones en el brazo corto del cromosoma 6. Estos resultados contrastan con lo observado en tumores sólidos humanos. Es probable que el control inmunitario llevado a cabo por células NK, imposibilite la presencia de células con fenotipo I (pérdida total) y fenotipo II (pérdida haplotípica) en la médula y/o sangre periférica de estos pacientes.

4) Los estudios de SPN-Array demostraron que, en los casos con homocigosidad para los genes HLA, no existió variación en el número de copias; por lo que la LOH transcurre por la pérdida del material genético en un cromosoma 6, concomitantemente con la duplicación y/o recombinación somática del otro cromosoma (CN-LOH). Estas alteraciones se han observado en pacientes que evolucionaron dramáticamente aún a pesar de no presentar factores genéticos asociados con riesgo de progresión.

5) Este mecanismo, descrito en el SMD por primera vez, permitiría el escape simultáneo a los linfocitos T y células NK, por lo que podría interpretarse en el contexto de un proceso de inmunoselección que explicaría el curso agresivo de la enfermedad. No obstante, dicho mecanismo de evasión resultaría preferentemente permisivo en pacientes que presentan homocigosidad para los grupos HLA-C, probablemente porque en estas circunstancias, las alteraciones HLA pasarían inadvertidas al control de las células NK.

6) Las mutaciones somáticas representan factores pronósticos desfavorables, que actúan de forma independiente y no se correlacionan con los cambios en el microambiente inmunitario. Por el contrario, cariotipos complejos se han encontrado asociados a un entorno inmunitario mucho más favorable para el desarrollo y la progresión del clon displásico.

ANEXO

7. ANEXO

Tabla Suplementaria 1. Porcentajes (media±EEM) de las diferentes poblaciones celulares y receptores antigénicos en muestras de MO en pacientes con SMD de Alto Riesgo y Bajo Riesgo de progresión según score IPSS. P, significación estadística entre el grupo Alto Riesgo y Bajo Riesgo.

	<i>Alto Riesgo IPSS</i>	<i>Bajo Riesgo IPSS</i>	<i>P</i>
Linfocitos Totales (%)	26,6±16,3	20,7±10,7	0.140
Linfocitos T (%)			
CD3	65,4±9,9	68,8±2,7	0.693
CD4	26,8±5,4	3,8±1,3	0.185
CD8	32,8±7,4	32,2±1,2	0.657
Células NK (%)	12±4,2	13,7±1,9	0.464
Linfocitos B (%)	8,4±2,6	13,9±1,2	0.098
Linfocitos T CD4 (%)			
Th1	23,8±2,5	21,9±2,8	0.551
Th17	12,5±4,5	14,2±1,7	0.734
Th22	11,3±4,7	6,4±1,9	0.196
Treg	4,8±0,5	8,7±0,7	0.037
CD4⁺ CD39⁺	8,6±3,5	11,0±2,1	0.925
CD4⁺ PD-1⁺	6,1±0,9	9,6±1,7	0.423
Linfocitos T CD8 (%)			
CD8⁺ CD39⁺	7,4±1,1	10,1±2,8	0.663
CD8⁺ PD-1⁺	11,0±0,8	12,1±1,4	0.824
Ratio células T			
CD4/CD8	1,2±0,2	1,2±0,08	0.850
CD8/Treg	6,7±1,6	6,4±1,2	0.821
Th1/Th17	3,6±0,9	2,3±0,5	0.733
Th1/Treg	3,6±0,6	3,7±1,2	0.654
Células NK (%)			
CD56^{Bright}	9,7±5,3	14,1±2,3	0.482
CD56⁺ CD16⁺	64,1±1,7	59,1±6,7	0.823
CD56⁺ CD16⁻	10,7±7,4	15,0±6,8	0.502
CD56⁻ CD16⁺	15,1±0,1	11,5±2,9	0.146
Células NK CD56⁺ (%)			
NKG2D	82,0±7,1	77,6±3,4	0.560
NKp46	56,4±18,0	72,4±3,0	0.427
CD161	84,5±7,1	79,8±2,9	0.791
Células NK CD56⁺ (%)			
KIR2DL1	3,27±1,3	12,1±2,5	0.056
KIR2DS1	1,6±1,6	3,8±1,7	0.395
KIR2DL1/S1	1,5±4,2	1,0±1,3	0.671
KIR2DL2/S2	39,6±4,5	12,2±2,5	0.155
KIR2DL3	0,9±0,3	24,0±3,5	0,451
Células CD34⁺ (%)	6,7±3,6	1,3±1,2	0,001
PD-L1 (%)	47,1±17,3	15,8±3,2	0,502
HLA (MFI)	ND	ND	ND

Tabla Suplementaria 2. Media±EEM de las diferentes poblaciones celulares y receptores antigénicos en muestras de SP en pacientes con SMD de Alto Riesgo y Bajo Riesgo de progresión según score IPSS. P, significación estadística entre el grupo Alto Riesgo y Bajo Riesgo.

	<i>Alto Riesgo IPSS</i>	<i>Bajo Riesgo IPSS</i>	<i>P</i>
Linfocitos Totales (células*10⁻³/mL)	1518,7±264,7	1295,4±99,1	0.573
Linfocitos T (células*10⁻³/mL)			
<i>CD3</i>	1198,1±245,6	858±76,1	0.357
<i>CD4</i>	653,3±157,8	454,3±32,3	0.423
<i>CD8</i>	485,7±148,2	349,4±36,1	0.859
Células NK (células*10⁻³/mL)	155,4±1,6	249,4±35,6	0.330
Linfocitos B (células*10⁻³/mL)	67,1±13,1	121,0±32,8	0.789
Linfocitos Totales (%)	40,5±22,9	30,7±15,9	0.266
Linfocitos T (%)			
<i>CD3</i>	76,5±4,7	66,1±2,6	0.057
<i>CD4</i>	42,6±4,8	35,1±1,2	0.091
<i>CD8</i>	29,8±6,2	27,9±1,3	0.905
Células NK (%)	11,9±4,1	17,7±1,4	0.248
Linfocitos B (%)	4,5±2,3	8,1±12,0	0.573
Linfocitos T CD4 (%)			
<i>Th1</i>	18,3±1,9	23,1±1,1	0.041
<i>Th17</i>	17,7±3,7	12,6±1,6	0.223
<i>Th22</i>	5,1±2,5	7,5±1,4	0.355
<i>Treg</i>	5,5±0,7	7,6±0,4	0.022
<i>CD4⁺ CD39⁺</i>	3,5±0,7	6,4±0,9	0.255
<i>CD4⁺ PD-1⁺</i>	7,3±4,0	6,0±1,4	0.682
Linfocitos T CD8 (%)			
<i>CD8⁺ CD39⁺</i>	2,3±0,9	5,6±1,2	0.259
<i>CD8⁺ PD-1⁺</i>	3,7±1,7	6,9±1,5	0.329
Ratio células T			
<i>CD4/CD8</i>	1,7±0,2	1,4±0,09	0.167
<i>CD8/Treg</i>	6,4±0,5	4,4±0,1	0.357
<i>Th1/Th17</i>	1,4±0,9	2,4±0,7	0.118
<i>Th1/Treg</i>	5,2±1,7	3,9±0,3	0.503
Células NK (%)			
<i>CD56^{Bright}</i>	9,8±2,3	7,1±1,5	0.447
<i>CD56⁺CD16⁺</i>	75,7±5,6	76,5±2,3	0.732
<i>CD56⁺CD16⁻</i>	5,3±1,2	6,3±2,4	0.424
<i>CD56⁻CD16⁺</i>	8,5±2,9	9,5±1,0	0.648
Células NK CD56⁺ (%)			
<i>NKG2D</i>	40,5±7,0	68,7±3,6	0.009
<i>NKp46</i>	76,9±7,1	69,9±3,8	0.165
<i>CD161</i>	63,3±9,4	70,6±4,3	0.435
Células NK CD56⁺ (%)			
<i>KIR2DL1</i>	10,2±4,5	11,9±2,2	0.516
<i>KIR2DS1</i>	5,9±2,9	3,6±1,1	0.282
<i>KIR2DL1/S1</i>	6,6±2,8	1,7±0,1	0.162

KIR2DL2/S2	38,3±10,8	15,1±3,7	0.056
KIR2DL3	7,7±3,6	19,3±2,1	0.080
MDSCs (%)			
PMN-MDSCs	0,3±0,07	0,07±0,01	0.002
Mo-MDSCs	35,4±8,2	9,3±1,3	0.001
Células CD34⁺ (%)			
PD-L1 (%)	6,0±1,3	0,3±1,0	0.0001
HLA (MFI)	23,1±5,6	34,8±6,4	0.419
	ND	ND	ND

Tabla Suplementaria 3. Porcentajes (media±EEM) de las diferentes poblaciones celulares y receptores antigénicos en muestras de MO en pacientes con SMD de Alto Riesgo y Bajo Riesgo de progresión según score IPSS-R. P, significación estadística entre el grupo Alto Riesgo y Bajo Riesgo.

	<i>Alto Riesgo IPSS-R</i>	<i>Bajo Riesgo IPSS-R</i>	<i>P</i>
Linfocitos Totales (%)	25,1±3,0	12,3±3,9	0.001
Linfocitos T (%)			
<i>CD3</i>	64,5±3,4	70,3±3,9	0.541
<i>CD4</i>	32,1±1,7	31,6±1,1	0.992
<i>CD8</i>	28,6±2,1	34,3±1,9	0.026
Células NK (%)	15,3±2,3	12,6±3,1	0.306
Linfocitos B (%)	11,3±3,9	13,8±1,7	0.461
Linfocitos T CD4 (%)			
<i>Th1</i>	25,9±1,8	20,9±1,9	0.357
<i>Th17</i>	11,9±2,2	14,6±2,9	0.952
<i>Th22</i>	12,7±1,9	5,1±3,5	0.129
<i>Treg</i>	5,9±1,2	9,1±0,8	0.024
<i>CD4⁺ CD39⁺</i>	11,8±0,7	9,7±1,4	0.683
<i>CD4⁺ PD-1⁺</i>	9,7±6,3	8,9±5,5	0.834
Linfocitos T CD8 (%)			
<i>CD8⁺ CD39⁺</i>	8,1±1,5	10,3±1,1	0.563
<i>CD8⁺ PD-1⁺</i>	14,6±6,3	11,1±5,9	0.390
Ratio células T			
CD4/CD8	1,4±0,7	1,0±0,4	0.039
CD8/Treg	2,4±3,8	2,0±0,8	0.757
Th1/Th17	3,5±2,2	2,1±1,5	0.461
Th1/Treg	4,9±1,9	3,2±1,9	0.312
Células NK (%)			
<i>CD56^{Bright}</i>	9,1±1,9	14,9±1,8	0.509
<i>CD56⁺ CD16⁺</i>	51,8±3,7	62,1±1,7	0.579
<i>CD56⁺ CD16⁻</i>	30,3±1,1	9,6±1,9	0.517
<i>CD56⁻ CD16⁺</i>	8,5±2,1	13,0±2,0	0.926
Células NK CD56⁺ (%)			
NKG2D	77,9±5,5	78,1±2,5	0.631
NKp46	66,7±6,1	71,7±1,5	0.827
CD161	85,5±6,7	78,8±5,3	0.694

Células NK CD56+ (%)			
KIR2DL1	14,8±5,9	10,1±5,5	0.869
KIR2DS1	1,6±1,9	4,2±4,8	0.238
KIR2DL1/S1	0,8±1,5	1,1±1,3	0.406
KIR2DL2/S2	19,8±5,2	13,9±4,5	0.933
KIR2DL3	26,1±2,9	20,1±1,6	0.433
Células CD34+ (%)	4,5±2,0	1,1±0,9	0.055
PD-L1 (%)	31,2±8,4	15,9±6,7	0.517
HLA (MFI)	ND	ND	ND

Tabla Suplementaria 4. Media±EEM de las diferentes poblaciones celulares y receptores antigénicos en muestras de SP en pacientes con SMD de Alto Riesgo y Bajo Riesgo de progresión según score IPSS-R. P, significación estadística entre el grupo Alto Riesgo y Bajo Riesgo.

	Alto Riesgo IPSS-R	Bajo Riesgo IPSS-R	P
Linfocitos Totales (células*10⁻³/mL)	1311,3±140,1	1335,8±123,1	0.939
Linfocitos T (células*10⁻³/mL)			
CD3	917,3±118,2	909,8±91,2	0.613
CD4	522,5±69,0	450,7±45,4	0.809
CD8	355,5±64,1	387,4±43,9	0.322
Células NK (células*10⁻³/mL)	175,9±26,1	281,5±51,2	0.318
Linfocitos B (células*10⁻³/mL)	145,1±38,1	80,0±17,8	0.692
Linfocitos Totales (%)	36,5±3,8	28,6±2,9	0.239
Linfocitos T (%)			
CD3	69,8±3,2	68,2±2,3	0.613
CD4	39,9±2,8	33,6±1,3	0.090
CD8	27,3±2,9	19,6±1,7	0.194
Células NK (%)	13,9±2,7	19,2±2,2	0.276
Linfocitos B (%)	9,8±2,9	5,2±0,8	0.210
Linfocitos T CD4 (%)			
Th1	21,4±1,1	22,6±1,7	0.536
Th17	16,2±2,4	10,9±1,9	0.064
Th22	5,9±2,9	7,8±1,6	0.727
Treg	6,4±0,5	7,1±0,5	0.099
CD4⁺ CD39⁺	3,5±0,3	7,7±1,3	0.128
CD4⁺ PD-1⁺	7,5±6,0	5,4±3,7	0.421
Linfocitos T CD8 (%)			
CD8⁺ CD39⁺	3,5±1,3	5,9±1,7	0.191
CD8⁺ PD-1⁺	6,3±5,4	6,0±3,9	0.903
Ratio células T			
CD4/CD8	1,6±0,1	1,3±0,2	0.019
CD8/Treg	5,3±0,6	4,3±0,3	0.660
Th1/Th17	1,7±0,3	2,7±0,4	0.116
Th1/Treg	4,8±0,2	3,5±0,7	0.415

Células NK (%)			
<i>CD56^{Bright}</i>	7,9±1,1	7,1±1,2	0.437
<i>CD56⁺CD16⁺</i>	76,3±3,8	77,4±3,4	0.951
<i>CD56⁺CD16⁻</i>	5,9±1,0	6,0±1,4	0.300
<i>CD56⁻CD16⁺</i>	9,4±1,2	8,8±1,3	0.855
Células NK CD56⁺ (%)			
NKG2D	57,8±5,4	66,0±4,3	0.329
NKp46	74,4±6,5	68,8±4,5	0.124
CD161	69,9±7,0	68,2±5,1	0.455
Células NK CD56⁺ (%)			
KIR2DL1	16,0±4,6	8,3±1,9	0.058
KIR2DS1	4,6±1,0	4,5±1,1	0.823
KIR2DL1/S1	3,8±0,4	2,9±1,0	0.730
KIR2DL2/S2	21,1±5,0	20,1±5,3	0.879
KIR2DL3	17,5±3,4	16,3±3,8	0.985
MDSCs (%)			
PMN-MDSCs	0,2±0,1	0,07±0,05	0.015
Mo-MDSCs	26,2±5,7	6,2±1,7	0.004
Células CD34⁺ (%)			
<i>PD-L1 (%)</i>	2,9±2,5	0,4±1,2	0.001
<i>HLA (MFI)</i>	32,8±7,7	31,1±6,3	0.630
	ND	ND	ND

Tabla Suplementaria 5. Media±EEM de las diferentes poblaciones celulares y receptores antigénicos en muestras de MO en pacientes con SMD, con riesgo citogenético: Favorable, Intermedio y Pobre. P₁, significación estadística entre los grupos (Pobre vs. Intermedio); P₂, significación estadística entre los grupos (Pobre vs. Bueno); P₃, significación estadística entre los grupos (Intermedio vs. Bueno). P entre grupos mediante U de Mann Whitney.

