
Caracterització clínic-biològica de les síndromes mielodisplàstiques amb deleció 5q

Mar Mallo i Fajula

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia



Facultat de Biociències

Universitat Autònoma de Barcelona

Caracterització clínic-biològica de les síndromes mielodisplàstiques amb deleció 5q

Memòria presentada per

Mar Mallo i Fajula

per optar al Grau de

Doctora en Biologia

Tesi realitzada sota la direcció del **Dr. Francesc Solé**

i la tutoria de la **Dra. Ma. Dolors Coll**

Mar Mallo i Fajula

La doctoranda

Dr. Francesc Solé i Ristol

El director de tesi

Bellaterra, 2013

El Dr. Francesc Solé i Ristol, director de la Plataforma de Citogenètica i Cap de Grup de Recerca en Síndromes Mielodislàstiques de l'Institut de Recerca Contra la Leucèmia Josep Carreras

CERTIFICA

Que la tesi doctoral titulada "Caracterització clínic-biològica de les síndromes mielodislàstiques amb deleció 5q", presentada per Mar Mallo i Fajula, per tal d'accedir al títol de Doctora en Biologia, ha estat realitzada sota la seva direcció i compleix els requisits formals i científics per a ser defensada davant del tribunal corresponent.

El treball ha estat realitzat en el Laboratori de Citogenètica Molecular, Servei de Patologia (IMIM-Hospital del Mar) i en el Grup de Recerca en SMD (Institut de Recerca Contra la Leucèmia Josep Carreras).

Barcelona, 2013

Dr. Francesc Solé i Ristol

Si sabéssim el que fèiem, no seria investigació, oi?

Albert Einstein

A la meva família

Agraïments

Quan es practica l'agraïment, hi ha un sentit de respecte cap als altres

Dalai Lama

Quan em van dir que escriure els agraïments era una de les parts més difícils d'escriure no m'ho creia i ara que em trobo davant del paper en blanc, dono fe! És difícil per dos motius, un perquè mires enrere i veus tot el camí recorregut, mirar enrere no sempre és agradable però també és just ser agraït amb totes aquelles persones que t'has trobat durant el camí i que, en definitiva, pel bo o pel dolent fan que sigui la persona que sóc ara, ni millor ni pitjor que quan va començar aquest llarg camí, diferent. També és un moment difícil perquè no voldria deixar-me a ningú i així espero! Però si no ho compleixo mil disculpes d'avançat.

És un moment complicat perquè en ocasions la vida i per qüestions alienes a un mateix i, en altres ocasions, per mirar més enfora que a dins, alguns camins han anat divergint.

Ufff... per on començar, potser per la persona que m'hi va ficar, el Dr. Francesc Solé, el **Kiko!** Tu has seguit la meva evolució des que era una estudiant de la Pompeu, al principi cada de 3 mesos i després en el dia a dia. En moltes coses discrepem, ja saps que som diferents però coincidirem en que no sóc la mateixa! Ja han passat 6 anys des de llavors! Quina por mirar enrere! Kiko, gràcies per tot el que m'has aportat, en el terreny tant professional com personal i que, en definitiva, fan que sigui una persona amb un major grau de confiança, valor, decisió,... També gràcies per promocionar-me, sempre confiar en mi i, fins i tot, en la redacció d'aquesta tesi confiar en el meu criteri i donar-me suport... i si aquesta tesi és com és, és pel teu saber fer en el món displàsic, i per mi també, eh! ☺ Merci per convertir-me en una becària displàsica i deixar-me formar part del grup de SMD a l'Hospital del Mar,...gràcies per la confiança dipositada en mi i per voler compartir amb mi des del minut 0 el projecte "Can Ruti", ja una realitat. Tot i ser un barrufet rondinaire saps que sempre he intentat fer-ho de la millor manera possible... i tu millor que ningú saps que no ha sigut un camí gens fàcil... i gràcies per intentar cada vegada amb una mica més d'èxit aconseguir apartar l'ordinador i mòbil quan entro al teu despatx.

Leo! Si en esta tesis tuviera que poner autores tu serías la segunda sin ninguna duda! No sé como agradecerle todo lo que has hecho por mi, revisando el IMASIS, las fichas del registro, diagnósticos después de sesión, la clasificación OMS, la introducción de esta tesis... y siempre aguantando y ayudándome con mis dudas (casi siempre las mismas, lo sé! soy repetitiva hasta con esto!). Te echo mucho de menos y ya sabes que

no solo profesionalmente, aunque para mi eres una gran profesional y siempre serás mi doctora de cabecera. Siempre he confiado en tu criterio y rigurosidad a la hora de trabajar. Formamos un gran grupo displásico en el Hospital del Mar y espero que continúe así junto a Lourdes y el resto. **Lourdes!** Moltes gràcies per tot, per escoltar-me, estar pendent de la meva evolució i no només evolució professional. M'ha encantat treballar amb tu i compartir congressos, anar de congrés amb el tàndem Kiko-Lourdes no té preu! Ja que estic amb les citòlogues, no em puc oblidar de l'Encarna i l'Ana Ferrer. **Encarna!** Siempre me acordaré de las sesiones y tu gran sentido del humor... **Ana!** mare d'uns bessons moníssims! ets una marassa! Merci per contestar dubtes no limfoides... Sempre m'ha agradat la teva rigurositat treballant, i ho saps! El perfeccionisme, entre d'altres coses ens uneixen... I no em puc deixar la **Doctora Woessner**, Doctora ha sigut un plaer compartir sessions, aniversaris, congressos,... amb vostè!

Parlant de displàsics, no em puc deixar el **Francesc** gràcies per mantenir la base de dades sempre al dia! Però continuem amb les hematòlogues, **Carme Pedro** gràcies per estar sempre disposada a col·laborar en els projectes i sempre posar-nos fàcil obtenir mostres. I ara les més joves! **Silvia Saumell** gràcies per la teva ajuda i estar sempre disposada a ajudar. **Àgueda!** Ja saps que m'encantes! M'agrada explicar-te les coses i tenir el teu punt de vista... m'agrada tenir-te com amiga i ja saps que per mi ets una gran amiga! Muaaaa!

Blanca i Marta, moltes gràcies per la vostra ajuda revisant cariotips, ensenyant FISH, solucionant dubtes, en ocasions, una mica filosòfics, revisant articles... sou unes molt bones citogenetistes!

Del laboratori de l'Hospital del Mar no em puc deixar la **Rosa Mari**, per mi sempre seràs una gran mestra i una gran referència! **Montse!** Dona gust baixar a l'Hospital del Mar de tant en tant sabent que ens reps amb un gran somriure i sempre pendent de si estem bé i de com està el petit de la casa! I... **Maria**, moltes gràcies per la teva ajuda en el processament de mostres, en l'organització i per haver superat i recuperat la nostra relació, gràcies per escoltar en determinats moments i ser psicòloga (o també podríem dir pitonisa!).

Gràcies a la gent de Molecular (**Erica, Mercè, Mari, Raquel, Rocío, Gemma i Bea**) a l'Hospital del Mar pel "suministrament" de pellets secs o verds!

Tot i la divergència de camins laborals i personals no em vull deixar persones que en algun moment han format part d'aquest llarg camí: **Olaya**, gracias por adentrarme en el mundo de los BACs y resolver mil dudas, sabes mucho! **Rocío**, gracias por tu ayuda en el laboratorio, **Crisis**, gràcies pels moments PRBB i el teu suport, per desgràcia, la vida i les seves circumstàncies ha fet que seguim camins diferents. **Alma!** Moltes gràcies per tot el suport en l'etapa de l'Hospital del Mar, gràcies a tu van ser més suportables determinades vivències! Molta soort! I la **Cane!** Anna! Merci per estar sempre pendent de la meva evolució professional i tesi! Amb tu va començar tot, preparant el FISH i hores de valoració a la Kikera... ☺

No em puc deixar l'**Eulàlia!** Moltes gràcies per tot! Perque tot el que sé dels arrays és gràcies a tu i gràcies per confiar en mi, per deixar-me tirar protocols d'arrays sola. I l'agraïment continua ara amb el projecte PAM, gràcies per resoldre mil dubtes. I lligat al SAM, la **Lara**. Laraaaa! Merci per ser com ets, et fas estimar! Merci per tots els moments COST i no COST, sempre amb un somriure i escoltant. I gràcies per portar-nos el Ton i el Lluís, són la canya!