	<i>Pobre</i>	<i>Intermedio</i>	<i>Bueno</i>	<i>P₁</i>	<i>P₂</i>	<i>P₃</i>
Linfocitos Totales (%)	26,5±14,0	18,8±6,4	12,3±1,9	0.126	0.005	0.333
Linfocitos T (%)						
<i>CD3</i>	70,5±12,7	69,7±6,3	69,0±2,7	0.555	0.190	0.537
<i>CD4</i>	25,3±6,7	38,3±4,9	29,6±1,4	0.126	0.455	0.043
<i>CD8</i>	39,9±10,6	27,7±1,2	34,0±1,4	0.195	0.437	0.251
Células NK (%)	15,3±1,3	12,9±4,1	14,3±1,4	0.814	0.062	0.283
Linfocitos B (%)	5,7±2,0	7,2±2,2	13,1±1,9	0.556	0.034	0.640
Linfocitos T CD4 (%)						
<i>Th1</i>	21,2±0,2	29,2±2,5	24,0±1,4	0.221	0.965	0.546
<i>Th17</i>	13,4±5,9	10±2,5	14,1±1,4	0.655	0.758	0.579
<i>Th22</i>	10,7±5,4	15,1±2,5	6,2±1,1	0.650	0.315	0.175
<i>Treg</i>	4,0±0,7	10,7±2,5	8,1±0,4	0.021	0.013	0.332
<i>CD4⁺ CD39⁺</i>	10,5±4,3	16,5±6,4	11,8±11,1	0.950	0.811	0.716
<i>CD4⁺ PD-1⁺</i>	7,0±8,2	13,6±8,8	10,5±2,6	0.867	0.923	0.595
Linfocitos T CD8 (%)						
<i>CD8⁺ CD39⁺</i>	8,5±2,5	9,2±2,1	10,0±2,1	0.877	0.471	0.563
<i>CD8⁺ PD-1⁺</i>	11,0±4,2	13,0±2,8	13,3±6,4	0.580	0.682	0.295

Ratio células T						
CD4/CD8	1,0±0,2	1,4±0,2	0,9±0,05	0.289	0.975	0.020
CD8/Treg	5,1±3,1	5,7±3,6	6,0±1,8	0.205	0.155	0.423
Th1/Th17	4,0±2,1	2,9±1,3	2,5±0,6	0.987	0.676	0.451
Th1/Treg	3,6±0,8	3,5±0,5	4,0±2,2	0.900	0.909	0,312
Células NK (%)						
CD56^{Bright}	3,8±0,5	14,9±1,8	13,8±2,4	0.221	0.291	0.403
CD56⁺CD16⁺	62,9±0,9	64,7±0,8	60,7±5,9	0.221	0.869	0.954
CD56⁺CD16⁻	18,1±2,2	8,5±3,4	15,5±4,3	0.221	0.409	0.493
CD56⁻CD16⁺	15,5±1,1	13,2±2,6	10,0±2,0	0.480	0.509	0.361
Células NK CD56⁺ (%)						
NKG2D	77,0±3,2	83,5±3,6	76,7±3,7	0.321	0.813	0.663
NKp46	74,8±14,6	52,8±14,0	72,1±6,3	0.253	0.937	0.127
CD161	79,5±10,8	78,8±10,3	76,0±6,2	0.950	0.965	0.964
Células NK CD56⁺ (%)						
KIR2DL1	5,3±4,2	9,8±4,5	9,6±1,2	0.410	0.095	0.743
KIR2DS1	1,5±1,2	1,9±2,7	3,8±1,5	0.480	0.321	0.776
KIR2DL1/S1	0,5±1,3	1,5±2,2	1,0±1,3	0.462	0.325	0.864
KIR2DL2/S2	35±10,5	30,6±13,3	13,5±3,0	0.980	0.176	0.152
KIR2DL3	10,8±13,6	13,5±13,9	20,2±5,2	0.965	0.180	0.585
Células CD34⁺ (%)						
PD-L1 (%)	7,7±3,8	5,6±2,4	2,7±0,6	0.034	0.162	0.691
HLA (MFI)	45,0±10,4	18,3±10,4	16,1±2,2	0.221	0.099	0.324
	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Tabla Suplementaria 6. Media±EEM de las diferentes poblaciones celulares y receptores antigénicos en muestras de SP en pacientes con SMD, con riesgo citogenético: Favorable, Intermedio y Pobre. P_1 , significación estadística entre los grupos (Pobre vs. Intermedio); P_2 , significación estadística entre los grupos (Pobre vs. Bueno); P_3 , significación estadística entre los grupos (Intermedio vs. Bueno). P entre grupos mediante U de Mann Whitney.

	<i>Pobre</i>	<i>Intermedio</i>	<i>Bueno</i>	P_1	P_2	P_3
Linfocitos Totales (células*10⁻³/mL)	1360,0±576,1	1531,6±173,5	1499,0±112,5	0.810	0.735	0.833
Linfocitos T (células*10⁻³/mL)						
CD3	1179,2±685,1	1183,8±167,9	960,6±89,2	0.632	0.813	0.417
CD4	801,9±452,8	602,1±93,3	528,6±61,5	0.719	0.595	0.408
CD8	360,6±150,6	470,2±72,1	385,8±31,6	0.632	0.859	0.661
Células NK (células*10⁻³/mL)						
	113,6±92,1	184,8±23,2	251,8±36,2	0.281	0.340	0.574
Linfocitos B (células*10⁻³/mL)						
	46,7±40,7	75,2±14,7	139,9±31,1	0.472	0.478	0.858
Linfocitos Totales (células*10⁻³/mL)						
	24,9±3,2	31,2±20,6	16,6±15,9	0.610	0.820	0.469

Linfocitos T (%)	71,6±12,2	75,7±2,5	67,4±3,6	0.667	0.785	0.500
CD3	42,8±12,7	39,6±2,8	36,0±2,3	0.668	0.495	0.243
CD4	26,3±2,6	30,9±2,7	27,4±1,5	0.632	0.856	0.436
CD8						
Células NK (%)	22,7±11,2	12,8±1,6	17,3±1,6	0.363	0.608	0.278
Linfocitos B (%)	2,6±1,8	4,6±2,2	8,6±11,8	0.196	0.101	0.240
Linfocitos T CD4 (%)						
Th1	18,7±4,1	19,9±1,3	22,6±2,7	0.914	0.392	0.504
Th17	10,9±3,1	16,1±2,2	11,4±2,4	0.060	0.437	0.097
Th22	6,2±4,2	5,3±0,4	8,5±0,8	0.288	0.319	0.196
Treg	11,3±6,9	6,7±2,9	7,1±3,1	0.589	0.519	0.704
CD4⁺ CD39⁺	19,8±2,3	8,9±3,7	8,1±4,1	0.187	0.312	0.226
CD4⁺ PD-1⁺	3,3±3,2	8,4±6,1	8,7±5,8	0.221	0.547	0.910
Linfocitos T CD8 (%)						
CD8⁺ CD39⁺	3,5±1,3	1,9±0,9	5,0±0,4	0.187	0.915	0.052
CD8⁺ PD-1⁺	3,5±0,7	7,6±6,7	13,3±6,4	0.414	0.659	0.343
Ratio células T						
CD4/CD8	1,6±0,4	1,5±0,1	1,4±0,09	0.738	0.682	0.907
CD8/Treg	3,6±0,6	5,9±0,8	4,7±0,5	0.667	0.731	0.134
Th1/Th17	2,7±1,3	1,6±1,1	5,6±1,3	0.141	0.678	0,113
Th1/Treg	4,5±2,2	4,2±0,7	3,6±0,2	0.910	0.732	0.634
Células NK (%)						
CD56^{Bright}	8,9±4,1	7,4±2,2	8,5±2,9	0.628	0.650	0.616
CD56⁺ CD16⁺	68,5±13,1	79,1±4,5	72,0±3,8	0.544	0.873	0.265
CD56⁺ CD16⁻	7,5±2,6	5,9±1,6	8,8±1,1	0.396	0.789	0.200
CD56⁻ CD16⁺	14,8±10,9	13,2±1,1	10,2±1,0	0.716	0.936	0.436
Células NK CD56⁺ (%)						
NKG2D	35,8±12,9	58,8±6,2	67,3±7,9	0.090	0.025	0.172
NKp46	65,5±15,5	65,8±4,5	70,7±5,4	0.628	0.894	0.366
CD161	47,7±12,5	67,9±7,4	68,7±7,9	0.249	0.109	0.978
Células NK CD56⁺ (%)						
KIR2DL1	21,8±6,8	7,6±3,4	13,8±3,5	0.043	0.095	0.080
KIR2DS1	0,5±0,9	3,4±0,3	3,7±0,4	0.836	0.262	0.532
KIR2DL1/S1	0,4±0,6	3,0±5,6	1,7±2,6	0.836	0.333	0.485
KIR2DL2/S2	13,2±12,8	21,7±7,6	15,7±6,0	0.391	0.471	0.523
KIR2DL3	13,3±4,3	11,5±4,3	19,9±4,5	0.499	0.352	0.051
MDSCs (%)						
PMN-MDSCs	0,2±0,2	0,3±0,1	0,1±0,1	0.434	0.105	0.559
Mo-MDSCs	32,8±17,1	22,2±6,3	8,8±5,1	0.497	0.169	0.050
Células CD34⁺ (%)	6,6±2,1	4,6±2,3	0,4±0,9	0.041	0.001	0.001
PD-L1 (%)	20,9±5,3	27,5±7,8	31,5±7,1	0.139	0.231	0.324
HLA (MFI)	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Tabla Suplementaria 7. Porcentajes (media±EEM) de las diferentes poblaciones celulares y receptores antigénicos en muestras de MO en pacientes con SMD según ausencia/presencia mutaciones HMR. P, significación estadística entre el grupo Ausencia HMR y Presencia HMR.

<i>Médula Ósea</i>	<i>Ausencia HMR</i>	<i>Presencia HMR</i>	<i>P</i>
Linfocitos Totales (%)	16,7±3,4	18,6±3,8	0.237
Linfocitos T (%)			
CD3	65,8±4,7	56,4±3,6	0.805
CD4	35,9±8,8	22,5±5,2	0.743
CD8	29,9±8,2	26,8±6,3	0.663
Células NK (%)	18,5±6,1	18,8±7,4	0.191
Linfocitos B (%)	9,6±0,3	6,9±1,0	0.692
Linfocitos T CD4 (%)			
Th1	22,8±1,6	29,1±2,8	0.139
Th17	10,9±2,4	9,7±1,7	0.938
Th22	7,4±2,0	2,4±0,3	0.386
Treg	5,7±0,5	6,5±1,1	0.751
CD4 ⁺ CD39 ⁺	6,4±1,4	6,0±0,4	0.390
CD4 ⁺ PD-1 ⁺	0,3±0,1	0,6±0,5	0.069
Linfocitos T CD8 (%)			
CD8 ⁺ CD39 ⁺	7,3±2,8	7,1±2,0	0.892
CD8 ⁺ PD-1 ⁺	1,8±1,1	1,9±1,6	1.000
Ratio células T			
CD4/CD8	1,2±0,1	1,0±0,6	0.167
CD8/Treg	4,4±2,5	4,2±1,2	0.357
Th1/Th17	2,1±0,1	3,0±1,0	0.118
Th1/Treg	4,0±1,7	4,5±0,3	0.503
Células NK (%)			
CD56 ^{Bright}	7,5±1,5	14,3±4,6	0.947
CD56 ⁺ CD16 ⁺	52,4±9,9	56,5±7,5	0.544
CD56 ⁺ CD16 ⁻	30,5±10,8	20,6±3,1	0.808
CD56 ⁻ CD16 ⁺	10,8±2,5	17,8±9,8	0.564
Células NK CD56⁺ (%)			
NKG2D	77,7±3,3	64,2±7,1	0.564
NKp46	71,1±5,4	62,4±7,4	0.149
CD161	75,6±4,6	6,5±3,6	0.170
Células NK CD56⁺ (%)			
KIR2DL1	11,2±1,5	12,1±3,1	0.855
KIR2DS1	5,3±2,3	3,1±1,1	0.515
KIR2DL1/S1	1,8±0,9	0,9±0,3	0.162
KIR2DL2/S2	15,6±3,2	10,1±2,0	0.136
KIR2DL3	20,5±4,8	26,3±7,0	0.194
Células CD34⁺ (%)	5,0±1,5	25,7±7,3	0.029
PD-L1 (%)	19,2±5,9	10,7±1,7	0.128
HLA (MFI)	ND	ND	ND

Tabla Suplementaria 8. Porcentajes (media±EEM) de las diferentes poblaciones celulares y receptores antigénicos en muestras de SP en pacientes con SMD según ausencia/presencia mutaciones HMR. P, significación estadística entre el grupo Ausencia HMR y Presencia HMR.

<i>Sangre Periférica</i>	<i>Ausencia HMR</i>	<i>Presencia HMR</i>	<i>P</i>
Linfocitos Totales (%)	29,1±6,3	32,3±4,1	0.393
Linfocitos T (%)			
CD3	58,4±6,5	70,3±4,6	0.086
CD4	35,1±7,2	41,2±6,5	0.132
CD8	23,0±6,5	26,0±5,3	0.142
Células NK (%)	17,2±4,8	16,4±2,5	0.510
Linfocitos B (%)	10,9±3,3	8,6±2,2	0.249
Linfocitos T CD4 (%)			
Th1	23,6±2,9	25,1±3,5	0.976
Th17	9,6±0,3	13,5±2,0	0.152
Th22	7,4±1,7	7,3±1,1	0.375
Treg	6,9±0,5	7,0±0,2	0.770
CD4 ⁺ CD39 ⁺	5,1±1,9	7,5±1,1	0.261
CD4 ⁺ PD-1 ⁺	0,5±0,1	0,9±0,1	0.090
Linfocitos T CD8 (%)			
CD8 ⁺ CD39 ⁺	4,0±0,9	3,5±1,9	0.719
CD8 ⁺ PD-1 ⁺	5,1±1,1	6,5±1,0	0.450
Ratio células T			
CD4/CD8	1,5±0,3	1,6±0,2	0.167
CD8/Treg	3,3±1,5	3,7±1,2	0.357
Th1/Th17	2,6±0,9	1,8±0,7	0.118
Th1/Treg	3,4±1,7	3,6±0,3	0.503
Células NK (%)			
CD56 ^{Bright}	7,0±2,1	4,3±1,3	0.308
CD56 ⁺ CD16 ⁺	74,7±2,9	76,3±7,5	0.174
CD56 ⁺ CD16 ⁻	5,5±0,2	11,3±6,8	0.113
CD56 ⁻ CD16 ⁺	10,5±2,5	7,7±2,2	0.462
Células NK CD56⁺ (%)			
NKG2D	65,9±4,1	61,1±4,1	0.213
NKp46	72,8±4,8	70,7±5,1	0.960
CD161	74,1±4,0	67,8±5,1	0.571
Células NK CD56⁺ (%)			
KIR2DL1	10,2±1,1	15,1±5,6	0.929
KIR2DS1	6,9±2,6	3,5±1,5	0.925
KIR2DL1/S1	2,3±0,4	2,4±1,5	0.962
KIR2DL2/S2	15,0±3,2	23,4±7,7	0.417
KIR2DL3	20,4±3,1	17,2±8,3	0.069
MDSCs (%)			
PMN-MDSCs	0,2±0,052	0,5±0,2	0,250
Mo-MDSCs	7,3±2,1	12,0±3,3	0.457
Células CD34⁺ (%)	4,3±2,1	10,9±3,9	0.053
PD-L1 (%)	28,3±7,7	20,7±6,2	0.713
HLA (MFI)	ND	ND	ND

Tabla Suplementaria 9. Porcentajes (media±EEM) de las diferentes poblaciones celulares y receptores antigénicos en muestras de MO en pacientes con SMD según el score mutacional. P, significación estadística entre los grupos: ≤2 mutaciones vs. >3 mutaciones totales.