No em puc deixar les **Annes! Calull**, hem compartit molts moments al despatx! Ara el tens per tu sola... Continua disfrutant amb la feina! **Puiggròs**, perdó, adjunta Puiggròs, merci per tots els moments laborals i extralaborals, ets una crack ja ho saps, qui millor que tu soluciona problemes amb Excel, SPSS,... La meva amiga crack! A la muntanya us trobem a faltar! **Vera**, tu també eres del grup 164 però de moment els nostres camins continuen junts... ets la meva successora displàsica, i està en bones mans... del que estic ben segura és que estarà ordenadíssim! Moltes gràcies per tot, per escoltar-me, entendre'm, estar allà sempre, i... ser la meva xòfer particular en els dies de pluja. I aquests tres mesos en que has estat a San Diego, hem pogut observar que la distància no ha pogut amb nosaltres, espectacular!!

Gràcies a la meva tutora, la **Maria Dolors Coll** per les seves suggerències i correccions en la revisió final de la tesi.

No vull deixar-me els col·laboradors ens els diferents treballs que hem fet. **Mónica, María, Ana, Eva y Jesús Mari**. Muchas gracias a todos por vuestra hospitalidad durante mi semana en Salamanca y, sobretudo, a María por acogerme en tu casa. **José, Esperanza y Mariam**, muchas gracias por vuestra ayuda y hospitalidad en nuestras visitas puntuales a Valencia.

L'etapa Hospital del Mar es va acabar però una etapa nova ha començat i ens han rebut amb els braços oberts, ens sentim com si fóssim part de l'equip de tota la vida, gràcies! Moltes gràcies a la gent de citogenètica: **Neus, Adela, Marisol, Isabel, Javier, Nani i Carmen**. Als hematòlegs: **Blanca, Josep Maria, Fuensanta, Inés, Tomàs, Jordi,...** I a la gent de molecular: **Silvia, Lurdes, Marta, Diana, Isma,...** Gràcies per estar sempre disposats a ajudar. Amb tu **Lurdes** ja havia tingut contacte abans i he de dir que és un plaer poder treballar al teu costat.

No em vull deixar la gent de l'IJC que fa poc que estem junts però hem format un equip ben avingut. Gràcies **Joao, Laura i Jordi!** Sou uns grans companys de feina, pue muu bien!

Parlant de l'IJC no seria just no mencionar a **Dr. Feliu**, gràcies per confiar amb nosaltres i impulsar aquest gran projecte, felicitats! També agrair a tot el personal **IMPPC-IJC**, des d'administració, IT, finances, recepció fins als IPs i altres investigadors per la seva ajuda.

Gràcies a l'IJC per l'ajuda en la impressió d'aquesta tesi.

No em voldria deixar tota la gent amb la que vaig compartir la meva estança a Cleveland. Thanks to **Mike, Yuka, Ania, Hadrian, Shahper, Baschba, Conie, Jarek, Tom, Debora....** and specially to **Hideki, Kathryn, Simon and Christine**, for helping me in all the lab and no-lab stuff.

Però no tot és feina! Noies bio! **Luz**, aunque no nos veamos a menudo sé que nos tenemos y nos entendemos y sé que estás allí para lo que necesite... Muchos ánimos con la tesis! Tu eres la siguiente! **Ana!** Tu también eres de las siguientes! Muchas gracias por nuestros momentos en la sala de becarias y estar dispuesta siempre a ayudar!! **Tres i Rosa** per les nostres biotrobades que tot i ser espaiades fem que no ho semblin. **Marta**, m'agrada que tot i la distància continuem en contacte via mail o gtalk! I la Nuria i jo no tenim perdó, et devem una visita a Dinamarca. **Nuri** (o Dra. Gresa para los amigos)!!!! Què dir?? M'encantes! Ja ho saps! Jejeje... dona gust parlar amb tu, canvies la visió que puguis tenir d'un dia mediocre! Continua així i no canviïs mai si us plau! **Mireia, Laura i Laia** (i la **Cris** de convidada especial ☺) Grans moments al desert indi, als camps d'arrós (Lluïssaaaa!), i a molts altres indrets... **Dra Rodón** merci per donar sempre el punt de vista pràctic a tot i ens veiem als USA, no?, **Mireia**, merci per estar sempre disposada a escoltar i parlar de temes banals o no tan banals. **Laia**, merci

per estar allà i recorda, ets la meva ídol running! No em vull deixar la **Corral!** Mireia, m'encanta el teu sentit de l'humor. Merci per la vostra ajuda durant aquest període tesi i per tot el camí que encara ens queda per explorar juntes. Us estimo!

Marc i Anna, ja fa anys que ens coneixem i per molt temps que hagi passat sense veure'ns... quan ens trobem és com si no hagués passat el temps des de la Salle. Anna, mil gràcies per resoldre dubtes informàtics i no informàtics! Merci per la teva gran ajuda en el disseny de la portada.

A tots els **pacients** que han accedit a participar en els estudis i que han facilitat la realització d'aquesta tesi.

Per últim, i no menys important... gràcies als meus avis, en especial a l'**avi Joan** per sempre mostrar interès en el meu camí acadèmic, us trobo a faltar! Gràcies als meus **parens** per estar sempre allà, aguantar els meus humors, les meves hores davant de l'ordinador,... i gràcies per haver-me inculcat la responsabilitat per fer sempre les coses el millor possible i ser perseverant per aconseguir el que es vol. **Laura**, ets una gran germana, sé que sempre estàs allà per quan ho necessiti i per mi ets un gran exemple de superació! Gràcies a tu i el Charles per tenir el **Joel**, l'alegria de la nostra vida!

Moltes i moltes gràcies a tots!

L'elaboració d'aquesta tesi s'ha portat a terme gràcies a les següents ajudes:

- Beca predoctoral del *Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Economía y Competitividad)*: **Ayudas predoctorales de formación en investigación (PFIS)**, FI07/00107, 2008-2011.
- Ajut per donar suport a les activitats dels grups de recerca de Catalunya, AGAUR (Generalitat de Catalunya): **Grup de Recerca Reconegut: Grup de Recerca Translacional en Neoplasies Hematològiques**, 2009 SGR 541, 2009-2013.
- *Subprograma RETICS Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Red de Cáncer, Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Economía y Competitividad)*, RD07/0020/2004, 2009-2012.
- *Subprograma RETICS Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Red de Cáncer, Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Economía y Competitividad)*, RD12/0036/0044, 2013.
- Beca de la *Fundación Española de Hematología y Hemoterapia*, 2012.
- Financiació per part de Celgene Espanya.

Aquest treball ha generat les següents publicacions:

- I. **Mallo M**, Arenillas L, Espinet B, Salido M, Hernández JM, Lumbreras E, del Rey M, Arranz E, Ramiro S, Font P, González O, Renedo M, Cervera J, Such E, Sanz GF, Luño E, Sanzo C, González M, Calasanz MJ, Mayans J, García-Ballesteros C, Amigo V, Collado R, Oliver I, Carbonell F, Bureo E, Insunza A, Yañez L, Muruzabal MJ, Gómez-Beltrán E, Andreu R, León P, Gómez V, Sanz A, Casasola N, Moreno E, Alegre A, Martín ML, Pedro C, Serrano S, Florensa L, Solé F. *Fluorescence in situ hybridization improves the detection of 5q31 deletion in myelodysplastic syndromes without cytogenetic evidence of 5q*. Haematologica 2008;93:1001-1008.
- II. **Mallo M**, Cervera J, Schanz J, Such E, García-Manero G, Luño E, Steidl C, Espinet B, Vallespí T, Germing U, Blum S, Ohyashiki K, Grau J, Pfeilstöcker M, Hernández JM, Noesslinger T, Giagounidis A, Aul C, Calasanz MJ, Martín ML, Valent P, Collado R, Haferlach C, Fonatsch C, Lübbert M, Stauder R, Hildebrandt B, Krieger O, Pedro C, Arenillas L, Sanz MÁ, Valencia A, Florensa L, Sanz GF, Haase D, Solé F. *Impact of adjunct cytogenetic abnormalities for prognostic stratification in patients with myelodysplastic syndrome and deletion 5q*. Leukemia 2011;25:110-120.
- III. **Mallo M**, del Rey M, Ibáñez M, Calasanz MJ, Arenillas L, Larráyoz MJ, Pedro C, Jerez A, Maciejewski J, Costa D, Nomdedeu M, Diez-Campelo M, Lumbreras E, González-Martínez T, Marugán I, Such E, Cervera J, Cigudosa JC, Álvarez S, Florensa L, Hernández JM, Solé F. *Response to lenalidomide in myelodysplastic syndromes with del(5q): influence of cytogenetics and mutations*. British Journal of Haematology 2013.

Índex

ÍNDEX	I
ABREVIATURES	VII
INTRODUCCIÓ	1
1. Mielopoesi	3
1.1. Introducció a l'hematopoesi	3
1.2. Mielopoesi	4
2. Neoplàsies hematològiques	7
2.1. Neoplàsies mieloides	7
2.2. Síndromes mielodisplàstiques	10
2.2.1. Introducció i epidemiologia	10
2.2.2. Característiques clíniques	12
2.2.3. Diagnòstic	12
2.2.3.1. Classificació FAB	14
2.2.3.2. Classificació OMS	15
2.2.4. Alteracions citogenètiques en les SMD	23
2.2.4.1. La deleció 5q	25
2.2.5. Índexs pronòstics	27
2.2.6. Tractament	32
2.2.6.1. Tractament en els pacients de baix risc	33
2.2.6.2. Tractament en els pacients d'alt risc	36
3. Tècniques d'anàlisi genètic	37
3.1. Citogenètica convencional	37
3.2. Hibridació <i>in situ</i> fluorescent	38
3.2.1. Tipus de sondes	41
3.2.2. Sondes no comercials	42
3.3. <i>Microarrays</i> d'ADN genòmic	42
3.4. Tècnica de seqüenciació directa	46
4. Característiques genètiques de les SMD	47
4.1. Estudis de citogenètica convencional	47
4.2. Estudis amb la tècnica de FISH	49
4.3. Estudis de <i>microarrays</i> genòmics	49
4.4. Estudis mutacionals	53
HIPÒTESI I OBJECTIUS	55
RESULTATS	59
1. Treball I: La hibridació <i>in situ</i> fluorescent millora la detecció de la deleció 5q31 en síndromes mielodisplàstiques (SMD) sense evidència citogenètica de 5q-	63

2. Treball II: Impacte de les alteracions citogenètiques acompanyants per a l'estratificació pronòstica en els pacients amb síndrome mielodisplàstica i deleció 5q	73
DISCUSSIÓ	89
1. Utilitat i impacte de les tècniques d'estudi citogenètic en la deleció 5q	91
1.1 Importància de la tècnica de FISH	91
1.2 Importància de la tècnica de <i>microarrays</i> genòmics	93
2. Factors pronòstics en les SMD amb deleció 5q	97
2.1. Les alteracions citogenètiques acompanyants determinen el pronòstic per davant del percentatge de blastes en MO	97
2.2. L'evolució a LMA en les SMD amb deleció 5q	100
3. Determinadors clínics i moleculars en la resposta al tractament amb lenalidomida	101
3.1. Impacte pronòstic de les alteracions detectades per <i>microarrays</i> de SNP i mutacions	101
3.2. Impacte pronòstic de les característiques clínic biològiques	104
3.3. L'evolució a leucèmia mieloide aguda en els pacients amb SMD i deleció 5q tractats amb lenalidomida	104
4. "Síndrome 5q-": relació amb la supervivència global, l'evolució a leucèmia mieloide aguda i la resposta al tractament amb lenalidomida	105
CONCLUSIONS	107
BIBLIOGRAFIA	111
ANNEXES	127
1. Annex 1: Treball III: Resposta a la lenalidomida en les síndromes mielodisplàstiques amb deleció 5q: influència de la citogenètica i les mutacions	129
2. Annex 2: Presentació en congressos dels treballs d'aquesta tesi	147
3. Annex 3: Altres publicacions elaborades durant la realització de la tesi doctoral	151

Abreviatures

ADN	Àcid desoxiribonucleic
AR	Anèmia refractària
AREB	Anèmia refractària amb excés de blastes
AREB-T	Anèmia refractària amb excés de blastes en transformació
ARN	Àcid ribonucleic
ARSA	Anèmia refractària amb sideroblastes en anell
ASXL1	<i>Additional sex combs like 1</i>
BAC	Cromosoma bacterià artificial, de l'anglès <i>bacterial artificial chromosome</i>
c-CBL	<i>Cbl proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase</i>
CC	Citogenètica convencional
CFU-L	Cèl·lula germinal limfoide, de l'anglès <i>colony formation unit-lymphoid</i>
CFU-LM	Cèl·lula mare limfomieloide, de l'anglès <i>colony formation unit-lymphomyeloid</i>
CFU-M	Cèl·lula germinal mieloide, de l'anglès <i>colony formation unit-myeloid</i>
CRDM	Citopènia refractària amb displàsia multilínia
CRDM-SA	Citopènia refractària amb displàsia multilínia i sideroblastes en anell
CRDU	Citopènia refractària amb displàsia unilínia
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
ddATP	2',3'-Dideoxiadenosina-5'-trifosfat
ddCTP	2',3'-Dideoxicitidina-5'-trifosfat
ddGTP	2',3'-Dideoxiguanosina-5'-trifosfat
ddNTPs	dideoxinucleòtids trifosfats
ddTTP	2',3'-Dideoximidina-5'-trifosfat
DUP	Disomia uniparental
DUPa	Disomia uniparental adquirida
FAB	Francès-Americà-Britànic
FISH	Hibridació <i>in situ</i> fluorescent, de l'anglès <i>fluorescence in situ hybridization</i>
HGC	Hibridació genòmica comparada
IDH1	<i>Isocitrate dehydrogenase 1</i>
IDH2	<i>Isocitrate dehydrogenase 2</i>

IPSS	Índex pronòstic internacional, de l'anglès <i>international prognostic scoring system</i>
IPSS-R	Índex pronòstic internacional revisat, de l'anglès <i>revised international prognostic scoring system</i>
LB	Luria-Bertoni
LMA	Leucèmia mieloide aguda
LMMC	Leucèmia mielomonocítica crònica
LMMC-MD	Leucèmia mielomonocítica crònica, variant mielodisplàstica
LMMC-MP	Leucèmia mielomonocítica crònica, variant mieloproliferativa
LMMJ	Leucèmia mielomonocítica juvenil
LOH	Pèrdua d'heterozigositat, de l'anglès <i>loss of heterozygosity</i>
MO	Medul·la òssia
NMP	Neoplàsia mieloproliferativa
NR	Neutropènia refractària
OMS	Organització mundial de la salut
RCD	Regió comuna delecionada
SG	Supervivència global
SMD	Síndrome mielodisplàstica
SMD/NMP, I	Síndrome mielodisplàstica/neoplàsia mieloproliferativa, inclassificable
SNP	Polimorfisme d'un únic nucleòtid, de l'anglès <i>single nucleotide polymorphism</i>
SP	Sang perifèrica
TR	Trombocitopènia refractària
<i>TET2</i>	<i>Tet methylcytosine dioxygenase 2</i>
<i>TP53</i>	<i>Tumor protein p53</i>
WPSS	Índex pronòstic basat en la classificació OMS, de l'anglès <i>WHO classification-based prognostic scoring system</i>
YAC	Cromosoma artificial de llevat, de l'anglès <i>yeast artificial chromosome</i>

Introducció

Sempre sembla impossible fins que està fet

Nelson Mandela

1. Mielopoesi

1.1. Introducció a l'hematopoesi

L'hematopoesi és el procés de formació, desenvolupament i maduració dels diferents elements cel·lulars que formen part del sistema hematopoètic, constituït per la sang perifèrica (SP), la medul·la òssia (MO), els ganglis limfàtics, la melsa i el timus. En l'adult, l'hematopoesi té lloc a la MO on es troba el microambient adequat pel desenvolupament i diferenciació de les cèl·lules germinals hematopoètiques cap a cèl·lules madures.

En la MO podem trobar cèl·lules immadures o **progenitors hematopoètics**, les quals no posseeixen distintius morfològics precisos i; **precursors hematopoètics**, estadis més diferenciats de l'hematopoesi. D'aquesta forma, en la MO existeix una cèl·lula mare totipotent, és a dir, amb capacitat de proliferació, diferenciació i autorenovació, anomenada **cèl·lula mare limfomieloide o CFU-LM**. Aquesta cèl·lula pot donar lloc a cèl·lules germinals pluripotents: la **cèl·lula germinal limfoide (CFU-L)** i la **cèl·lula germinal mieloide (CFU-M)**^{1,2}. La cèl·lula germinal pluripotent mieloide, estimulada pel microambient dona lloc a poblacions compromeses cap a la diferenciació d'una o diverses línies mieloides, les quals poden ser mono-, bi- o tripotents (Figura 1)³. Un cop les cèl·lules són madures sortiran a la circulació, a SP.