<i>Médula Ósea</i>	<i>2 mutaciones totales</i>	<i>3 mutaciones totales</i>	<i>P</i>
Linfocitos Totales (%)	16,8±6,0	22,5±10,5	0.517
Linfocitos T (%)			
<i>CD3</i>	59,2±7,5	48,8±6,8	0.727
<i>CD4</i>	32,2±6,2	24,0±5,2	0.930
<i>CD8</i>	23,8±8,2	21,3±7,6	0.458
Células NK (%)	25±8,1	15,1±9,4	0.965
Linfocitos B (%)	8,9±2,3	6,6±3,0	0.662
Linfocitos T CD4 (%)			
<i>Th1</i>	25,4±1,7	24,0±3,7	0.288
<i>Th17</i>	12,3±1,0	9,1±1,0	0.396
<i>Th22</i>	6,8±1,3	3,7±0,7	0.845
<i>Treg</i>	4,7±2,9	7,1±2,3	0.111
<i>CD4⁺ CD39⁺</i>	5,7±1,4	6,4±1,9	0.396
<i>CD4⁺ PD-1⁺</i>	0,3±0,1	0,6±0,2	0.070
Linfocitos T CD8 (%)			
<i>CD8⁺ CD39⁺</i>	6,0±1,6	5,1±1,3	0.750
<i>CD8⁺ PD-1⁺</i>	3,8±1,1	4,9±1,6	0.982
Ratio células T			
<i>CD4/CD8</i>	1,3±0,7	1,1±0,6	0.267
<i>CD8/Treg</i>	5,0±3,5	3,0±0,2	0.327
<i>Th1/Th17</i>	2,1±0,7	2,6±1,7	0.218
<i>Th1/Treg</i>	5,4±3,7	3,4±2,3	0.300
Células NK (%)			
<i>CD56^{Bright}</i>	8,1±1,3	7,3±5,2	0.533
<i>CD56⁺CD16⁺</i>	55,2±8,5	46,4±8,4	0.610
<i>CD56⁺CD16⁻</i>	31,2±10,7	14,2±5,2	0.620
<i>CD56⁻CD16⁺</i>	7,2±2,6	31,6±10,8	0.234
Células NK CD56⁺ (%)			
<i>NKG2D</i>	76,4±3,4	62,6±9,1	0.695
<i>NKp46</i>	71,4±4,2	58,1±8,2	0.170
<i>CD161</i>	77,3±4,1	57,0±10,6	0.170
Células NK CD56⁺ (%)			
<i>KIR2DL1</i>	14,3±2,7	8,5±2,3	0.151
<i>KIR2DS1</i>	4,3±0,3	1,3±0,6	0.461
<i>KIR2DL1/S1</i>	1,8±0,1	0,5±0,3	0.377
<i>KIR2DL2/S2</i>	15,8±3,2	7,1±1,8	0.178
<i>KIR2DL3</i>	24,2±6,9	21,8±4,9	0.794
Células CD34⁺ (%)	4,3±3,2	4,0±2,3	0.631
<i>PD-L1 (%)</i>	17,2±4,4	17,6±5,2	0.866
<i>HLA (MFI)</i>	ND	ND	ND

Tabla Suplementaria 10. Porcentajes (media±EEM) de las diferentes poblaciones celulares y receptores antigénicos en muestras de SP en pacientes con SMD según el score mutacional. P, significación estadística entre los grupos: ≤2 mutaciones vs. >3 mutaciones totales.

<i>Sangre Periférica</i>	<i>2 mutaciones totales</i>	<i>3 mutaciones totales</i>	<i>P</i>
Linfocitos Totales (%)	31,1±6,8	31,0±7,0	0.959
Linfocitos T (%)			
<i>CD3</i>	67,7±12,5	65,5±10,8	0.614
<i>CD4</i>	41,9±10,2	35,5±9,2	0.716
<i>CD8</i>	22,0±9,2	27,2±7,6	0.385
Células NK (%)	19±8,1	15,8±5,4	0.170
Linfocitos B (%)	12,2±3,3	5,8±1,0	0.675
Linfocitos T CD4 (%)			
<i>Th1</i>	24,1±1,3	30,3±6,6	0.696
<i>Th17</i>	10,4±0,6	14,3±2,3	0.320
<i>Th22</i>	8,5±1,5	4,6±1,6	0.733
<i>Treg</i>	6,4±3,0	7,3±0,5	0.372
<i>CD4⁺ CD39⁺</i>	4,7±0,6	9,1±2,1	0.202
<i>CD4⁺ PD-1⁺</i>	0,3±0,1	0,6±0,5	0.070
Linfocitos T CD8 (%)			
<i>CD8⁺ CD39⁺</i>	3,5±0,3	4,7±1,7	0.760
<i>CD8⁺ PD-1⁺</i>	3,8±1,1	4,9±1,6	0.982
Ratio células T			
<i>CD4/CD8</i>	1,9±0,7	1,3±0,6	0.367
<i>CD8/Treg</i>	3,4±3,5	3,7±1,2	0.227
<i>Th1/Th17</i>	2,3±0,7	2,2±0,7	0.418
<i>Th1/Treg</i>	3,7±3,7	4,1±2,3	0.170
Células NK (%)			
<i>CD56^{Bright}</i>	7,2±1,2	7,5±3,2	0.065
<i>CD56⁺CD16⁺</i>	78,7±2,3	64,1±9,8	0.309
<i>CD56⁺CD16⁻</i>	4,5±0,3	17,4±9,4	0.172
<i>CD56⁻CD16⁺</i>	9,0±1,6	11,7±4,3	0.980
Células NK CD56⁺ (%)			
<i>NKG2D</i>	68,1±3,4	54,7±4,8	0.050
<i>NKp46</i>	74,2±3,5	62,3±9,7	0.408
<i>CD161</i>	76,5±3,4	65,5±8,3	0.324
Células NK CD56⁺ (%)			
<i>KIR2DL1</i>	14,2±1,2	8,5±2,3	0.241
<i>KIR2DS1</i>	4,4±0,4	1,2±1,5	0.247
<i>KIR2DL1/S1</i>	2,1±4,4	1,6±8,4	0.433
<i>KIR2DL2/S2</i>	19,6±4,4	13,5±8,9	0.720
<i>KIR2DL3</i>	19,1±4,4	11,4±5,1	0.337
MDSCs (%)			
<i>PMN-MDSCs</i>	0,1±0,1	0,2±0,1	0.462
<i>Mo-MDSCs</i>	12,9±3,7	15,4±3,6	0.538
Células CD34⁺ (%)	6,1±1,1	8,7±5,2	0.939
<i>PD-L1 (%)</i>	32,4±5,9	21,3±9,3	0.349
<i>HLA (MFI)</i>	ND	ND	ND

Tabla Suplementaria 11. Porcentajes (media±EEM) de las diferentes poblaciones celulares y receptores antigénicos en muestras de MO en pacientes con SMD según la frecuencia mutacional. P, significación estadística entre los grupos: pacientes con VAFs ≤30% vs. pacientes con VAFs>30%.

<i>Médula Ósea</i>	VAFs ≤30%	VAFs >30%	<i>P</i>
Linfocitos Totales (%)	17,4±10,6	18,6±7,7	0.728
Linfocitos T (%)			
<i>CD3</i>	68,9±12,5	35,9±5,8	0.727
<i>CD4</i>	35,6±9,2	18,0±10,2	0.930
<i>CD8</i>	29,1±10,2	15,2±8,6	0.458
Células NK (%)	17,9±12,1	27,1±15,4	0.965
Linfocitos B (%)	11,4±4,3	7,6±3,0	0.662
Linfocitos T CD4 (%)			
<i>Th1</i>	24,6±3,0	29,8±4,4	0.454
<i>Th17</i>	12,3±1,2	12,5±4,9	0.273
<i>Th22</i>	2,8±0,4	6,9±2,2	0.144
<i>Treg</i>	5,9±0,7	7,1±1,3	0.728
<i>CD4⁺ CD39⁺</i>	7,7±1,0	4,6±1,1	0.165
<i>CD4⁺ PD-1⁺</i>	5,3±0,1	7,6±0,5	0.270
Linfocitos T CD8 (%)			
<i>CD8⁺ CD39⁺</i>	6,7±1,3	4,1±1,9	0.298
<i>CD8⁺ PD-1⁺</i>	5,8±1,1	7,9±1,6	0.982
Ratio células T			
<i>CD4/CD8</i>	1,2±0,5	1,2±0,6	0.167
<i>CD8/Treg</i>	4,9±1,5	2,1±1,2	0.427
<i>Th1/Th17</i>	2,0±0,7	2,3±1,7	0.223
<i>Th1/Treg</i>	4,1±1,7	4,2±0,3	0.300
Células NK (%)			
<i>CD56^{Bright}</i>	5,9±3,5	12,0±2,2	0.262
<i>CD56⁺ CD16⁺</i>	62,6±14,8	37,9±12,2	0,128
<i>CD56⁺ CD16⁻</i>	27,4±14,7	21,9±15,2	0.873
<i>CD56⁻ CD16⁺</i>	6,2±2,8	29,6±15,2	0.229
Células NK CD56⁺ (%)			
<i>NKG2D</i>	82,1±2,4	63,7±12,1	0.273
<i>NKp46</i>	69,8±2,8	63,0±12,6	0.647
<i>CD161</i>	78,3±3,1	68,0±16,8	0.714
Células NK CD56⁺ (%)			
<i>KIR2DL1</i>	14,1±4,8	13,2±2,9	0.855
<i>KIR2DS1</i>	8,2±1,7	0,7±0,6	0.051
<i>KIR2DL1/S1</i>	2,9±2,8	0,6±0,4	0.085
<i>KIR2DL2/S2</i>	8,1±3,7	16,1±8,2	0.575
<i>KIR2DL3</i>	25,5±5,2	19,1±5,7	0.465
Células CD34⁺ (%)	3,1±0,3	4,6±1,7	0.916
<i>PD-L1 (%)</i>	16,8±5,8	10,6±2,2	0.071
<i>HLA (MFI)</i>	ND	ND	ND

Tabla Suplementaria 12. Porcentajes (media±EEM) de las diferentes poblaciones celulares y receptores antigénicos en muestras de SP en pacientes con SMD según la frecuencia mutacional. P, significación estadística entre los grupos: pacientes con VAFs ≤30% vs. pacientes con VAFs>30%.

<i>Sangre Periférica</i>	VAFs ≤30%	VAFs >30%	<i>P</i>
Linfocitos Totales (%)	35,5±13,0	30,8±13,6	0.450
Linfocitos T (%)			
<i>CD3</i>	56,6±15,5	71,4±31,8	0.633
<i>CD4</i>	36,3±10,2	43,5±15,2	0.891
<i>CD8</i>	15,2±3,2	28,2±9,6	0.032
Células NK (%)	18,1±12,1	17,1±10,4	0.733
Linfocitos B (%)	17,1±10,3	7,8±6,0	0.412
Linfocitos T CD4 (%)			
<i>Th1</i>	23,6±3,0	25,8±3,4	0.933
<i>Th17</i>	11,3±2,2	11,5±2,9	0.923
<i>Th22</i>	7,8±3,4	8,9±1,2	0.615
<i>Treg</i>	6,2±2,6	8,2±2,7	0.068
<i>CD4⁺ CD39⁺</i>	5,9±1,2	6,5±1,9	0.729
<i>CD4⁺ PD-1⁺</i>	9,3±0,1	10,6±0,5	0.370
Linfocitos T CD8 (%)			
<i>CD8⁺ CD39⁺</i>	6,1±1,5	2,4±0,3	0.059
<i>CD8⁺ PD-1⁺</i>	7,8±1,1	9,9±1,6	0.982
Ratio células T			
<i>CD4/CD8</i>	2,3±1,5	1,5±0,6	0.951
<i>CD8/Treg</i>	2,4±0,5	3,4±1,2	0.160
<i>Th1/Th17</i>	2,0±0,7	2,3±1,7	0.250
<i>Th1/Treg</i>	3,9±3,7	3,6±2,3	0.140
Células NK (%)			
<i>CD56^{Bright}</i>	7,9±2,5	4,0±0,2	0.247
<i>CD56⁺ CD16⁺</i>	76,6±4,8	73,9±7,2	0.817
<i>CD56⁺ CD16⁻</i>	5,4±0,7	10,9±6,2	0.440
<i>CD56⁻ CD16⁺</i>	7,2±1,8	11,6±3,2	0.929
Células NK CD56⁺ (%)			
<i>NKG2D</i>	68,1±5,4	59,7±3,1	0.190
<i>NKp46</i>	75,8±4,8	63,0±6,6	0.447
<i>CD161</i>	74,3±5,1	70,0±5,8	0.877
Células NK CD56⁺ (%)			
<i>KIR2DL1</i>	14,1±7,8	13,2±52,9	0.735
<i>KIR2DS1</i>	8,2±1,7	0,7±0,6	0.068
<i>KIR2DL1/S1</i>	2,9±1,8	0,6±0,4	0.967
<i>KIR2DL2/S2</i>	25,1±7,7	16,1±6,2	0.352
<i>KIR2DL3</i>	14,5±5,2	19,1±3,7	0.498
MDSCs (%)			
<i>PMN-MDSCs</i>	0,1±0,1	0,1±0,1	0.511
<i>Mo-MDSCs</i>	8,7±3,0	7,5±2,1	0.229
Células CD34⁺ (%)	1,7±1,2	3,3±1,0	0.221
<i>PD-L1 (%)</i>	16,8±3,8	10,6±5,2	0.071
<i>HLA (MFI)</i>	ND	ND	ND

Tabla Suplementaria 13. Perfil genético de los 50 pacientes con SMD a los que se les ha realizado de forma conjunta el estudio mutacional y del microambiente tumoral.

PACIENTE	OMS 2017	IPSS-R	CARIOTIPO	SCORE MUTACIONAL	PERFIL MUTACIONAL
1	SMD-DU	BR	Bueno	0	No detectadas
2	SMD-DM	INT	Bueno	2	<i>DNMT3A</i> (27.5%), <i>BCOR</i> (14.2%)
3	SMD-DM	BR	Bueno	1	<i>TET2</i> (51.1%)
4	SMD-DM	BR	Bueno	3	<i>DNMT3A</i> (7.8%), <i>TET2</i> (13), <i>BCOR</i> (14.5%)
5	SMD-DM	INT	Intermedio	4	<i>ASXL1</i> (48.9%), <i>RUNX1</i> (58.2%), <i>EZH2</i> (41.6%), <i>CUX1</i> (48.7%)
6	SMD-DM	BR	Bueno	3	<i>IDH2</i> (35.4%), <i>ZRSR2</i> (85.8%)
7	SMD-DM	BR	Bueno	1	<i>SF3B1</i> (24%)
8	SMD-DM	BR	Bueno	1	<i>SF3B1</i> (9.6%)
9	SMD-DM	BR	Intermedio	3	<i>ASXL1</i> (27.5%), <i>U2AF1</i> (31.1%), <i>ZRSR2</i> (46.8%)
10	SMD-DM	BR	Bueno	1	<i>SF3B1</i> (23.5%)
711	SMD-DM	BR	Bueno	3	<i>ETV6</i> (52.6%), <i>KIT</i> (7.4%), <i>NRAS</i> (4.3%)
12	SMD-DM	BR	Intermedio	1	<i>TET2</i> (19%)
13	SMD-DM	BR	Bueno	1	<i>SF3B1</i> (10%)
14	SMD-DM	AR	Intermedio	1	<i>TET2</i> (31.4%)
15	SMD-DM	BR	Bueno	2	<i>SF3B1</i> (35.6%)
16	SMD-DM	BR	Intermedio	1	<i>SF3B1</i> (15.3%)
17	SMD-DM	ND	ND	3	<i>TET2</i> (14.8%), <i>TET2</i> (13.7%), <i>ZRSR2</i> (24.2%)
18	SMD-DM	BR	Intermedio	1	<i>EZH2</i> (11.4%)
19	SMD del(5q)	MBR	Bueno	1	<i>DNMT3A</i> (7%)
20	SMD del(5q)	INT	Intermedio	0	No detectadas
21	SMD del(5q)	INT	Bueno	2	<i>TP53</i> (65.8%), <i>TET2</i> (48.9%)
22	SMD del(5q)	INT	Bueno	0	No detectadas
23	SMD del(5q)	INT	Bueno	0	No detectadas

PACIENTE	OMS 2017	IPSS-R	CARIOTIPO	SCORE MUTACIONAL	PERFIL MUTACIONAL
24	SMD del(5q)	BR	Bueno	1	<i>CBL</i> (10%)
25	SMD del(5q)	BR	Bueno	0	No detectadas
26	SMD del(5q)	MBR	Bueno	1	<i>ASXLI</i> (21.3%)
27	SMD del(5q)	AR	Bueno	0	No detectadas
28	SMD del(5q)	MBR	Bueno	3	<i>ASXLI</i> (24.2%), <i>SF3B1</i> (22.9%), <i>TET2</i> (12%)
29	SMD-SA	MBR	Bueno	3	<i>NPM1</i> (32%), <i>DNMT3A</i> (45%), <i>KRAS</i> (33%)
30	SMD-SA	BR	Bueno	4	<i>ASXLI</i> (33.7%), <i>CBL</i> (5.5%), <i>SETBP1</i> (32%), <i>SF3B1</i> (10%)
31	SMD EB-1	MAR	Pobre	1	<i>TP53</i> (47.1%)
32	SMD EB-1	INT	Bueno	2	<i>ASXLI</i> (45.1%), <i>SRSF2</i> (45.9%)
33	SMD EB-1	MAR	Intermedio	1	<i>CUX1</i> (47.5%)
34	SMD EB-1	INT	Bueno	1	<i>TP53</i> (23.4%)
35	SMD EB-1	INT	Bueno	1	<i>TP53</i> (25%)
36	SMD EB-1	AR	ND	1	<i>TP53</i> (11.8%)
37	SMD EB-1	MAR	Pobre	0	No detectadas
38	SMD EB-1	INT	Bueno	2	<i>DNMT3A</i> (24%), <i>TET2</i> (78.6%)
39	SMD EB-1	MAR	Pobre	3	<i>TP53</i> (84.3%), <i>TET2</i> (83.6%), <i>U2AF1</i> (3.1%)
40	SMD EB-1	ND	ND	0	No detectadas
41	SMD EB-1	ND	ND	1	<i>SF3B1</i> (24%)
42	SMD EB-1	BR	Bueno	7	<i>ASXLI</i> (29.9%), <i>EZH2</i> (40.1%), <i>RUNXI</i> (9.8%), <i>TET2</i> (12.3%), <i>TET2</i> (20.9%), <i>SRSF2</i> (53.2%), <i>ZRSR2</i> (33.5%)
43	SMD EB-2	MAR	Pobre	1	<i>TP53</i> (50%)
44	SMD EB-2	MAR	Pobre	1	<i>TP53</i> (47.1%)
45	SMD EB-2	MAR	Pobre	1	<i>TP53</i> (88.7%)
46	SMD EB-2	INT	Intermedio	1	<i>RUNXI</i> (50.4%)
47	SMD EB-2	MAR	Pobre	0	No detectadas
48	SMD EB-2	ND	ND	0	No detectadas

PACIENTE	OMS 2017	IPSS-R	CARIOTIPO	SCORE MUTACIONAL	PERFIL MUTACIONAL
49	SMD EB-2	AR	Bueno	5	ASXLI (31.7%), ASXLI (39.8%), EZH2 (60.1%), IDH1 (15.8%), CSF3R (22.9%)
50	SMD EB-2	ND	ND	1	TP53 (56.8%)

MO: Médula Ósea; SMD-DU: Síndrome Mielodisplásico con displasia unilínea; SMD-DM: Síndrome Mielodisplásico con displasia multilínea; SMD-SA: Síndrome Mielodisplásico con sideroblastos en anillo; SMD EB-1, -2: Síndrome Mielodisplásico con exceso de Blastos -1, -2.

IPSS-R: Revised International Prognostic Scoring System; MAR: Muy Alto Riesgo; AR: Alto Riesgo, INT: Intermedio, BR: Bajo Riesgo; MBR: Muy Bajo Riesgo.

ND: No Datos.

En la columna perfil mutacional, los genes representados en negrita se corresponden con genes de Alto Riesgo Molecular (Béjar and Steensma 2014).

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

Ademà V, Hernández JM, Abáigar M, Lumbreras E, Such E, Calull A, Dominguez E, Arenillas L, Mallo M, Cervera J, Marugán I, Tormo M, García F, González T, Luño E, Sanzo C, Martín ML, Fernández M, Costa D, Blázquez B, Barreña B, Marco F, Batlle A, Buño I, Martínez-Laperche C, Noriega V, Collado R, Ivars D, Carbonell F, Vallcorba I, Melero J, Delgado E, Vargas MT, Grau J, Salido M, Espinet B, Melero C, Florensa L, Pedro C, Solé F. Application of FISH 7q in MDS patients without monosomy 7 or 7q deletion by conventional G-banding cytogenetics: does -7/7q- detection by FISH have prognostic value? *Leuk Res.* 2013; 37(4): 416-21.

Acquaviva C, Gelsi-Boyer V, Birnbaum D. Myelodysplastic syndromes: lost between two states?. *Leukemia.* 2010; 24(1): 1-5.

Aggerholm A, Holm, M Guldberg P, Olesen LH, 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.* 2006; 76(1): 23-32.

Aguayo A, Kantarjian H, Manshour T, Gidel C, Estey E, Thomas D, Koller C, Estrov Z, O'Brien S, Keating M, Freireich E, Albitar M. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2000; 96(6): 2240-5.

Amiot L, Onno M, Lamy T, Dauriac C, Le Prise PY, Fauchet R, Drenou B. Loss of HLA molecules in B lymphomas is associated with an aggressive clinical course. *Br J Haematol.* 1998; 100(4): 655-63.

Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med.* 2013; 19(6): 355-67.

Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016; 127(20): 2391-405.

Aul C, Gattermann N, Germing U, Runde V, Heyll A, Schneider W. Risk assessment in primary myelodysplastic syndromes: validation of the Düsseldorf score. *Leukemia.* 1994; 8(11): 1906-13.

Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol.* 2001; 167(3): 1245-53.

Bakker AB, Phillips JH, Figdor CG, Lanier LL. Killer cell inhibitory receptors for MHC class I molecules regulate lysis of melanoma cells mediated by NK cells, gamma delta T cells, and antigen-specific CTL. *J Immunol.* 1998; 160(11): 5239-45.

Balas A, García-Sánchez F, Vicario JL. Allelic and haplotypic HLA frequency distribution in Spanish hematopoietic patients. Implications for unrelated donor searching. *Tissue Antigens.* 2011; 77(1): 45-53.

- Balasubramani A, Larjo A, Bassein JA, Chang X, Hastie RB, Togher SM, Lähdesmäki H, Rao A. Cancer-associated ASXL1 mutations may act as gain-of-function mutations of the ASXL1-BAP1 complex. *Nat Commun.* 2015; 6:7307.
- Baumann I, Scheid C, Koref MS, Swindell R, Stern P, Testa NG. Autologous lymphocytes inhibit hemopoiesis in long-term culture in patients with myelodysplastic syndrome. *Exp Hematol.* 2002; 30:1405-11.
- Beatty GL, Gladney WL. Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res.* 2015; 21(4): 687-92.
- Becker PS, Suck G, Nowakowska P, Ullrich E, Seifried E, Bader P, Tonn T, Seidl C. Selection and expansion of natural killer cells for NK cell-based immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2016; 65(4):477-84.
- Béjar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, Kantarjian H, Raza A, Levine RL, Neuberg D, Ebert BL. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med.* 2011;364(26):2496-2506.
- Béjar R, Steensma D. Recent developments in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2014; 124: 2793-803.
- Béjar R, Lord A, Stevenson K, Bar-Natan M, Pérez-Ladaga A, Zaneveld J, Wang H, Caughey B, Stojanov P, Getz G, Garcia-Manero G, Kantarjian H, Chen R, Stone RM, Neuberg D, Steensma DP, Ebert BL. TET2 mutations predict response to hypomethylating agents in myelodysplastic syndrome patients. *Blood.* 2014a; 124(17): 2705-12.
- Béjar R, Stevenson KE, Caughey B, Lindsley RC, Mar BG, Stojanov P, Getz G, Steensma DP, Ritz J, Soiffer R, Antin JH, Alyea E, Armand P, Ho V, Koreth J, Neuberg D, Cutler CS, Ebert BL. Somatic mutations predict poor outcome in patients with myelodysplastic syndrome after hematopoietic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol.* 2014b; 32(25): 2691-8.
- Benitez R, Godelaine D, López-Nevot MA, Brasseur F, Marchand M, Cabrera T, Van Baren N, Andry G, Jimenez P, Andry C, Ruiz- Cabello F, Boon T, Garrido F. Mutations of the b2-microglobulin gene result in a lack of HLA class I molecules on melanoma cells of two patients immunized with MAGE peptides. *Tissue Antigens.* 1998; 52(6):520-9.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. French-American-British (FAB) Cooperative Group. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 1982; 51: 189-99
- Bennett J. Changes in the Updated 2016: WHO Classification of the Myelodysplastic Syndromes and Related Myeloid Neoplasms. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia.* 2016; 16(11), 607-9.
- Bernard OA, Delhommeau F, Fontenay M, Vainchenker W. Mutations in TET2 in myeloid cancers. *Med Sci.* 2009; 25(10): 785-8.
- Bessis M, Bernard J. Haematopoietic dysplasias. *Blood Cells;* 1976; 2:5.

Bernal M, Ruiz-Cabello F, Concha A, Paschen A, Garrido F. Implication of the $\beta 2$ -microglobulin gene in the generation of tumor escape phenotypes. *Cancer Immunol Immunother.* 2012; 61(9): 1359-71.

Biassoni R, Cantoni C, Pende D, Sivori S, Parolini S, Vitale M, Bottino C, Moretta A. Human natural killer cell receptors and co-receptors. *Immunol Rev.* 2001; 181: 203-14.

Bjorkstrom NK, Riese P, Heuts F, Andersson S, Fauriat C, Ivarsson MA, Bjorklund AT, Flodstrom-Tullberg M, Michaelsson J, Rottenberg ME, Guzman CA, Ljunggren HG, Malmberg KJ. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NKcell education. *Blood.* 2010; 116 (19): 3853-64.

Block M, Jacobson LO, Bethard WJ: Preleukemic acute human leukemia. *J Am Med Assoc.* 1953; 152(11):1018-28.

Blom DJ, Schurmans LR, De Waard-Siebinga I, De Wolff-Rouendaal D, Keunen JE, Jager MJ. HLA expression in a primary uveal melanoma, its cell line, and four of its metastases. *Br J Ophthalmol.* 1997; 81(11): 989-93.

Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol.* 2001; 2(10): 907-16.

Boula A, Voulgarelis M, Giannouli S, Katrinakis G, Psyllaki M, Pontikoglou C, Markidou F, Eliopoulos GD, Papadaki HA. Effect of cA2 anti-tumor necrosis factor-alpha antibody therapy on hematopoiesis of patients with myelodysplastic syndromes. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(10): 3099-108.

Bours MJ, Swennen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther.* 2006; 112(2): 358-404.

Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Söderström K, D'Andrea A, Ogg GS, Lazetic S, Young NT, Bell JI, Phillips JH, Lanier LL, McMichael AJ. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature.* 1998; 391(6669): 795-9. Baron F, Suci S, Amadori S, Muus P, Zwierzina H, Denzlinger C, Delforge M, Thyss A, Selleslag D, Indrak K, Ossenkoppele G, de Witte T. Value of infliximab (Remicade®) in patients with low-risk myelodysplastic syndrome: final results of a randomized phase II trial (EORTC trial 06023) of the EORTC Leukemia Group. *Haematologica.* 2012; 97(4):529-33.

Braun T, Carvalho G, Coquelle A, Vozenin MC, Lepelley P, Hirsch F, Kiladjian JJ, Ribrag V, Fenaux P, Kroemer G. NF-kappaB constitutes a potential therapeutic target in high-risk myelodysplastic syndrome. *Blood.* 2006; 107(3): 1156-65.

Bronte V, Wang M, Overwijk WW, Surman DR, Pericle F, Rosenberg SA, Restifo NP. Apoptotic death of CD8+ T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1+/Gr-1+ cells. *J Immunol.* 1998; 161(10): 5313-20.

Brouwer RE, van der Heiden P, Schreuder GM, Mulder A, Datema G, Anholts JD, Willemze R, Claas FH, Falkenburg JH. Loss or downregulation of HLA class I expression at the allelic level in acute leukemia is infrequent but functionally relevant, and can be restored by interferon. *Hum Immunol.* 2002; 63(3): 200-10.

Brunning RD, Bennett J, Flandrin G, Matutes E, Head D, Vardiman JW, et al. Myelodysplastic Syndromes. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, editors. Pathology and Genetics. Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 2001. p. 61-7.

Burnet M. Cancer: A Biological Approach: III. Viruses Associated with Neoplastic Conditions. IV. Practical Applications. *British Medical Journal.* 1957; 1(5023): 841-7.

Canale FP, Ramello MC, Núñez N, Bossio SN, Piaggio E, Gruppi A, Rodríguez E, Montes CL. CD39 Expression Defines Cell Exhaustion in Tumor-Infiltrating CD8(+) T Cells-Response. *Cancer Res.* 2018; 78(17): 5175.

Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS, Zhang Y. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science.* 2002; 298(5595): 1039-43.

Carbone E, Neri P, Mesuraca M, Fulciniti MT, Otsuki T, Pende D, Groh V, Spies T, Pollio G, Cosman D, Catalano L, Tassone P, Rotoli B, Venuta S. HLA class I, NKG2D, and natural cytotoxicity receptors regulate multiple myeloma cell recognition by natural killer cells. *Blood.* 2005; 105(1): 251-8.

Carrega P, Morandi B, Costa R, Frumento G, Forte G, Altavilla G, Ratto GB, Mingari MC, Moretta L, Ferlazzo G. Natural killer cells infiltrating human nonsmall-cell lung cancer are enriched in CD56 bright CD16(-) cells and display an impaired capability to kill tumor cells. *Cancer.* 2008; 112(4): 863-75.

Carrega P, Pezzino G, Queirolo P, Bonaccorsi I, Falco M, Vita G, Pende D, Misefari A, Moretta A, Mingari MC, Moretta L, Ferlazzo G. Susceptibility of human melanoma cells to autologous natural killer (NK) cell killing: HLA-related effector mechanisms and role of unlicensed NK cells. *PLoS One.* 2009; 4(12): e8132.

Catenacci DV, Schiller GJ. Myelodysplastic Syndromes: a comprehensive review. *Blood.* 2005; 19(6): 767-775.