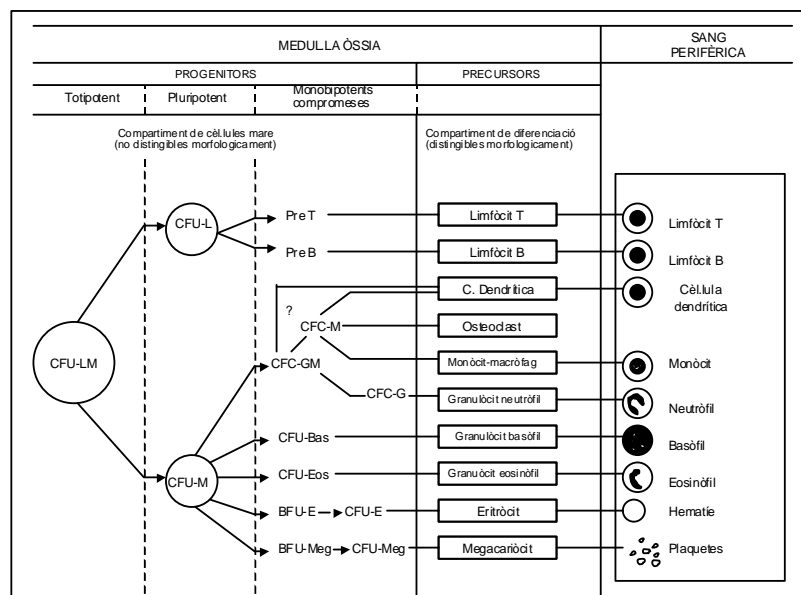


Figura 1. Esquema de l'hematopoesi humana³

1.2. Mielopoesi

La mielopoesi és el procés de generació, desenvolupament i maduració dels elements mieloides, que estan constituïts per les següents sèries: eritroblàstica, granulopoètica, monocítica, megacariocítica, així com les cèl·lules de la matriu òssia.

Sèrie eritroblàstica o sèrie vermella

En condicions normals, aquesta sèrie constitueix entre un 30 i 35% dels elements nucleats de la MO. La seqüència madurativa d'aquesta sèrie comença amb el proeritroblaste, que origina l'eritroblaste basòfil, i aquest l'eritroblaste policromàtic i l'eritroblaste ortocromàtic. Un cop finalitzada la maduració s'expulsa el nucli, transformant-se en reticulòcit (element sense nucli amb mitocòndries, reticles i ribosomes). A mida que el reticulòcit madura va perdent el reticle fins a transformar-se en una hematia madura. La Figura 2 mostra aquesta seqüència madurativa. L'hematia o eritròcit, l'element més madur de la sèrie eritroide. Un cop a la SP, té la funció de la captació d'oxigen i transport del mateix als teixits³.

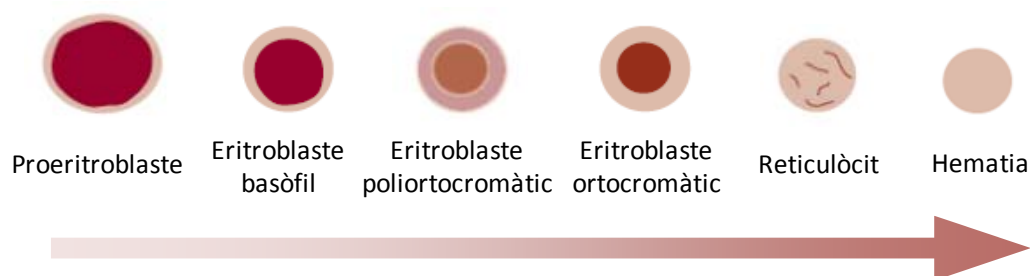


Figura 2. Seqüència madurativa de la sèrie eritropoètica (Adaptació de Woessner i Florensa, 2006³)

Sèrie granulopoètica o sèrie blanca

Les cèl·lules granulopoètiques constitueixen entre un 60 i 65% dels components citològics medul·lars. La seqüència madurativa comença amb el mieloblaste, que dóna lloc al promielòcit i aquest al mielòcit, al metamielòcit, a la forma de banda o de bastó i, finalment, al segmentat. Els granulòcits segmentats s'originen a partir de les formes en banda per segmentació nuclear (presenten de tres a cinc lòbuls nuclears) i són els elements més madurs de la sèrie granulopoètica. Aquests elements són els que sortiran a la circulació sanguínia i en funció del tipus de granulació específica es

distingiran entre neutròfils, eosinòfils i basòfils, per exercir les seves funcions de bacteriòlisi i fagocitosi³.

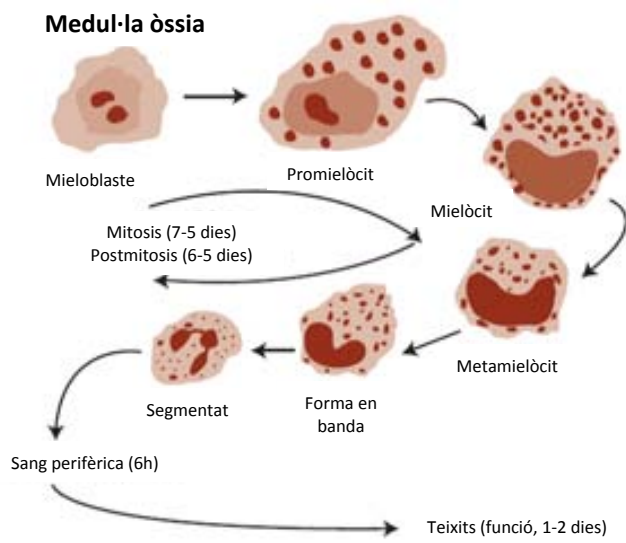


Figura 3. Esquema maduratiu de la granulopoesi (Adaptació de Woessner i Florensa, 2006³)

Sèrie monocítica

Les cèl·lules monocítiques pertanyen al sistema mononuclear-fagocític. La forma més immadura és el monoblaste que es transforma a promonòcit. Posteriorment, té lloc el pas a la SP on es transforma a monòcit i, finalment, es queda als teixits en forma d'histiòcit i macròfag. Els macròfags són histiòcits que han exercit la fagocitosi i contenen restes de material fagocitari en el seu interior³.

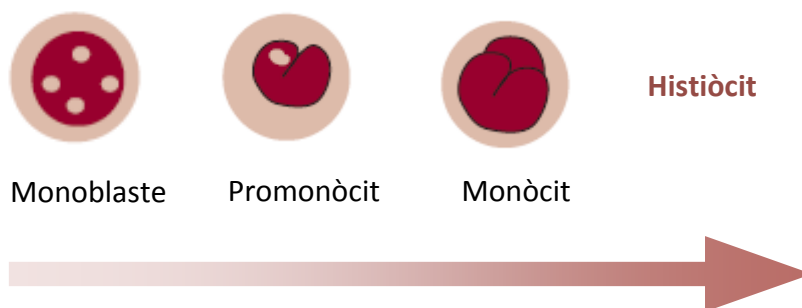


Figura 4. Seqüència madurativa de la sèrie monocítica (Adaptació de Woessner i Florensa, 2006³)

De la cèl·lula mare granulomonocítica també en deriven part de les cèl·lules dendrítiques. Són una població heterogènia ubicada en quasi tots els teixits i potents inductores de la resposta immune T primària mitjançant l'estimulació dels limfòcits T verges³.

Sèrie megacariocítica

Els estadis evolutius de la sèrie megacariocítica són els següents: promegacarioblast, megacarioblast, promegacariòcit, megacariòcit granular formador de plaquetes i el megacariòcit alliberador de plaquetes, les quals passaran a la SP.

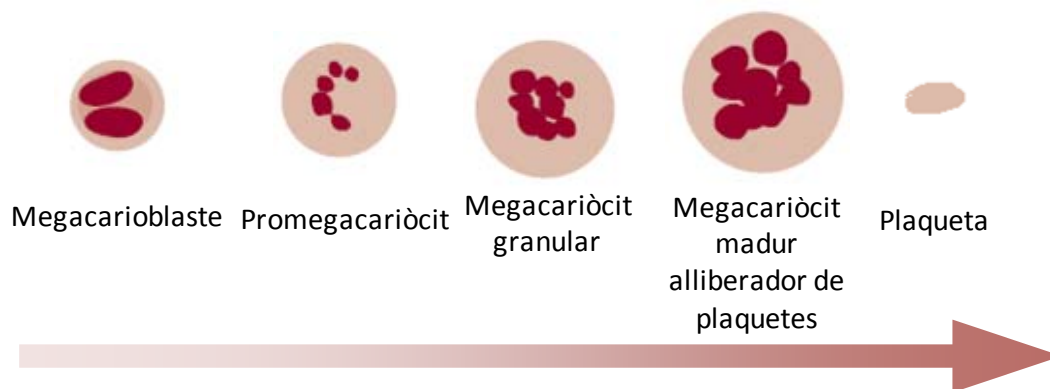


Figura 5. Seqüència madurativa de la sèrie megacariocítica (Adaptació de Woessner i Florensa, 2006³)

El megacariòcit pateix un procés de divisió conegut com a endomitosi que consisteix en divisions nuclears sense les corresponents divisions citoplasmàtiques. D'aquesta forma es van formant cèl·lules poliploides de mida gran i amb un nucli polisegmentat. Les plaquetes o trombòcits despreses del citoplasma del megacariòcit passen a SP on portaran a terme les seves funcions d'intervenció en els mecanismes d'hemostàsia.