Cazzola M, Rossi M, Malcovati L; Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative. Biologic and clinical significance of somatic mutations of SF3B1 in myeloid and lymphoid neoplasms. *Blood.* 2013; 121(2): 260-9.

Challa-Malladi M, Lieu YK, Califano O, Holmes AB, Bhagat G, Murty VV, Dominguez-Sola D, Pasqualucci L, Dalla-Favera R. Combined genetic inactivation of β 2-Microglobulin and CD58 reveals frequent escape from immune recognition in diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell.* 2011; 20(6): 728-40.

Cheson BD, Greenberg PL, Bennett JM, Lowenberg B, Wijermans PW, Nimer SD, Pinto A, Beran M, de Witte TM, Stone RM, Mittelman M, Sanz GF, Gore SD, Schiffer CA, Kantarjian H. Clinical application and proposal for modification of the International Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia. *Blood*. 2006; 108(2): 419-25.

Chevalier P. Sur la terminologie des leucocytes et des affection frontieres. *Le Sang* 15: 587, 1942-43.

Chowell D, Morris LGT, Grigg CM, Weber JK, Samstein RM, Makarov V, Kuo F, Kendall SM, Requena D, Riaz N, Greenbaum B, Carroll J, Garon E, Hyman DM, Zehir A, Solit D, Berger M, Zhou R, Rizvi NA, Chan TA. Patient HLA class I genotype influences cancer response to checkpoint blockade immunotherapy. *Science*. 2018; 359(6375): 582-587.

Cichocki F, Miller JS, Anderson SK, Bryceson YT. Epigenetic regulation of NK cell differentiation and effector functions. *Front Immunol*. 2013; 4: 55.

Collison LW, Pillai MR, Chaturvedi V, Vignali DA. Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in a cell contact, IL-35- and IL-10-dependent manner. *J Immunol*. 2009; 182(10): 6121-8.

Costello RT, Sivori S, Marcenaro E, Lafage-Pochitaloff M, Mozziconacci MJ, Reviron D, Gastaut JA, Pende D, Olive D, Moretta A. Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2002; 99(10):3661-7.
Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000; 407(6801): 249-57.

Coussens LM, Zitvogel L, Palucka AK. Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? *Science*. 2013; 339(6117): 286-91.

D'Arena G, Vitale C, Coscia M, Festa A, Di Minno NMD, De Feo V, Caraglia M, Calapai G, Laurenti L, Musto P, Di Minno G, Fenoglio D. Regulatory T Cells and Their Prognostic Relevance in Hematologic Malignancies. *J Immunol Res*. 2017; 2017:1832968.

Dalbeth N, Gundle R, Davies RJ, Lee YC, McMichael AJ, Callan MF. CD56^{bright} NK cells are enriched at inflammatory sites and can engage with monocytes in a reciprocal program of activation. *J Immunol*. 2004; 173(10): 6418-26.

Damm F, Chesnais V, Nagata Y, Yoshida K, Scourzic L, Okuno Y, Itzykson R, Sanada M, Shiraishi Y, Gelsi-Boyer V, Renneville A, Miyano S, Mori H, Shih LY, Park S, Dreyfus F, Guerci-Bresler A, Solary E, Rose C, Cheze S, Prébet T, Vey N, Legentil M, Duffourd Y, de Botton S, Preudhomme C, Birnbaum D, Bernard OA, Ogawa S, Fontenay M, Kosmider O. BCOR and BCORL1 mutations in myelodysplastic syndromes and related disorders. *Blood*. 2013; 122(18): 3169-77.

Damuzzo V, Pinton L, Desantis G, Solito S, Marigo I, Bronte V, Mandruzzato S. Complexity and challenges in defining myeloid-derived suppressor cells. *Cytometry B Clin Cytom*. 2015; 88(2): 77-91.

De Souza DC, Fernandez Cde S, Camargo A, Apa AG, da Costa ES, Bouzas LF, Abdelhay E, Fernandez Tde S. Cytogenetic as an important tool for diagnosis and prognosis for patients with hypocellular primary myelodysplastic syndrome. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:542395.

Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enjyoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*. 2007; 204(6): 1257-65.

Deeg HJ, Beckham C, Loken MR, Bryant E, Lesnikova M, Shulman HM, Gooley T. Negative regulators of hemopoiesis and stroma function in patients with myelodysplastic syndrome. *Leuk Lymphoma*. 2000; 37(3-4): 405-14.

Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Massé A, Kosmider O, Le Couedic JP, Robert F, Alberdi A, Lécluse Y, Plo I, Dreyfus FJ, Marzac C, Casadevall N, Lacombe C, Romana SP, Dessen P, Soulier J, Viguié F, Fontenay M, Vainchenker W, Bernard OA. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*. 2009; 360(22): 2289-301.

Della Porta MG, Malcovati L, Rigolin GM, Rosti V, Bonetti E, Travaglini E, Boveri E, Gallì A, Boggi S, Ciccone M, Pramparo T, Mazzini G, Invernizzi R, Lazzarino M, Cazzola M. Immunophenotypic, cytogenetic and functional characterization of circulating endothelial cells in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2008; 22(3): 530-7.

Demanet C, Mulder A, Deneys V, Worsham MJ, Maes P, Claas FH, Ferrone S. Down-regulation of HLA-A and HLA-Bw6, but not HLA-Bw4, allospecificities in leukemic cells: an escape mechanism from CTL and NK attack? *Blood*. 2004; 103(8): 3122-30.

Dickinson M, Cherif H, Fenaux P, Mittelman M, Verma A, Portella MSO, Burgess P, Ramos PM, Choi J, Platzbecker U; SUPPORT study investigators. Azacitidine with or without eltrombopag for first-line treatment of intermediate- or high-risk MDS with thrombocytopenia. *Blood*. 2018 Dec 20;132(25):2629-2638. doi: 10.1182/blood-2018-06-855221.

Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Dombret H, Ebert BL, Fenaux P, Larson RA, Levine RL, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz M, Sierra J, Tallman MS, Tien HF, Wei AH, Löwenberg B, Bloomfield CD. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017; 129(4): 424-447.

Draghiciu O, Lubbers J, Nijman HW, Daemen T. Myeloid derived suppressor cells-An overview of combat strategies to increase immunotherapy efficacy. *Oncoimmunology*. 2015; 4(1): e954829.

Drake CG, Jaffee E, Pardoll DM. Mechanisms of immune evasion by tumors. *Adv Immunol*. 2006; 90: 51-81.

Dubois V, Sloan-Béna F, Cesbron A, Hepkema BG, Gagne K, Gimelli S, Heim D, Tichelli A, Delaunay J, Drouet M, Jendly S, Villard J, Tiercy JM. Pretransplant HLA mistyping in diagnostic samples of acute myeloid leukemia patients due to acquired uniparental disomy. *Leukemia*. 2012; 26(9): 2079-85.

Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002; 3(11): 991-8

Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol*. 2004; 22: 329-60.

Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*. 2008; 358(11): 1148-59.

Epling-Burnette PK, Bai F, Painter JS, Rollison DE, Salih HR, Krusch M, Zou J, Ku E, Zhong B, Boulware D, Moscinski L, Wei S, Djeu JY, List AF. Reduced natural killer (NK) function associated with high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) and reduced expression of activating NK receptors. *Blood*. 2007a; 109(11): 4816-24.

Epling-Burnette PK, Painter JS, Rollison DE, Ku E, Vendron D, Widen R, Boulware D, Zou JX, Bai F, List AF. Prevalence and clinical association of clonal T-cell expansions in Myelodysplastic Syndrome. *Leukemia*. 2007b; 21(4): 659-67.

Farnault L, Sanchez C, Baier C, Le Treut T, Costello RT. Hematological malignancies escape from NK cell innate immune surveillance: mechanisms and therapeutic implications. *Clin Dev Immunol*. 2012; 2012: 421702.

Flach J, Dicker F, Schnittger S, Schindela S, Kohlmann A, Haferlach T, Kern W, Haferlach C. An accumulation of cytogenetic and molecular genetic events characterizes the progression from MDS to secondary AML: an analysis of 38 paired samples analyzed by cytogenetics, molecular mutation analysis and SNP microarray profiling. *Leukemia*. 2011; 25(4): 713-718.

Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res*. 2017; 7(5): 1016-1036.

Fozza, C. and Longinotti, M. Are T-cell dysfunctions the other side of the moon in the pathogenesis of myelodysplastic syndromes?. *Eur. J. Haematol*. 2012; 88(5): 380–387

Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*. 2000; 192(7): 1027-34.

Freud AG, Mundy-Bosse BL, Yu J, Caligiuri MA. The Broad Spectrum of Human Natural Killer Cell Diversity. *Immunity*. 2017; 47(5):8 20-833.

Füreder W, Cerny-Reiterer S, Sperr WR, Müllauer L, Jäger E, Schwarzingler I, Geissler K, Valent P. Evaluation of efficacy of alemtuzumab in 5 patients with aplastic anemia and/or myelodysplastic neoplasm. *Wien Klin Wochenschr*. 2017; 129(11-12): 404-410.

Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol*. 2012; 12(4):253-68.

Gabrilovich DI. Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunol Res*. 2017; 5(1): 3-8.

Garrido F, Festenstein H, Schirmacher V. Further evidence for derepression of H-2 and Ia like specificities of foreign haplotypes in mouse tumor cell lines. *Nature*. 1976; 261(5562):705-7.

Garrido F, Cabrera T, Concha A, Glew S, Ruiz-Cabello F, Stern PL. Natural history of HLA expression during tumour development. *Immunol Today*. 1993; 14(10): 491-9.

Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Pérez-Villar JJ, López-Botet M, Duggan-Keen M, Stern PL. Implications for immunosurveillance of altered HLA classI phenotypes in human tumours. *Immunol Today*. 1997; 18(2): 89-95.

Garrido F, Aptsiauri N, Doorduijn EM, Garcia Lora AM, van Hall T. The urgent need to recover MHC class I in cancers for effective immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. 2016; 39: 44-51.

Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. 2010; 327(5966): 656-61.

Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adélaïde J, Bonansea J, Cervera N, Carbuccia N, Lagarde A, Prebet T, Nezri M, Sainty D, Olschwang S, Xerri L, Chaffanet M, Mozziconacci MJ, Vey N, Birnbaum D. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2009; 145(6): 788-800.

Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G, Trinchieri G. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med*. 2002; 195(3): 327-33.

Ghiringhelli F, Larmonier N, Schmitt E, Parcellier A, Cathelin D, Garrido C, Chauffert B, Solary E, Bonnotte B, Martin F. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol*. 2004; 34(2): 336-44.

Glenthøj A, Ørskov AD, Hansen JW, Hadrup SR, O'Connell C, Grønbæk K. Immune Mechanisms in Myelodysplastic Syndrome. *Int J Mol Sci*. 2016; 17(6).

Godley LA, Larson RA. Therapy-related myeloid leukemia. *Semin Oncol*. 2008; 35: 418-429.

Gollob JA, Sciambi CJ, Huang Z, Dressman HK. Gene expression changes and signaling events associated with the direct antimelanoma effect of IFN-gamma. *Cancer Res*. 2005; 65(19): 8869-77.

Graubert TA, Shen D, Ding L, Okeyo-Owuor T, Lunn CL, Shao J, Krysiak K, Harris CC, Koboldt DC, Larson DE, McLellan MD, Dooling DJ, Abbott RM, Fulton RS, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, O'Laughlin M, Grillot M, Baty J, Heath S, Frater JL, Nasim T, Link DC, Tomasson MH, Westervelt P, DiPersio JF, Mardis ER, Ley TJ, Wilson RK, Walter MJ.

Recurrent mutations in the U2AF1 splicing factor in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet.* 2011; 44(1): 53-7.

Green EA, Gorelik L, McGregor CM, Tran EH, Flavell RA. CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGFbeta receptor interactions in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100(19):10878-83.

Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D, Ohyashiki K, Toyama K, Aul C, Mufti G, Bennett J. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 1997; 89(6): 2079-88.

Greenberg P, Tuechler H. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2012; 120: 2454-2465.

Griffioen M, Ouwerkerk IJ, Harten V, Schrier PI. HLA-B locus-specific downregulation in human melanoma requires enhancer A as well as a sequence element located downstream of the transcription initiation site. *Immunogenetics.* 2000; 52(1-2): 121-8.

Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature.* 2002; 419(6908): 734-8.

Guillerey C, Huntington ND, Smyth MJ. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy. *Nat Immunol.* 2016; 17(9): 1025-36.

Gupta R, Soupir CP, Johari V, Hasserjian RP. Myelodysplastic syndrome with isolated deletion of chromosome 20q: an indolent disease with minimal morphological dysplasia and frequent thrombocytopenic presentation. *Br J Haematol.* 2007; 139(2): 265-8.

Haase D, Germing U, Schanz J, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Hildebrandt B, Kundgen A, Lübbert M, Kunzmann R, Giagounidis AA, Aul C, Trümper L, Krieger O, Stauder R, Müller TH, Wimazal F, Valent P, Fonatsch C, Steidl C. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood.* 2007; 110(13): 4385-95.

Haase D. Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol.* 2008; 87:515-26.

Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, Okuno Y, Bacher U, Nagae G, Schnittger S, Sanada M, Kon A, Alpermann T, Yoshida K, Roller A, Nadarajah N, Shiraishi Y, Shiozawa Y, Chiba K, Tanaka H, Koeffler HP, Klein HU, Dugas M, Aburatani H, Kohlmann A, Miyano S, Haferlach C, Kern W, Ogawa S. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* 2014; 28(2): 241-7.

Hamilton-Paterson JL. Pre-leukemic anemia. *Acta Haematol.* 1949; 2(5): 309-16.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000; 100(1): 57-70.

Hankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature.* 2001; 410(6832): 1107-11.

Hanson EM, Clements VK, Sinha P, Ilkovitch D, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J Immunol.* 2009; 183(2): 937-44.

Häusler SF, Montalbán del Barrio I, Strohschein J, Chandran PA, Engel JB, Hönig A, Ossadnik M, Horn E, Fischer B, Krockenberger M, Heuer S, Seida AA, Junker M, Kneitz H, Kloor D, Klotz KN, Dietl J, Wischhusen J. Ectonucleotidases CD39 and CD73 on OvCA cells are potent adenosine-generating enzymes responsible for adenosine receptor 2A-dependent suppression of T cell function and NK cell cytotoxicity. *Cancer Immunol Immunother.* 2011; 60(10): 1405-18.

Hejazi M, Manser AR, Fröbel J, Kündgen A, Zhao X, Schönberg K, Germing U, Haas R, Gattermann N, Uhrberg M. Impaired cytotoxicity associated with defective natural killer cell differentiation in myelodysplastic syndromes. *Haematologica.* 2015; 100(5): 643-52.

Hilpert J, Grosse-Hovest L, Grünebach F, Buechele C, Nuebling T, Raum T, Steinle A, Salih HR. Comprehensive analysis of NKG2D ligand expression and release in leukemia: implications for NKG2D-mediated NK cell responses. *J Immunol.* 2012; 189(3): 1360-71.

Hosokawa K, Katagiri T, Sugimori N, Ishiyama K, Sasaki Y, Seiki Y, Sato-Otsubo A, Sanada M, Ogawa S, Nakao S. Favorable outcome of patients who have 13q deletion: a suggestion for revision of the WHO 'MDS-U' designation. *Haematologica.* 2012; 97(12): 1845-9.

Irons RD, Wang X, Gross SA, Bao L, Ryder J, Chen Y, Chen H, Sun H, Zhou J, Ji M, Du X, Fu H, Lin G. Prevalence of MDS subtypes in Shanghai, China: a comparison of the World Health Organization and French American British classifications. *Leuk Res.* 2006; 30(7): 769-75.