Cèl·lules de la matriu òssia

La matriu òssia està formada per osteoblastes, osteòcits i osteoclastes. Els precursors dels osteoblastes i osteoclastes es troben en la MO i en proporció minoritària en la SP. Ambdós tipus cel·lulars són els responsables de la remodelació normal de la superfície de les trabècules contigües a la MO⁴. A més, s'ha demostrat com moltes de les citocines segregades pels osteoblastes són crítiques per l'hematopoesi⁵.

Els osteòcits són components cel·lulars de la trabècula òssia que procedeixen de la maduració dels osteoblastes. Aquests actuen com a sensors i estan en comunicació amb la superfície de la trabècula per regular la feina dels osteoblastes i osteoclastes³.

2. Neoplàsies hematològiques

Dins de les neoplàsies hematològiques la introducció anirà dirigida a les neoplàsies mieloides.

2.1. Neoplàsies mieloides

La classificació de l'“Organització Mundial de la Salut” (OMS) de l'any 2008⁶ de les neoplàsies mieloides inclou cinc categories:

- Neoplàsies mieloproliferatives (NMP)
- Neoplàsies mieloides i limfoides amb eosinofília i alteracions dels gens *PDGFRA*, *PDGFRB*, o *FGFR1*
- Neoplàsies mielodisplàstiques/mieloproliferatives (SMD/NMP)
- Síndromes mielodisplàstiques (SMD)
- Leucèmia mieloide aguda (LMA)

Les **neoplàsies mieloproliferatives** són desordres clonals de les cèl·lules mare hematopoètiques caracteritzades per la proliferació d'una o més línies mieloides (granulocítica, eritroide, megacariocítica i mastòcits). Es caracteritzen per presentar hipercel·lularitat de la MO amb maduració efectiva i nombre augmentat de granulòcits, eritròcits i/o plaquetes a SP.

Les **neoplàsies mieloides i limfoides amb eosinofília i alteracions de *PDGFRA*, *PDGFRB*, o *FGFR1*** són tres grups específics que tenen en comú la formació d'un gen de fusió que codifica per una tirosin-quinasa aberrant. Aquests tres desordres poden estar presents com a neoplàsies mieloproliferatives cròniques però la freqüència de la manifestació com a neoplàsia limfoide varia.

Les **neoplàsies mielodisplàstiques/mieloproliferatives** són neoplàsies mieloides clonals que presenten alguns trets (clínic, de laboratori i morfològics) propis de SMD i

d'altres propis de NMP. Es caracteritzen per presentar hipercel·lularitat a la MO per la proliferació d'una o més línies mieloides. Normalment, la proliferació és efectiva en algunes línies amb augment de cèl·lules circulants displàstiques (morfològica o funcionalment). Simultàniament una o més línies poden mostrar proliferació inefectiva derivant-se en la presència de citopènies. La Taula 1 mostra les entitats que formen part d'aquest grup de neoplàsies.

Taula 1. Classificació de les neoplàsies mielodisplàstiques/mieloproliferatives segons la classificació OMS 2008⁶

Neoplàsies mielodisplàstiques/mieloproliferatives

- Leucèmia mielomonocítica crònica (LMMC)
 - Leucèmia mieloide crònica atípica, *BCR-ABL1* atípica
 - Leucèmia mielomonocítica juvenil (LMMJ)
 - Neoplàsia mielodisplàstica/mieloproliferativa inclassificable (SMD/NMP, I)
 - *Entitat provisional:* anèmia refractària amb sideroblastes en anell amb trombocitosi (ARSA-T)
-

Les **síndromes mielodisplàstiques (SMD)** es descriuen en el punt 2.2.

La **leucèmia mieloide aguda** és una malaltia resultant de l'expansió clonal de cèl·lules immadures (blastes) mieloides a SP, MO o un altre teixit. És una malaltia heterogènia i pot implicar una o més línies mieloides. El requisit per diagnosticar de LMA és la presència de 20% o més mieloblastes a SP o MO. El diagnòstic de LMA es pot fer independentment del percentatge de blastes a SP i/o MO si hi ha associades algunes de les següents alteracions citogenètiques: $t(8;21)(q22;q22)$, $inv(16)(p13.1q22)$, $t(16;16)(p13.1;q22)$ o $t(15;17)(q22;q12)$.

La Taula 2 mostra les LMA i neoplàsies mieloides relacionades.

Taula 2. Classificació de les leucèmies mieloides agudes segons la classificació OMS 2008⁶

Leucèmia mieloide aguda i neoplàsies mieloides relacionades

- **LMA amb anomalies citogenètiques recurrents**
 - LMA amb t(8;21)(q22;q22); *RUNX1-RUNX1T1*
 - LMA amb inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*
 - Leucèmia promielocítica aguda amb t(15;17)(q22;q12); *PML-RAR α*
 - LMA amb t(9;11)(p22;q23); *MLLT3-MLL*
 - LMA amb t(6;9)(p23;q34); *DEK-NUP214*
 - LMA amb inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2); *RPN1-EVI1*
 - LMA (megacarioblàstica) amb t(1;22)(p13;q13); *RBM15-MKL1*
 - Entitat provisional: LMA amb *NPM1* mutat
 - Entitat provisional: LMA amb *CEBP α* mutat
 - **LMA amb canvis relacionats amb la mielodisplàsia**
 - **Neoplàsies mieloides relacionades amb la teràpia**
 - **LMA, no categorizable**
 - LMA amb mínima diferenciació
 - LMA sense maduració
 - LMA amb maduració
 - Leucèmia mielomonocítica aguda
 - Leucèmia monoblàstica/monocítica aguda
 - Leucèmia eritroide aguda:
 - Leucèmia eritroide pura
 - Eritroleucèmia, eritroide/mieloide
 - Leucèmia megacarioblàstica aguda
 - Leucèmia basofílica aguda
 - Panmielosi aguda amb mielofibrosi
 - **Sarcoma mieloide**
 - **Proliferacions mieloides relacionades amb Síndrome de Down**
 - Mielopoesi anormal transitòria
 - Leucèmia mieloide associada a la Síndrome de Down
 - **Neoplàsies de cèl·lules dendrítiques plasmacitoides blàstiques**
-

2.2. Síndromes mielodisplàstiques

2.2.1. Introducció i epidemiologia

Les SMD són un grup heterogeni de malalties clonals que afecten a les cèl·lules mare hematopoètiques i es caracteritzen per la presència d'una o més citopènies (disminució del número de cèl·lules circulants per SP)^a, displàsia d'una o més línies mieloides, hematopoesi ineficaç i un risc elevat d'evolució a LMA^{6,7}. A més, presenten un grau elevat d'apoptosi, fet que contribueix al desenvolupament de citopènies. No obstant, valors per sobre dels punts de tall definits per citopènies no són excloents del diagnòstic de SMD sempre i quan es trobin trets morfològics displàstics o alteracions citogenètiques⁸.

La progressió a LMA és el curs natural en moltes SMD, tot i això, el percentatge de pacients que evoluciona varia substancialment entre els diferents subtipus de SMD (punt 2.2.3); aquells subtipus amb percentatge elevat de blastes tindran un risc de progressió a LMA superior^{9,10}.

Tant en les SMD com en la LMA s'observa una reducció en la producció de cèl·lules normals. En la SMD, la reducció pot afectar una, dos o tres línies mieloides, derivant-se en una o més citopènies. Tot i això, en formes més evolucionades de SMD es poden observar afectació d'altres línies no implicades en un inici. Tant la proliferació com la diferenciació cel·lular hematopoètica es veuen afectades. Per altra banda, en la LMA es produeix reducció de les tres línies mieloides principals (eritròcits, granulòcits i plaquetes), en que hi ha un augment de la proliferació de les cèl·lules immadures amb afectació de la diferenciació que es tradueix amb citopènies severes. Les dos característiques que es perden en la progressió de SMD a LMA són l'apoptosi i la diferenciació¹¹. La Figura 6 mostra en un esquema com es veu afectada l'hematopoesi en les SMD i en la posterior evolució a LMA.

^a Hemoglobina <10g/dL, neutròfils absoluts <1.8x10⁹/L i plaquetes <100x10⁹/L^{35,36}.