Issa JP. The myelodysplastic syndrome as a prototypical epigenetic disease. *Blood.* 2013; 121(19): 3811-7.

Jaffe ES, Harris NL, Diebold J, Muller-Hermelink HK. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. A progress report. *Am J Clin Pathol.* 1999; 111(1): S8-12.

Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, Lindsley RC, Mermel CH, Burt N, Chavez A, Higgins JM, Moltchanov V, Kuo FC, Kluk MJ, Henderson B, Kinnunen L, Koistinen HA, Ladenvall C, Getz G, Correa A, Banahan BF, Gabriel S, Kathiresan S, Stringham HM, McCarthy MI, Boehnke M, Tuomilehto J, Haiman C, Groop L, Atzmon G, Wilson JG, Neuberg D, Altshuler D, Ebert BL. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med.* 2014; 371(26): 2488-98.

Jitschin R, Braun M, Büttner M, Dettmer-Wilde K, Bricks J, Berger J, Eckart MJ, Krause SW, Oefner PJ, Le Blanc K, Mackensen A, Mougiakakos D. CLL-cells induce IDO^{hi} CD14⁺HLA-DR^{lo} myeloid-derived suppressor cells that inhibit T-cell responses and promote TRegs. *Blood.* 2014; 124(5): 750-60.

Katagiri T, Sato-Otsubo A, Kashiwase K, Morishima S, Sato Y, Mori Y, Kato M, Sanada M, Morishima Y, Hosokawa K, Sasaki Y, Ohtake S, Ogawa S, Nakao S; Japan Marrow Donor Program. Frequent loss of HLA alleles associated with copy number-neutral 6pLOH in acquired aplastic anemia. *Blood*. 2011; 118(25): 6601-9.

Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008; 26: 677-704.

Kerndrup G, Meyer K, Ellegaard J, Hokland P. Natural killer (NK)-cell activity and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) in primary preleukemic syndrome. *Leuk Res*. 1984; 8(2): 239-47.

Kiladjian JJ, Bourgeois E, Lobe I, Braun T, Visentin G, Bourhis JH, Fenaux P, Chouaib S, Caignard A. Cytolytic function and survival of natural killer cells are severely altered in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2006; 20(3): 463-70.

Kim E, Ilagan JO, Liang Y, Daubner GM, Lee SC, Ramakrishnan A, Li Y, Chung YR, Micol JB, Murphy ME, Cho H, Kim MK, Zebari AS, Aumann S, Park CY, Buonamici S, Smith PG, Deeg HJ, Lobry C, Aifantis I, Modis Y, Allain FH, Halene S, Bradley RK, Abdel-Wahab O. SRSF2 Mutations Contribute to Myelodysplasia by Mutant-Specific Effects on Exon Recognition. *Cancer Cell*. 2015; 27(5): 617-30.

Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*. 2007; 121(1): 1-14.

Kitagawa M, Saito I, Kuwata T, Yoshida S, Yamaguchi S, Takahashi M, Tanizawa T, Kamiyama R, Hirokawa K. Overexpression of tumor necrosis factor (TNF)-alpha and interferon (IFN)-gamma by bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 1997; 11(12): 2049-54.

Kittang AO, Kordasti S, Sand KE, Costantini B, Kramer AM, Perezabellan P, Seidl T, Rye KP, Hagen KM, Kulasekararaj A, Bruserud Ø, Mufti GJ. Expansion of myeloid derived suppressor cells correlates with number of T regulatory cells and disease progression in myelodysplastic syndrome. *Oncoimmunology*. 2015; 5(2): e1062208.

Komrokji RS, Mailloux AW, Chen DT, Sekeres MA, Paquette R, Fulp WJ, Sugimori C, Paleveda-Pena J, Maciejewski JP, List AF, Epling-Burnette PK. A phase II multicenter rabbit anti-thymocyte globulin trial in patients with myelodysplastic syndromes identifying a novel model for response prediction. *Haematologica*. 2014; 99(7): 1176-83.

Koopman LA, Corver WE, van der Slik AR, Giphart MJ, Fleuren GJ. Multiple genetic alterations cause frequent and heterogeneous human histocompatibility leukocyte antigen class I loss in cervical cancer. *J Exp Med*. 2000; 191(6): 961-76.

Kordasti SY, Ingram W, Hayden J, Darling D, Barber L, Afzali B, Lombardi G, Wlodarski MW, Maciejewski JP, Farzaneh F, Mufti GJ. CD4+CD25high Foxp3+ regulatory T cells in myelodysplastic syndrome (MDS). *Blood*. 2007; 110(3): 847-50.

Kordasti SY, Afzali B, Lim Z, Ingram W, Hayden J, Barber L, Matthews K, Chelliah R, Guinn B, Lombardi G, Farzaneh F, Mufti GJ. IL-17-producing CD4(+) T cells, pro-inflammatory cytokines and apoptosis are increased in low risk myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol.* 2009; 145(1): 64-72.

Kornblau SM, McCue D, Singh N, Chen W, Estrov Z, Coombes KR. Recurrent expression signatures of cytokines and chemokines are present and are independently prognostic in acute myelogenous leukemia and myelodysplasia. *Blood.* 2010; 116(20): 4251-61.

Krönke J, Fink EC, Hollenbach PW, MacBeth KJ, Hurst SN, Udeshi ND, Chamberlain PP, Mani DR, Man HW, Gandhi AK, Svinkina T, Schneider RK, McConkey M, Järås M, Griffiths E, Wetzler M, Bullinger L, Cathers BE, Carr SA, Chopra R, Ebert BL. Lenalidomide induces ubiquitination and degradation of CK1 α in del(5q) MDS. *Nature.* 2015; 523(7559): 183-188.

Kuendgen A, Strupp C, Aivado M, Hildebrandt B, Haas R, Gattermann N, Germing U. Myelodysplastic syndromes in patients younger than age 50. *J Clin Oncol.* 2006; 24(34): 5358-65. *J Clin Oncol* 2006; 34: 5358-65.

Kulkarni S, Martin MP, Carrington M. The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease. *Semin Immunol.* 2008; 20(6): 343-52.

Lai JL, Preudhomme C, Zandecki M, Flactif M, Vanrumbeke M, Lepelley P, Wattel E, Fenaux P. Myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with 17p deletion. An entity characterized by specific dysgranulopoiesis and a high incidence of P53 mutations. *Leukemia.* 1995; 9(3): 370-81.

Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long AJ, Brown JA, Nunes R, Greenfield EA, Bourque K, Boussiotis VA, Carter LL, Carreno BM, Malenkovich N, Nishimura H, Okazaki T, Honjo T, Sharpe AH, Freeman GJ. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol.* 2001; 2(3): 261-8.

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature.* 1998; 396(6712): 643-9.

Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med.* 2006; 203(7): 1701-11.

Liu J, Zhou Y, Huang Q, Qiu L. CD14(+) HLA-DR(low/-) expression: A novel prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Oncol Lett.* 2015; 9(3): 1167-1172.

Loeb LA, Loeb KR, Anderson JP. Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100(3): 776-81.

Ljunggren HG, Kärre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today.* 1990; 11(7): 237-44.

Ma X. Epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Am J Med.* 2012; 125(7): S2-5.

Maghazachi AA. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010; 341: 37-58.

Mailloux AW, Epling-Burnette PK. Effector memory regulatory T-cell expansion marks a pivotal point of immune escape in myelodysplastic syndromes. *Oncoimmunology*. 2013; 2(2): e22654.

Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, Della Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, Giagounidis A, Hildebrandt B, Bernasconi P, Knipp S, Strupp C, Lazzarino M, Aul C, Cazzola M. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J clin Oncol*. 2007; 25: 3503-10.

Malcovati L, Hellström-Lindberg E, Bowen D, Adès L, Cermak J, Del Cañizo C, Della Porta MG, Fenaux P, Gattermann N, Germing U, Jansen JH, Mittelman M, Mufti G, Platzbecker U, Sanz GF, Selleslag D, Skov-Holm M, Stauder R, Symeonidis A, van de Loosdrecht AA, de Witte T, Cazzola M; European Leukemia Net Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood*. 2013; 122(17): 2943-2964.

Malcovati L, Karimi M, Papaemmanuil E, Ambaglio I, Jädersten M, Jansson M, Elena C, Galli A, Walldin G, Della Porta MG, Raaschou-Jensen K, Travaglino E, Kallenbach K, Pietra D, Ljungström V, Conte S, Boveri E, Invernizzi R, Rosenquist R, Campbell PJ, Cazzola M, Hellström Lindberg E. SF3B1 mutation identifies a distinct subset of myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts. *Blood*. 2015; 126(2): 233-41.

Maleno I, Lopez-Nevot MA, Cabrera T, Salinero J, Garrido F. Multiple mechanisms generate HLA class I altered phenotypes in laryngeal carcinomas: high frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21. *Cancer Immunol Immunother*. 2002; 51(7): 389-96.

Maleno I, Cabrera CM, Cabrera T, Paco L, Lopez-Nevot MA, Collado A, Ferrón A, Garrido F. Distribution of HLA class I altered phenotypes in colorectal carcinomas: high frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21. *Immunogenetics*. 2004; 56(4): 244-53.

Maleno I, Romero JM, Cabrera T, Paco L, Aptsiauri N, Cozar JM, Tallada M, Lopez-Nevot MA, Garrido F. LOH at 6p21.3 region and HLA class altered phenotypes in bladder carcinomas. *Immunogenetics*. 2006; 58(7): 503-10.

McGranahan N, Rosenthal R, Hiley CT, Rowan AJ, Watkins TBK, Wilson GA, Birnbak NJ, Veeriah S, Van Loo P, Herrero J, Swanton C; TRACERx Consortium. Allele-Specific HLA Loss and Immune Escape in Lung Cancer Evolution. *Cell*. 2017; 171(6): 1259-1271.

Manjili MH. Revisiting cancer immunoediting by understanding cancer immune complexity. *The Journal of pathology*. 2011; 224(1): 5-9.

Marincola FM, Shamamian P, Alexander RB, Gnarr JR, Turetskaya RL, Nedospasov SA, Simonis TB, Taubenberger JK, Yannelli J, Mixon A. Loss of HLA haplotype and B locus down-regulation in melanoma cell lines. *J Immunol*. 1994; 153(3): 1225-37.

Masuda K, Hiraki A, Fujii N, Watanabe T, Tanaka M, Matsue K, Ogama Y, Ouchida M, Shimizu K, Ikeda K, Tanimoto M. Loss or down-regulation of HLA class I expression at the allelic level in freshly isolated leukemic blasts. *Cancer Sci.* 2007; 98(1):102-8.

Mazumdar C, Shen Y, Xavy S, Zhao F, Reinisch A, Li R, Corces MR, Flynn RA, Buenrostro JD, Chan SM, Thomas D, Koenig JL, Hong WJ, Chang HY, Majeti R. Leukemia-Associated Cohesin Mutants Dominantly Enforce Stem Cell Programs and Impair Human Hematopoietic Progenitor Differentiation. *Cell Stem Cell.* 2015; 17(6): 675-688.

Méndez R, Ruiz-Cabello F, Rodríguez T, Del Campo A, Paschen A, Schadendorf D, Garrido F. Identification of different tumor escape mechanisms in several metastases from a melanoma patient undergoing immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2007; 56(1): 88-94.

Méndez R, Rodríguez T, Del Campo A, Monge E, Maleno I, Aptsiauri N, Jiménez P, Pedrinaci S, Pawelec G, Ruiz-Cabello F, Garrido F. Characterization of HLA class I altered phenotypes in a panel of human melanoma cell lines. *Cancer Immunol Immunother.* 2008; 57(5): 719-29.

Middleton D, Vilchez JR, Cabrera T, Meenagh A, Williams F, Halfpenny I, Maleno I, Ruiz-Cabello F, Lopez-Nevot MA, Garrido F. Analysis of KIR gene frequencies in HLA class I characterised bladder, colorectal and laryngeal tumours. *Tissue Antigens.* 2007; 69(3): 220-6.

Mittal D, Gubin MM., Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases-elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol.* 2014; 27: 16-25.

Miura I, Kobayashi Y, Takahashi N, Saitoh K, Miura AB. Involvement of natural killer cells in patients with myelodysplastic syndrome carrying monosomy 7 revealed by the application of fluorescence in situ hybridization to cells collected by means of fluorescence-activated cell sorting. *Br J Haematol.* 2000; 110(4): 876-9.

Mohamedali A, Gäken J, Twine NA, Ingram W, Westwood N, Lea NC, Hayden J, Donaldson N, Aul C, Gattermann N, Giagounidis A, Germing U, List AF, Mufti GJ. Prevalence and prognostic significance of allelic imbalance by single-nucleotide polymorphism analysis in low-risk myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2007; 110(9): 3365-73.

Montes P, Kerick M, Bernal M, Hernández F, Jiménez P, Garrido P, Márquez A, Jurado M, Martín J, Garrido F, Ruiz-Cabello F. Genomic loss of HLA alleles may affect the clinical outcome in low-risk myelodysplastic syndrome patients. *Oncotarget.* 2018; 9(97): 36929-36944.

Moretta A, Locatelli F, Moretta L. Human NK cells: from HLA class I-specific killer Ig-like receptors to the therapy of acute leukemias. *Immunol Rev.* 2008, 224: 58-69.

Moretta L, Locatelli F, Pende D, Marcenaro E, Mingari MC, Moretta A. Killer Ig like receptor-mediated control of natural killer cell alloreactivity in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2011; 117(3): 764-771.

Mori T, Takada R, Watanabe R, Okamoto S, Ikeda Y. T-helper (Th)1/Th2 imbalance in patients with previously untreated B-cell diffuse large cell lymphoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2001; 50(10): 566-8.

Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell.* 2008; 132(4): 598-611.

Müller-Hermelink N, Braumüller H, Pichler B, Wieder T, Mailhammer R, Schaak K, Ghoreschi K, Yazdi A, Haubner R, Sander CA, Mocikat R, Schwaiger M, Förster I, Huss R, Weber WA, Kneilling M, Röcken M. TNFR1 signaling and IFN-gamma signaling determine whether T cells induce tumor dormancy or promote multistage carcinogenesis. *Cancer Cell.* 2008; 13(6): 507-18.

Nazha A, Seastone D, Radivoyevitch T, Przychodzen B, Carraway HE, Patel BJ, Carew J, Makishima H, Sekeres MA, Maciejewski JP. Genomic patterns associated with hypoplastic compared to hyperplastic myelodysplastic syndromes. *Haematologica.* 2015; 100(11):e434-7.

Neukirchen J, Schoonen WM, Strupp C, Gattermann N, Aul C, Haas R, Germing U. Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes: data from the Düsseldorf MDS-registry. *Leuk Res.* 2011; 35(12): 1591-6.

Niemeyer CM, Baumann I. Myelodysplastic syndrome in children and adolescents. *Semin Hematol.* 2008; 45: 60-70.

Nimer SD. Myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2008; 111(10): 4841-51. doi: 10.1182/blood-2007-08-078139.

Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol.* 2014; 27: 1-7.

Nouri AM, Smith S, Newland AC, Macey MG. Comparative expression of major histocompatibility complex (MHC) antigens on CD5+ and CD5- B cells in patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Eur J Cancer.* 1998; 34(10): 1618-1622.

Oberlies J, Watzl C, Giese T, Luckner C, Kropf P, Müller I, Ho AD, Munder M. Regulation of NK cell function by human granulocyte arginase. *J Immunol.* 2009; 182(9): 5259-67.

Old LJ, Boyse EA. Immunology of experimental tumors. *Annu Rev Med.* 1964;15:167-86.