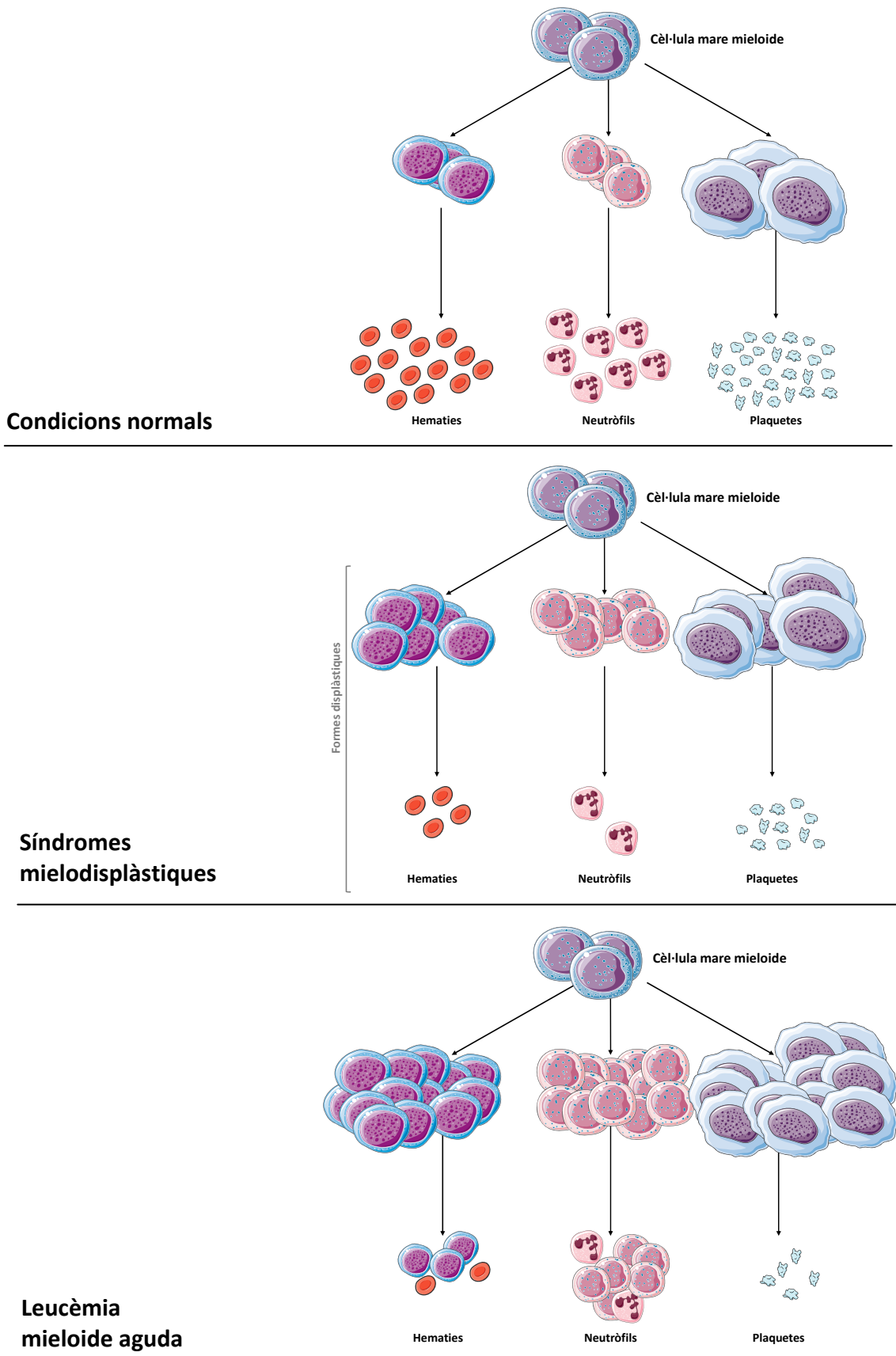


Figura 6. Hematopoesi en condicions normals, afectació (d'una o més línies) en les SMD i en l'evolució a LMA

Les SMD són unes de les neoplàsies hematològiques més freqüents en la població d'edat avançada, amb una mediana d'edat de presentació de 70 anys¹². Estudis europeus estimen la incidència anual en 1,8 casos per cada 100.00¹³.

Les SMD es poden classificar des de dos punts de vista, segons la seva etiologia i segons les alteracions citològiques de MO i SP (morfologia). Segons la seva **etiologia** es distingeixen dos tipus:

- 1- Primaris o de novo. Es defineix com el desenvolupament d'una SMD sense història coneguda d'exposició a la quimioteràpia o radioteràpia.
- 2- Secundaris a substàncies mutagèniques conegudes (pacients que han rebut quimioteràpia i/o radioteràpia per altres malalties).

La classificació segons **morfologia** es descriu en el punt 2.2.3.

2.2.2. Característiques clíniques

Els pacients amb SMD acostumen a presentar símptomes conseqüència de l'hematopoesi ineficient. Els principals símptomes són: infeccions recurrents, sagnats, hematomes espontanis, fatiga progressiva i astènia, així com dispnea davant d'un esforç. Ocasionalment, els pacients poden presentar recomptes sanguinis alterats: neutropènia, anèmia, trombopènia o una combinació de les tres; sense necessitat de presentar símptomes. Cal destacar que els sagnats poden presentar-se en pacients no trombopènic, conseqüència de plaquetes no funcionals.

Resultant de l'hematopoesi ineficient, els pacients diagnosticats de SMD poden desenvolupar un fracàs progressiu de la MO o un curs clínic caracteritzat per la progressió de la SMD a LMA.

2.2.3. Diagnòstic

El diagnòstic de les SMD requereix el diagnòstic integrat entre diferents disciplines. Per tal de portar-ho a terme és imprescindible recollir i integrar les dades clíniques (anamnesi i exploració clínica completa), les dades de laboratori (hemograma complet), dades morfològiques (estudi citològic a SP i a MO) i, per últim, els estudis genètics (es comentaran més àmpliament en el punt 3).

A més, el diagnòstic de les SMD sempre requereix posar en marxa un ampli procediment per tal d'excloure altres causes de citopènia i displàsia transitòria. Així mateix, és important tenir present que mielodislàsia^b no és sinònim de SMD.

L'any 2012, el Grup Espanyol de SMD va desenvolupar unes guies de recomanació pel diagnòstic i tractament de les SMD¹⁴. En aquestes guies s'han determinat els estudis imprescindibles (en SP i MO) pel correcte diagnòstic de les SMD.

1) Sang perifèrica:

- a) **Hemograma complet** que inclogui recompte absolut de leucòcits, neutròfils, eosinòfils, basòfils, monòcits i plaquetes, hemoglobina, hematòcrit, volum corpuscular mig, hemoglobina corpuscular mitja (HCM), concentració d'HCM, ample de distribució eritrocitària i recompte de reticulòcits.
- b) **Frotis** (sense anticoagulant) tenyit amb *May-Grünwald-Giemsa*:
 - Recompte percentual diferencial (200 leucòcits)
 - Valoració de trets de mielodislàsia per cadascuna de les sèries mieloides (diseritropoesi, disgranulopoesi i distrombopoesi).

2) Medul·la òssia:

- a) **Aspirat medul·lar** per a estudi morfològic i genètic:
 - Estudi morfològic
 - i. Tinció de *May-Grünwald-Giemsa*. Comptatge de 500 cèl·lules nucleades. Valoració de la proporció de blastes i el percentatge de displàsia en cadascuna de les sèries mieloides (megacariocítica, eritroide i granulocítica). Es considera que una línia és displàstica quan el 10% o més dels seus elements són dismòrfics.
 - ii. Tinció de *Perls*. Valoració dels dipòsits de ferro medul·lar i així poder realitzar el comptatge percentual de sideroblastes^c. Els sideroblastes en

^b**Mielodislàsia** es defineix com un conjunt d'alteracions que incideixen en les diferents línies cel·lulars de la mielopoesi, des de cèl·lules mare fins a elements més madurs. La mielodislàsia és un fenomen que acompanya a múltiples processos extrahematològics i hematològics i en les **síndromes mielodislàstiques** és on adquireix el seu màxim grau d'expressivitat.

^c**Sideroblast**: eritroblast amb grànuls sideròtics (dipòsits anòmals de ferro en la mitocondria).

anell són aquells que presenten cinc o més grànuls en disposició perinuclear (ocupant 1/3 o més del contorn nuclear).

- Estudi citogenètic

L'estudi que es porta a terme és el cariotip de bandes G (tècnica de citogenètica convencional, CC). Com a mínim s'avaluen 20 metafases, tot i que l'anàlisi d'una xifra inferior es considera informativa si es detecta una anomalia de caràcter clonal^d. És imprescindible i necessari portar-ho a terme pel correcte diagnòstic i estratificació pronòstica (punt 2.2.5).

La tècnica de CC es pot veure complementada amb altres tècniques genètiques tals com la hibridació *in situ* fluorescent, FISH (punt 3.2) o tècniques de *microarrays* genòmics (punt 3.3).

- b) **Biòpsia de MO** en casos en que l'aspirat de MO sigui hipoplàsic, hi hagi sospita de mielofibrosi o en citopènies idiopàtiques de significat incert^e.