Ortmann CA, Kent DG, Nangalia J, Silber Y, Wedge DC, Grinfeld J, Baxter EJ, Massie CE, Papaemmanuil E, Menon S, Godfrey AL, Dimitropoulou D, Guglielmelli P, Bellosillo B, Besses C, Döhner K, Harrison CN, Vassiliou GS, Vannucchi A, Campbell PJ, Green AR. Effect of mutation order on myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med.* 2015; 372(7): 601-612.

Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol.* 2009; 182(8): 4499-506.

Owen CJ, Toze CL, Koochin A, Forrest DL, Smith CA, Stevens JM, Jackson SC, Poon MC, Sinclair GD, Leber B, Johnson PR, Macheta A, Yin JA, Barnett MJ, Lister TA, Fitzgibbon J. Five new pedigrees with inherited RUNX1 mutations causing familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancy. *Blood*. 2008; 112(12): 4639-45.

Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol*. 2007; 8(12): 1353-62.

Papaemmanuil E, Cazzola M, Boultonwood J, Malcovati L, Vyas P, Bowen D, Pellagatti A, Wainscoat JS, Hellstrom-Lindberg E, Gambacorti-Passerini C, Godfrey AL, Rapado I, Cvejic A, Rance R, McGee C, Ellis P, Mudie LJ, Stephens PJ, McLaren S, Massie CE, Tarpey PS, Varela I, Nik-Zainal S, Davies HR, Shlien A, Jones D, Raine K, Hinton J, Butler AP, Teague JW, Baxter EJ, Score J, Galli A, Della Porta MG, Travaglino E, Groves M, Tauro S, Munshi NC, Anderson KC, El-Naggar A, Fischer A, Mustonen V, Warren AJ, Cross NC, Green AR, Futreal PA, Stratton MR, Campbell PJ; Chronic Myeloid Disorders Working Group of the International Cancer Genome Consortium. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N Engl J Med*. 2011; 365(15): 1384-95.

Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, Tauro S, Gundem G, Van Loo P, Yoon CJ, Ellis P, Wedge DC, Pellagatti A, Shlien A, Groves MJ, Forbes SA, Raine K, Hinton J, Mudie LJ, McLaren S, Hardy C, Latimer C, Della Porta MG, O'Meara S, Ambaglio I, Galli A, Butler AP, Walldin G, Teague JW, Quek L, Sternberg A, Gambacorti-Passerini C, Cross NC, Green AR, Boultonwood J, Vyas P, Hellstrom-Lindberg E, Bowen D, Cazzola M, Stratton MR, Campbell PJ; Chronic Myeloid Disorders Working Group of the International Cancer Genome Consortium. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2013; 122(22): 3616-27.

Parham P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5(3):201-14.

Paschen A, Méndez RM, Jimenez P, Sucker A, Ruiz-Cabello F, Song M, Garrido F, Schadendorf D. Complete loss of HLA class I antigen expression on melanoma cells: a result of successive mutational events. *Int J Cancer*. 2003; 103(6): 759-67.

Pellagatti A, Boultonwood J. The molecular pathogenesis of the myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol*. 2015; 95(1):3-15.

Perea F, Bernal M, Sánchez-Palencia A, Carretero J, Torres C, Bayarri C, Gómez-Morales M, Garrido F, Ruiz-Cabello F. The absence of HLA class I expression in non-small cell lung cancer correlates with the tumor tissue structure and the pattern of T cell infiltration. *Int J Cancer*. 2017a; 140(4): 888-899.

Perea F, Sánchez-Palencia A, Gómez-Morales M, Bernal M, Concha Á, García MM, González-Ramírez AR, Kerick M, Martin J, Garrido F, Ruiz-Cabello F, Aptsiauri N. HLA class I loss and PD-L1 expression in lung cancer: impact on T-cell infiltration and immune escape. *Oncotarget*. 2017b; 9(3):4120-4133.

- Pérez B, Benitez R, Fernández MA, Oliva MR, Soto JL, Serrano S, López Nevot MA, Garrido F. A new beta 2 microglobulin mutation found in a melanoma tumor cell line. *Tissue Antigens*. 1999; 53(6): 569-72.
- Perry C, Hazan-Halevy I, Kay S, Cipok M, Grisaru D, Deutsch V, Polliack A, Naparstek E, Herishanu Y. Increased CD39 expression on CD4(+) T lymphocytes has clinical and prognostic significance in chronic lymphocytic leukemia. *Ann Hematol*. 2012; 91(8): 1271-9.
- Pyzer AR, Cole L, Rosenblatt J, Avigan DE. Myeloid-derived suppressor cells as effectors of immune suppression in cancer. *Int J Cancer*. 2016; 139(9): 1915-26.
- Qian Z, Joslin JM, Tennant TR, Reshmi SC, Young DJ, Stoddart A, Larson RA, Le Beau MM. Cytogenetic and genetic pathways in therapy-related acute myeloid leukemia. *Chem Biol Interact*. 2010; 184: 50–57.
- Qin Z, Schwartzkopff J, Pradera F, Kammertoens T, Seliger B, Pircher H, Blankenstein T. A critical requirement of interferon gamma-mediated angiostasis for tumor rejection by CD8+ T cells. *Cancer Res*. 2003; 63(14): 4095–100.
- Quesnel B, Guillermin G, Vereecque R, Wattel E, Preudhomme C, Bauters F, Vanrumbeke M, Fenaux P. Methylation of the p15(INK4b) gene in myelodysplastic syndromes is frequent and acquired during disease progression. *Blood*. 1998; 91(8): 2985-90.
- Rammensee HG, Singh-Jasuja H. HLA ligandome tumor antigen discovery for personalized vaccine approach. *Expert Rev Vaccines*. 2013; 12(10): 1211-7.
- Raza A, Galili N. The genetic basis of phenotypic heterogeneity in myelodysplastic syndromes. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12(12): 849-59.
- Real LM, Jimenez P, Kirkin A, Serrano A, García A, Cantón J, Zeuthen J, Garrido F, Ruiz-Cabello F. Multiple mechanisms of immune evasion can coexist in melanoma tumor cell lines derived from the same patient. *Cancer Immunol Immunother*. 2001; 49(11): 621-8.
- Ren X, Ye F, Jiang Z, Chu Y, Xiong S, Wang Y. Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4(+) CD25(+) regulatory T cells. *Cell Death Differ*. 2007; 14(12): 2076-84.
- Riemersma SA, Jordanova ES, Schop RF, Philippon K, Looijenga LH, Schuurin E, Kluijn PM. Extensive genetic alterations of the HLA region, including homozygous deletions of HLA class II genes in B-cell lymphomas arising in immune-privileged sites. *Blood*. 2000; 96(10): 3569-77.
- Rodríguez PC, Quiceno DG, Zabaleta J, Ortiz B, Zea AH, Piazuelo MB, Delgado A, Correa P, Brayer J, Sotomayor EM, Antonia S, Ochoa JB, Ochoa AC. Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Res*. 2004; 64(16): 5839-49.
- Rodríguez T, Méndez R, Del Campo A, Jiménez P, Aptsiauri N, Garrido F, Ruiz-Cabello F. Distinct mechanisms of loss of IFN-gamma mediated HLA class I inducibility in two melanoma cell lines. *BMC Cancer*. 2007; 7:34.

Rücker FG, Schlenk RF, Bullinger L, Kayser S, Teleanu V, Kett H, Habdank M, Kugler CM, Holzmann K, Gaidzik VI, Paschka P, Held G, von Lilienfeld-Toal M, Lübbert M, Fröhling S, Zenz T, Krauter J, Schlegelberger B, Ganser A, Lichter P, Döhner K, Döhner H. TP53 alterations in acute myeloid leukemia with complex karyotype correlate with specific copy number alterations, monosomal karyotype, and dismal outcome. *Blood*. 2012; 119(9): 2114-21.

Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*. 2002; 295(5562): 2097-100.

Ruggeri L, Mancusi A, Burchielli E, Perruccio K, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Natural killer cell recognition of missing self and haploidentical hematopoietic transplantation. *Semin Cancer Biol*. 2006; 16(5): 404-11.

Ruggeri L, Mancusi A, Burchielli E, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Natural killer cell alloreactivity in allogeneic hematopoietic transplantation. *Curr Opin Oncol*. 2007; 19(2): 142-7.

Ruiz-Cabello F, Garrido F. HLA and cancer: from research to clinical impact. *Immunol Today*. 1998; 19(12): 539-42.

Sanz GF, Sanz MA, Vallespí T, Cañizo MC, Torrabadella M, García S, Irrigüible D, San Miguel JF. 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*. 1989; 74(1): 395-408.

Sawanobori Y, Ueha S, Kurachi M, Shimaoka T, Talmadge JE, Abe J, Shono Y, Kitabatake M, Kakimi K, Mukaida N, Matsushima K. Chemokine-mediated rapid turnover of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Blood*. 2008; 111(12): 5457-66.

Schanz J, Tüchler H, Solé F, Mallo M, Luño E, Cervera J, Granada I, Hildebrandt B, Slovak ML, Ohyashiki K, Steidl C, Fonatsch C, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Valent P, Giagounidis A, Aul C, Lübbert M, Stauder R, Krieger O, Garcia-Manero G, Faderl S, Pierce S, Le Beau MM, Bennett JM, Greenberg P, Germing U, Haase D. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol*. 2012; 30(8): 820-9.

Schmitz R, Wright GW, Huang DW, Johnson CA, Phelan JD, Wang JQ, Roulland S, Kasbekar M, Young RM, Shaffer AL, Hodson DJ, Xiao W, Yu X, Yang Y, Zhao H, Xu W, Liu X, Zhou B, Du W, Chan WC, Jaffe ES, Gascoyne RD, Connors JM, Campo E, Lopez-Guillermo A, Rosenwald A, Ott G, Delabie J, Rimsza LM, Tay Kuang Wei K, Zelenetz AD, Leonard JP, Bartlett NL, Tran B, Shetty J, Zhao Y, Soppet DR, Pittaluga S, Wilson WH, Staudt LM. Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2018; 378(15): 1396-1407.

Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011; 331(6024): 1565-70.

Screpanti V, Wallin RP, Grandien A, Ljunggren HG. Impact of FASL-induced apoptosis in the elimination of tumor cells by NK cells. *Mol Immunol*. 2005; 42(4): 495-9.

Sebastián E, Alcoceba M, Martín-García D, Blanco Ó, Sanchez-Barba M, Balanzategui A, Marín L, Montes-Moreno S, González-Barca E, Pardal E, Jiménez C, García-Álvarez M, Clot G, Carracedo Á, Gutiérrez NC, Sarasquete ME, Chillón C, Corral R, Prieto-Conde MI, Caballero MD, Salaverria I, García-Sanz R, González M. High-resolution copy number analysis of paired normal-tumor samples from diffuse large B cell lymphoma. *Ann Hematol*. 2016; 95(2): 253-62.

Seliger B, Maeurer MJ, Ferrone S. Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol Today*. 2000; 21(9): 455-64.

Seliger B, Ritz U, Abele R, Bock M, Tampe R, Sutter G, Drexler I, Huber C, Ferrone S. Immune escape of melanoma: first evidence of structural alterations in two distinct components of the MHC class I antigen processing pathway. *Cancer Res*. 2001; 61(24): 8647-50.

Seliger B, Cabrera T, Garrido F, Ferrone S. HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. *Semin Cancer Biol*. 2002; 12(1): 3-13.

Seliger B, Ruiz-Cabello F, Garrido F. IFN inducibility of major histocompatibility antigens in tumors. *Adv Cancer Res*. 2008; 101: 249-76.

Selleri C, Maciejewski JP, Catalano L, Ricci P, Andretta C, Luciano L, Rotoli B. Effects of cyclosporine on hematopoietic and immune functions in patients with hypoplastic myelodysplasia: in vitro and in vivo studies. *Cancer*. 2002; 95(9): 1911-22.

Senovilla L, Vitale I, Martins I, Tailler M, Pailleret C, Michaud M, Galluzzi L, Adjemian S, Kepp O, Niso-Santano M, Shen S, Mariño G, Criollo A, Boilève A, Job B, Ladoire S, Ghiringhelli F, Sistigu A, Yamazaki T, Rello-Varona S, Locher C, Poirier-Colame V, Talbot M, Valent A, Berardinelli F, Antoccia A, Ciccocanti F, Fimia GM, Piacentini M, Fueyo A, Messina NL, Li M, Chan CJ, Sigl V, Pourcher G, Ruckentuhl C, Carmona-Gutierrez D, Lazar V, Penninger JM, Madeo F, López-Otín C, Smyth MJ, Zitvogel L, Castedo M, Kroemer G. An immunosurveillance mechanism controls cancer cell ploidy. *Science*. 2012; 337(6102): 1678-84.

Serio B, Risitano A, Giudice V, Montuori N, Selleri C. Immunological derangement in hypocellular myelodysplastic syndromes. *Transl Med UniSa*. 2014; 8(5): 31-42.

Serra S, Horenstein AL, Vaisitti T, Brusa D, Rossi D, Laurenti L, D'Arena G, Coscia M, Tripodo C, Inghirami G, Robson SC, Gaidano G, Malavasi F, Deaglio S. CD73-generated extracellular adenosine in chronic lymphocytic leukemia creates local conditions counteracting drug-induced cell death. *Blood*. 2011; 118(23): 6141-52.

Serrano A, Brady CS, Jimenez P, Duggan-Keen MF, Mendez R, Stern P, Garrido F, Ruiz-Cabello F. A mutation determining the loss of HLA-A2 antigen expression in a cervical carcinoma reveals novel splicing of human MHC class I classical transcripts in both tumoral and normal cells. *Immunogenetics*. 2000; 51(7): 1047-52.

Serrano A, Tanzarella S, Lionello I, Mendez R, Traversari C, Ruiz-Cabello F, Garrido F. Rexpression of HLA class I antigens and restoration of antigen-specific CTL response in melanoma cells following 5-aza-20-deoxycytidine treatment. *Int J Cancer*. 2001; 94(2):243–51.

Shah N, Decker WK, Lapushin R, Xing D, Robinson SN, Yang H, Parmar S, Tung SS, O'Brien S, Fernandez-Viña M, Shpall EJ, Wierda WG. HLA homozygosity and haplotype bias among patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for disease control by physiological immune surveillance. *Leukemia*. 2011; 25(6): 1036-9.

Sloand EM, Wu CO, Greenberg P, Young N, Barrett J. Factors affecting response and survival in patients with myelodysplasia treated with immunosuppressive therapy. *J Clin Oncol*. 2008; 26(15): 2505-11.

Sloand EM, Melenhorst JJ, Tucker ZC, Pfannes L, Brenchley JM, Yong A, Visconte V, Wu C, Gostick E, Scheinberg P, Olnes MJ, Douek DC, Price DA, Barrett AJ, Young NS. T-cell immune responses to Wilms tumor 1 protein in myelodysplasia responsive to immunosuppressive therapy. *Blood*. 2011; 117(9): 2691-9.

Smith AE, Mohamedali AM, Kulasekararaj A, Lim Z, Gäken J, Lea NC, Przychodzen B, Mian SA, Nasser EE, Shooter C, Westwood NB, Strupp C, Gattermann N, Maciejewski JP, Germing U, Mufti GJ. Next-generation sequencing of the TET2 gene in 355 MDS and CMML patients reveals low-abundance mutant clones with early origins, but indicates no definite prognostic value. *Blood*. 2010; 116(19): 3923-32.

Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol*. 2001; 2(4): 293–9.

Sohlberg E, Pfefferle A, Andersson S, Baumann BC, Hellström-Lindberg E, Malmberg KJ. Imprint of 5-azacytidine on the natural killer cell repertoire during systemic treatment for high-risk myelodysplastic syndrome. *Oncotarget*. 2015; 6(33): 34178-90.

Sperling AS, Gibson CJ, Ebert BL. The genetics of myelodysplastic syndrome: from clonal haematopoiesis to secondary leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2017; 17(1): 5-19.

Srivastava MK, Sinha P, Clements VK, Rodriguez P, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer Res*. 2010; 70(1): 68-77.

Stadler M, Germing U, Kliche KO, Josten KM, Kuse R, Hofmann WK, Schrezenmeier H, Novotny J, Anders O, Eimermacher H, Verbeek W, Kreipe HH, Heimpel H, Aul C, Ganser A. A prospective, randomised, phase II study of horse antithymocyte globulin vs rabbit antithymocyte globulin as immune-modulating therapy in patients with low-risk myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2004; 18(3): 460-5.

Starczynowski DT, Vercauteren S, Telenius A, Sung S, Tohyama K, Brooks-Wilson A, Spinelli JJ, Eaves CJ, Eaves AC, Horsman DE, Lam WL, Karsan A. High-resolution whole genome tiling path array CGH analysis of CD34+ cells from patients with low-risk myelodysplastic syndromes reveals cryptic copy number alterations and predicts overall and leukemia-free survival. *Blood*. 2008; 112(8): 3412-24.

Steensma DP, Higgs DR, Fisher CA, Gibbons RJ. Acquired somatic ATRX mutations in myelodysplastic syndrome associated with alpha thalassemia (ATMDS) convey a more severe hematologic phenotype than germline ATRX mutations. *Blood*. 2004; 103(6): 2019-26.

Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, Lindsley RC, Sekeres MA, Hasserjian RP, Ebert BL. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2015; 126(1): 9-16.

Sternberg A, Killick S, Littlewood T, Hatton C, Peniket A, Seidl T, Soneji S, Leach J, Bowen D, Chapman C, Standen G, Massey E, Robinson L, Vadher B, Kaczmarski R, Janmohammed R, Clipsham K, Carr A, Vyas P. Evidence for reduced B-cell progenitors in early (low-risk) myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2005; 106(9): 2982-91.

Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001;17:463-516.

Stevens-Kroef MJ, Olde Weghuis D, ElIdrissi-Zaynoun N, van der Reijden B, Cremers EMP, Alhan C, Westers TM, Visser-Wisselaar HA, Chitu DA, Cunha SM, Vellenga E, Klein SK, Wijermans P, de Greef GE, Schaafsma MR, Muus P, Ossenkoppele GJ, van de Loosdrecht AA, Jansen JH. Genomic array as compared to karyotyping in myelodysplastic syndromes in a prospective clinical trial. *Genes Chromosomes Cancer*. 2017; 56(7): 524-534.

Strauss L, Bergmann C, Whiteside TL. Human circulating CD4+ CD25high FoxP3+ regulatory T cells kill autologous CD8+ but not CD4+ responder cells by Fas-mediated apoptosis. *J Immunol*. 2009; 182(3): 1469-80.

Takahashi K, Jabbour E, Wang X, Luthra R, Bueso-Ramos C, Patel K, Pierce S, Yang H, Wei Y, Daver N, Faderl S, Ravandi F, Estrov Z, Cortes J, Kantarjian H, Garcia-Manero G. Dynamic acquisition of FLT3 or RAS alterations drive a subset of patients with lower risk MDS to secondary AML. *Leukemia*. 2013; 27(10): 2081-3.

Teng MW, Vesely MD, Duret H, McLaughlin N, Towne JE, Schreiber RD, Smyth MJ. Opposing roles for IL-23 and IL-12 in maintaining occult cancer in an equilibrium state. *Cancer Res*. 2012; 72(16): 3987-96.

Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA. Th17 cells in human disease. *Immunol Rev*. 2008; 223: 87-113.

Thiel A, Beier M, Ingenhag D, Servan K, Hein M, Moeller V, Betz B, Hildebrandt B, Evers C, Germing U, Royer-Pokora B. Comprehensive array CGH of normal karyotype myelodysplastic syndromes reveals hidden recurrent and individual genomic copy number alterations with prognostic relevance. *Leukemia*. 2011; 25(3): 387-99.

Thomay K, Schienke A, Vajen B, Modlich U, Schambach A, Hofmann W, Schlegelberger B, Göhring G. Chromosomal instability and telomere shortening in long-term culture of hematopoietic stem cells: insights from a cell culture model of RPS14 haploinsufficiency. *Cytogenet Genome Res.* 2014; 142(1): 14-20.

Tian T, Sun Y, Li M, He N, Yuan C, Yu S, Wang M, Ji C, Ma D. Increased Th22 cells as well as Th17 cells in patients with adult T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clin Chim Acta.* 2013; 426: 108-13.

Tiu RV, Gondek LP, O'Keefe CL, Elson P, Huh J, Mohamedali A, Kulasekararaj A, Advani AS, Paquette R, List AF, Sekeres MA, McDevitt MA, Mufti GJ, Maciejewski JP. Prognostic impact of SNP array karyotyping in myelodysplastic syndromes and related myeloid malignancies. *Blood.* 2011; 117(17): 4552-60.

Thota S, Viny AD, Makishima H, Spitzer B, Radivoyevitch T, Przychodzen B, Sekeres MA, Levine RL, Maciejewski JP. Genetic alterations of the cohesin complex genes in myeloid malignancies. *Blood.* 2014; 124(11): 1790-8.

Thomas L. Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States. 1959. Ed. Hoeber-Harper, New York.

Tomasetti C, Vogelstein B, Parmigiani G. Half or more of the somatic mutations in cancers of self-renewing tissues originate prior to tumor initiation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 110(6): 1999-2004.

Tong WG, Quintás-Cardama A, Kadia T, Borthakur G, Jabbour E, Ravandi F, Faderl S, Wierda W, Pierce S, Shan J, Bueso-Ramos C, Kantarjian H, Garcia-Manero G. Predicting survival of patients with hypocellular myelodysplastic syndrome: development of a disease-specific prognostic score system. *Cancer.* 2012; 118(18): 4462-4470.

Townsend AR, Rothbard J, Gotch FM, Bahadur G, Wraith D, McMichael AJ. The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides. *Cell.* 1986; 44(6): 959-68.

Traina F, Visconte V, Elson P, Tabarrokhi A, Jankowska AM, Hasrouni E, Sugimoto Y, Szpurka H, Makishima H, O'Keefe CL, Sekeres MA, Advani AS, Kalaycio M, Copelan EA, Sauntharajah Y, Olalla Saad ST, Maciejewski JP, Tiu RV. Impact of molecular mutations on treatment response to DNMT inhibitors in myelodysplasia and related neoplasms. *Leukemia.* 2014; 28(1): 78-87.

Tsimberidou AM, Estey E, Wen S, Pierce S, Kantarjian H, Albitar M, Kurzrock R. The prognostic significance of cytokine levels in newly diagnosed acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndromes. *Cancer.* 2008; 113(7): 1605-13.

Vago L, Perna SK, Zanussi M, Mazzi B, Barlassina C, Stanghellini MT, Perrelli NF, Cosentino C, Torri F, Angius A, Forno B, Casucci M, Bernardi M, Peccatori J, Corti C, Bondanza A, Ferrari M, Rossini S, Roncarolo MG, Bordignon C, Bonini C, Ciceri F, Fleischhauer K. Loss of mismatched HLA in leukemia after stem-cell transplantation. *N Engl J Med.* 2009; 361(5): 478-88.

- Vainchenker W, Delhommeau F, Constantinescu SN, Bernard OA. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011; 118(7): 1723-35.
- Valent P, Horny HP, Bennett JM, Fonatsch C, Germing U, Greenberg P, Haferlach T, Haase D, Kolb HJ, Krieger O, Loken M, van de Loosdrecht A, Ogata K, Orfao A, Pfeilstöcker M, Rüter B, Sperr WR, Stauder R, Wells DA. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leuk Res*. 2007; 31(6): 727-36.
- Van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*. 1991; 254(5038): 1643-7.
- Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009; 114(5): 937-51.
- Vercauteren SM, Starczynowski DT, Sung S, McNeil K, Salski C, Jensen CL, Bruyere H, Lam WL, Karsan A. T cells of patients with myelodysplastic syndrome are frequently derived from the malignant clone. *Br J Haematol*. 2012; 156(3): 409-12.
- Villalobos IB, Takahashi Y, Akatsuka Y, Muramatsu H, Nishio N, Hama A, Yagasaki H, Saji H, Kato M, Ogawa S, Kojima S. Relapse of leukemia with loss of mismatched HLA resulting from uniparental disomy after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2010; 115(15): 3158-61.
- Waldron TJ, Quatromoni JG, Karakasheva TA, Singhal S, Rustgi AK. Myeloid derived suppressor cells: Targets for therapy. *Oncoimmunology*. 2013; 2(4): e24117.
- Wall L, Burke F, Barton C, Smyth J, Balkwill F. IFN-gamma induces apoptosis in ovarian cancer cells *in vivo* and *in vitro*. *Clin Cancer Res*. 2003; 9(7): 2487-96.
- Walter MJ, Ding L, Shen D, Shao J, Grillot M, McLellan M, Fulton R, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, O'Laughlin M, Kandoth C, Baty J, Westervelt P, DiPersio JF, Mardis ER, Wilson RK, Ley TJ, Graubert TA. Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2011; 25(7): 1153-8.
- Wang C, Yang Y, Gao S, Chen J, Yu J, Zhang H, Li M, Zhan X, Li W. Immune dysregulation in myelodysplastic syndrome: Clinical features, pathogenesis and therapeutic strategies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2018; 122: 123-132.
- Wang H, Wang L, Erdjument-Bromage H, Vidal M, Tempst P, Jones RS, Zhang Y. Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature*. 2004; 431(7010): 873-8.

Wang Z, Tang X, Xu W, Cao Z, Sun L, Li W, Li Q, Zou P, Zhao Z. The different immunoregulatory functions on dendritic cells between mesenchymal stem cells derived from bone marrow of patients with low-risk or high-risk myelodysplastic syndromes. *PLoS One*. 2013; 8(3): e57470.

Ward PS, Patel J, Wise DR, Abdel-Wahab O, Bennett BD, Collier HA, Cross JR, Fantin VR, Hedvat CV, Perl AE, Rabinowitz JD, Carroll M, Su SM, Sharp KA, Levine RL, Thompson CB. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell*. 2010; 17(3): 225-34.

Watson NF, Ramage JM, Madjd Z, Spendlove I, Ellis IO, Scholefield JH, Durrant LG. Immunosurveillance is active in colorectal cancer as downregulation but not complete loss of MHC class I expression correlates with a poor prognosis. *Int J Cancer*. 2006; 118(1): 6-10.

Weiss-Steider B, Soto-Cruz I, Martinez-Campos CA, Mendoza-Rincon JF. Expression of MICA, MICB and NKG2D in human leukemic myelomonocytic and cervical cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011; 30:37.

Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol*. 2011; 12(6): 492-9.

Wetzler M, Baer MR, Stewart SJ, Donohue K, Ford L, Stewart CC, Repasky EA, Ferrone S. HLA class I antigen cell surface expression is preserved on acute myeloid leukemia blasts at diagnosis and at relapse. *Leukemia*. 2001; 15(1): 128-33.

Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, Nomura T, Sakaguchi S. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science*. 2008; 322(5899): 271-5.

Wu X, Peng M, Huang B, Zhang H, Wang H, Huang B, Xue Z, Zhang L, Da Y, Yang D, Yao Z, Zhang R. Immune microenvironment profiles of tumor immune equilibrium and immune escape states of mouse sarcoma. *Cancer Lett*. 2013; 340(1): 124-33.

Xie M, Lu C, Wang J, McLellan MD, Johnson KJ, Wendl MC, McMichael JF, Schmidt HK, Yellapantula V, Miller CA, Ozenberger BA, Welch JS, Link DC, Walter MJ, Mardis ER, Dipersio JF, Chen F, Wilson RK, Ley TJ, Ding L. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med*. 2014; 20(12): 1472-8.

Yang H, Bueso-Ramos C, DiNardo C, Estecio MR, Davanlou M, Geng QR, Fang Z, Nguyen M, Pierce S, Wei Y, Parmar S, Cortes J, Kantarjian H, Garcia-Manero G. Expression of PD-L1, PD-L2, PD-1 and CTLA4 in myelodysplastic syndromes is enhanced by treatment with hypomethylating agents. *Leukemia*. 2014; 28(6): 1280-8.

Yang L, Mailloux A, Rollison DE, Painter JS, Maciejewski J, Paquette RL, Loughran TP, McGraw K, Makishima H, Radhakrishnan R, Wei S, Ren X, Komrokji R, List AF, Epling-Burnette PK. Naive T-cells in myelodysplastic syndrome display intrinsic human telomerase reverse transcriptase (hTERT) deficiency. *Leukemia*. 2013; 27(4): 897-906.

Yao CY, Hou HA, Lin TY, Lin CC, Chou WC, Tseng MH, Chiang YC, Liu MC, Liu CW, Kuo YY, Wu SJ, Liao XW, Lin CT, Ko BS, Chen CY, Hsu SC, Li CC, Huang SY, Yao M, Tang JL, Tsay W, Liu CY, Tien HF. Distinct mutation profile and prognostic relevance in patients with hypoplastic myelodysplastic syndromes (h-MDS). *Oncotarget*. 2016; 7(39): 63177-63188.

Yokose N, Ogata K, Ito T, An E, Tamura H, Dan K, Hamaguchi H, Sakamaki H, Onozawa Y, Nomura T. Elevated plasma soluble interleukin 2 receptor level correlates with defective natural killer and CD8+ T-cells in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 1994; 18(10): 777-82.

Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, Sato Y, Sato-Otsubo A, Kon A, Nagasaki M, Chalkidis G, Suzuki Y, Shiosaka M, Kawahata R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Ishiyama K, Mori H, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Sugano S, Haferlach C, Koefler HP, Shih LY, Haferlach T, Chiba S, Nakauchi H, Miyano S, Ogawa S. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 2011; 478(7367): 64-9.

Yu P, Spiotto MT, Lee Y, Schreiber H, Fu YX. Complementary role of CD4+ T cells and secondary lymphoid tissues for cross-presentation of tumor antigen to CD8+ T cells. *J Exp Med*. 2003; 197(8): 985-95.

Yu S, Liu C, Zhang L, Shan B, Tian T, Hu Y, Shao L, Sun Y, Ji C, Ma D. Elevated Th22 cells correlated with Th17 cells in peripheral blood of patients with acute myeloid leukemia. *Int J Mol Sci*. 2014; 15(2): 1927-45.

Zhang XL, Komada Y, Chipeta J, Li QS, Inaba H, Azuma E, Yamamoto H, Sakurai M. Intracellular cytokine profile of T cells from children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Immunol Immunother*. 2000; 49(3): 165-72.

Zhang Z, He Q, Tao Y, Guo J, Xu F, Wu LY, Zhao YS, Wu D, Zhou LY, Su JY, Song LX, Xiao C, Li X, Chang CK. Decitabine treatment sensitizes tumor cells to T-cell-mediated cytotoxicity in patients with myelodysplastic syndromes. *Am J Transl Res*. 2017; 9(2): 454-465.

Zeng W, Miyazato A, Chen G, Kajigaya S, Young NS, Maciejewski JP. Interferon-gamma-induced gene expression in CD34 cells: identification of pathologic cytokine-specific signature profiles. *Blood*. 2006; 107(1): 167-75.

Zou JX, Rollison DE, Boulware D, Chen DT, Sloand EM, Pfannes LV, Goronzy JJ, Bai F, Painter JS, Wei S, Cosgrove D, List AF, Epling-Burnette PK. Altered naive and memory CD4+ T-cell homeostasis and immunosenescence characterize younger patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia*. 2009; 23(7): 1288-96.