Actualment, el diagnòstic es fa seguint els criteris definits per la classificació OMS 2008⁶. No obstant, la primera classificació morfològica de les SMD va sorgir l'any 1982 fruit de la cooperació entre grups de treball de França, Estats Units i Gran Bretanya. Aquesta classificació va rebre el nom de classificació FAB (*French-American-British*)⁷. L'any 2001, la OMS va elaborar una nova classificació per les SMD que, posteriorment, es va veure actualitzada l'any 2008.

2.2.3.1. Classificació FAB

L'any 1982, el grup Cooperatiu Francès-Americà-Britànic (FAB)⁷ va definir la primera classificació per les SMD amb cinc subcategories. La Taula 3 mostra les principals característiques morfològiques.

^d **Alteració de caràcter clonal:** dues cèl·lules amb la mateixa alteració en cas de guany o alteració estructural, o tres cèl·lules en cas de pèrdua.

^e **Citopènia idiopàtica de significat incert:** citopènia persistent (més de 6 mesos) en una o més línies mieloides amb exclusió de SMD i altres causes de citopènia¹⁴¹.

Taula 3. Classificació de les SMD segons la classificació FAB⁷

Subtipus	Blastes en SP (%)	Blastes en MO (%)	Monòcits a SP	Sideroblastes en anell a MO (%)
AR	<1	<5	<1x10 ⁹ /L	<15
ARSA	<1	<5 Sense bastons d'Auer ^f	<1x10 ⁹ /L	>15
AREB	<5	5-19 Sense bastons d'Auer	<1x10 ⁹ /L	Indiferent
AREB-T	>5	20-29 Sense bastons d'Auer	<1x10 ⁹ /L	Indiferent
LMMC	<5	0-20	>1x10 ⁹ /L	Indiferent

MD: <13x10⁹ leucòcits/L
MP: >13x10⁹ leucòcits/L

Abreviatures: AR: anèmia refractària; AREB: anèmia refractària amb excés de blastes; AREB-T: anèmia refractària amb excés de blastes en transformació; ARSA: anèmia refractària amb sideroblastes en anell; LMMC: leucèmia mielomonocítica crònica; MD: variant mielodisplàstica; MO: medul·la òssia; MP: variant mieloproliferativa; SP: sang perifèrica.

2.2.3.2. Classificació OMS

L'any 2001, amb l'objectiu de millorar el valor pronòstic i rellevància clínica de la classificació FAB, es va desenvolupar la classificació OMS de les SMD (Taula 4). Aquesta classificació es basa en la combinació de les dades morfològiques i genètiques pel diagnòstic final de les SMD. A continuació es mostren els principals canvis respecte a la classificació FAB:

- 1) Eliminació del subtipus anèmia refractària amb excés de blastes en transformació (AREB-T). Aquells casos que presenten un 20% o més de blastes en MO són diagnosticats de LMA.
- 2) Es considera LMA a les SMD amb t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13.1q22), t(16;16)(p13.1;q22), t(15;17)(q22;q12) o anomalies a 11q23 (gen *MLL*).
- 3) Per l'anèmia refractària (AR) i l'anèmia refractària amb sideroblastes en anell (ARSA) és necessari que la displàsia sigui únicament en la sèrie vermella.

^f**Bastons d'Auer:** Cossos d'inclusió que es creen per la fusió de grànuls primaris patològics. Solen trobar-se en cèl·lules blàstiques d'algunes LMA. En la classificació FAB, la seva presència és diagnòstica de LMA independentment de la xifra de blastes.

- 4) Es defineix un nou subtipus de SMD: la citopènia refractària amb displàsia multilínia (CRDM). Estudis previs havien mostrat l'impacte pronòstic de la displàsia multilínia^{15,16}.
- 5) L'entitat anèmia refractària amb excés de blastes (AREB) es subdivideix en dos grups: AREB tipus 1 (5-9% de blastes en MO i menys de 5% a la SP) i AREB tipus 2 (10-19% de blastes en MO o 5-19% de blastes en SP tot i que menys de 10% en MO).
- 6) La LMMC deixa de ser una entitat de les SMD per formar part del grup de síndromes mielodisplàstiques/síndromes mieloproliferatives cròniques.
- 7) Individualitza la "Síndrome 5q-" com una entitat única.
- 8) La presència de bastons d'Auer és diagnòstic d'AREB-2.

Taula 4. Classificació de les SMD segons la classificació OMS 2001¹⁷

Subtipus	Citopènies	% blastes en SP	% blastes en MO	Sideroblastes en anell a MO (%)	Displàsia
AR	Anèmia	<1	<5	<15	Eritroide
ARSA	Anèmia	0	<5	≥15	Eritroide
CRDM	Bi o pancitopènia	<1	<5	<15	Mínim dues línies
CRDM-SA	Bi o pancitopènia	<1	<5	≥15	Mínim dues línies
AREB-1	Citopènies	<5	5-9	Indiferent	Indiferent
AREB-2	Citopènies	5-19	10-19	Indiferent	Indiferent
"Síndrome 5q-"	Anèmia	<5	<5	Indiferent	Indiferent
SMD inclassificable	Citopènies	<1	<5	Indiferent	Una línia

Abreviatures: AR: anèmia refractària; AREB: anèmia refractària amb excés de blastes; ARSA: anèmia refractària amb sideroblastes en anell; CRDM: citopènia refractària amb displàsia multilínia; CRDM-SA: citopènia refractària amb displàsia multilínia i sideroblastes en anell; MO: medul·la òssia; SP: sang perifèrica.

La classificació de la OMS va suposar un gran avenç en el diagnòstic i estadiatge de les SMD. L'any 2006 Germing i cols.¹⁰ van publicar una validació en 1095 pacients de la classificació OMS del 2001 en la que demostraven diferent mediana de supervivència

global (SG) i risc d'evolució a LMA. La Figura 7 mostra el valor pronòstic relatiu per les diferent categories OMS, tant en termes de SG (Figura 7A) com d'evolució a LAM (Figura 7B). Per portar a terme l'anàlisi, es van agrupar de la següent forma: AR/ARSA/"Síndrome 5q-" vs. CRDM/CRDM-SA vs. AREB-1 vs. AREB-2. L'anàlisi multivariant va mostrar que els paràmetres predictors de SG i d'evolució a LMA eren el cariotip i els subtipus OMS 2001. Aquestes dades mostren el gran valor pronòstic de la displàsia multilínia i el recompte de blastes, dos dels paràmetres més distintius de la classificació OMS respecte la classificació FAB.

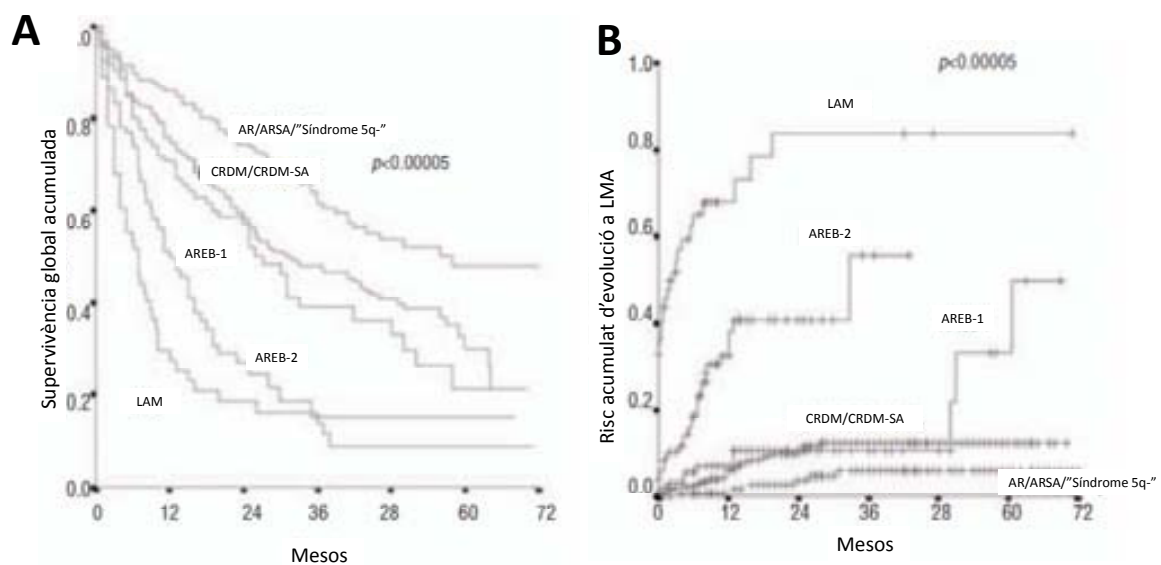


Figura 7. Valor pronòstic de les categories OMS 2001 en les SMD. **A.** Corbes Kaplan-Meier per supervivència global. **B.** Corbes Kaplan-Meier de risc d'evolució a LMA. Imatge extreta de Germing i cols., 2006¹⁰

Abreviatures: AR: anèmia refractària; AREB: anèmia refractària amb excés de blastes; ARSA: anèmia refractària amb sideroblastes en anell; CRDM: citopènia refractària amb displàsia multilínia; CRDM-SA: citopènia refractària amb displàsia multilínia i sideroblastes en anell; LMA: leucèmia mieloide aguda.

L'any 2008 es va portar a terme una revisió de la classificació de la OMS en que es van introduir els següents canvis¹⁸:

- 1) Els pacients amb citopènies refractàries sospitoses de tenir una SMD però sense trets morfològics es poden considerar SMD si presenten alteracions citogenètiques específiques de SMD[§].

[§] **Alteracions no equilibrades:** -7/7q-, -5/5q-, i(17q) o t(17p), -13/13q-, 11q-, 12p- o t(12p), del(9q) i idic(X)(q13). La presència de +8, del(20q) o -Y, com a única alteració, no es pot considerar evidència de SMD (no són específiques de les SMD). **Alteracions equilibrades:** t(11;16)(q23;p13.3), t(3;21)(q26.2;q22.1), t(1;3)(p36.3;q21.2), t(2;11)(p21;q23); inv(3)(q21q26.2) i t(6;9)(p23;q34).

- 2) S'introdueix una nova categoria de SMD: citopènia refractària amb displàsia unilínia (CRDU). Són pacients que tenen displàsia unilínia associada amb AR (displàsia eritroide unilínia), neutropènia refractària (disgranulopoesi unilínia) o trombocitopènia unilínia (dismegacariopoesi unilínia), i que tinguin menys de 2% blastes en SP i de 5% en el MO.
- 3) La categoria de CRDM no es divideix en si presenten o no $\geq 15\%$ de sideroblastes en anell. La categoria de CRDM-SA s'incorpora dins la categoria de CRDM.
- 4) Els pacients que tenen 2-4% de blastes en SP i menys de 5% de blastes en la MO són diagnosticats d'AREB-1 si presenten signes clínics i de laboratori suggestius de SMD.
- 5) Es defineix l'entitat provisional de citopènia refractària de la infància. Inclou infants amb citopènies i menys de 2% de blastes en la SP i menys de 5% en el MO junt amb evidència de displàsia en una o més línies. Aquells nens amb 2-19% de blastes en la SP i/o 5-19% en el MO, la subclassificació de SMD es fa seguint el mateix criteri que pels adults.
- 6) Restringeix la definició de "Síndrome 5q-" als pacients amb un quadre clínic concret. Es crea una categoria de SMD amb deleció 5q aïllada més àmplia.

D'aquesta forma, es defineixen sis subtipus diferents de SMD en l'adult. A continuació, es detallen les principals característiques de cadascuna de les entitats definides per la classificació OMS 2008⁶.

1) Citopènia refractària amb displàsia unilínia (CRDU)

La CRDU suposa el 10-20% de totes les SMD. Aquesta entitat engloba aquelles SMD que tenen una citopènia refractària amb displàsia unilínia. També pot incloure bicitopènies refractàries sempre i quan només hi hagi displàsia d'una de les línies. Normalment, el tipus de citopènia correspon amb la línia displàstica afectada, no obstant, en ocasions, pot haver-hi discordança⁸. El recompte de blastes sempre serà inferior a l'1% en SP i al 5% en la MO. Dins d'aquesta entitat se'n distingeixen tres subgrups:

- a) Anèmia refractària (AR). Els precursors eritroides a la MO varien en nombre i morfologia (des de disertitropoesi lleu a moderada), com a mínim es detecta un

10% de precursors eritroides displàstics, cal contar-ne 200. És el subtipus més freqüent de CRDU.

- b) Neutropènia refractària (NR). El 10% o més dels neutròfils a SP i MO són displàstics, cal contar-ne 200.
- c) Trombocitopènia refractària (TR). Es caracteritza per la presència de com a mínim un 10% de megacariòcits displàstics (avaluació de com a mínim 30 megacariòcits). Els megacariòcits poden estar augmentats o disminuïts en nombre absolut.

L'AR es considera una SMD de bon pronòstic, amb una mediana de SG de 66 mesos. La taxa d'evolució a LMA als 5 anys és del voltant del 2%¹⁰. Estudis posteriors de validació van mostrar que no hi ha diferències pronòstiques entre l'AR, la NR i la TR (mediana de SG: 64 mesos i probabilitat d'evolució a LMA als 5 anys del 8%). Els tres subgrups definits no son justificables ja que no hi ha diferències de pronòstic i no necessàriament correspon amb el tipus de citopènia en SP¹⁹.

2) Anèmia refractària amb sideroblastes en anell (ARSA)

L'ARSA suposa el 3-11% de les SMD. Es caracteritza per la presència d'anèmia i de displàsia en la línia eritroide, concretament, per la presència de sideroblastes en anell en una proporció igual o superior al 15% en la MO. Les altres línies mieloides no presenten displàsia significant i el percentatge de blastes en MO sempre serà inferior al 5%.

La mitjana de supervivència de l'ARSA oscil·la entre els 69 i 108 mesos i només entre l'1 i el 2% de pacients evolucionen a LMA¹⁰. La validació de la classificació ha corroborat aquests resultats en 219 pacients amb diagnòstic de ARSA, en que s'ha observat mediana de SG de 63 mesos i probabilitat d'evolució a LMA del 4,2% als 5 anys¹⁹.

3) Citopènia refractària amb displàsia multilínia (CRDM)

La CRDM es caracteritza per la presència d'una o més citopènies i canvis displàstics en dos o més línies mieloides (eritroide, granulocítica i/o megacariocítica). Al igual que en la CRDU, el llindar per la displàsia és $\geq 10\%$. La proporció de blastes és inferior a l'1% en la SP i al 5% en la MO.

El curs clínic és variable, el pronòstic dels pacients amb CRDM està directament relacionat amb el grau de citopènia i displàsia. La mediana de SG reportada es situa al voltant dels 30 mesos i la probabilitat d'evolució a LMA als dos anys és del 10%¹⁰. La validació de la classificació en 1280 pacients va justificar la inclusió de la CRDM-SA dins de la categoria de CRDM (mediana de SG: 32 i 36 mesos, respectivament), a més, va mostrar com la categoria de CRDM tenia una mediana de SG de 36 mesos i probabilitat d'evolució a LMA del 16,8% als 5 anys¹⁹.

4) Anèmia refractària amb excés de blastes (AREB)

L'AREB es defineix per la presència de 5-19% de blastes en la MO o 2-19% en la SP. La displàsia de les tres línies mieloides és freqüent tot i que el grau de displàsia és variable. Donades les diferències en SG i incidència d'evolució a LMA, s'han distingit dos subtipus. La principal diferència recau en el percentatge de blastes presents en SP i/o MO:

- a) Anèmia refractària amb excés de blastes tipus 1 (AREB-1), definit per la presència de 5-9% de blastes en la MO i 2-4% en SP.
- b) Anèmia refractària amb excés de blastes tipus 2 (AREB-2), definit per la presència de 10-19% de blastes en la MO i 5-19% en SP. La presència de bastons d'Auer classifica el cas en aquesta categoria independentment del percentatge total de blastes.

Donat l'alt percentatge de blastes, la probabilitat d'evolució a LMA és superior a la resta de SMD. D'aquesta forma, es calcula que al voltant del 25% de casos d'AREB-1 evolucionen a LMA. Aquest percentatge es veu augmentat en les SMD tipus AREB-2, amb un major percentatge de blastes, situant-se en el 33% dels casos. Com és d'esperar, la mediana de SG també és menor, aproximadament 16 mesos per AREB-1 i 9 mesos per AREB-2²⁰.

5) Síndrome mielodisplàstica amb deleció 5q aïllada

La SMD amb deleció 5q aïllada es caracteritza per la presència de la deleció 5q com a única alteració citogenètica (o acompanyat de pèrdua del cromosoma Y) i sol cursar amb anèmia amb o sense altres citopènies i/o trombocitosis. El percentatge de blastes

ha de ser inferior al 5% en la MO i a l'1% en la SP i sense bastons d'Auer. Correspon a l'entitat definida per la classificació OMS 2001 com a "Síndrome 5q-".

Morfològicament es caracteritza per l'increment del nombre de megacariòcits. En quant a la mida són normals o més aviat petits, no lobulats o amb nucli hipolobulat. La displàsia en les línies eritroide i granulopoètica són infreqüents.

Dins d'aquest subtipus de SMD s'ha definit una síndrome clínica que rep el nom de "Síndrome 5q-". En la classificació OMS 2008 s'ha restringit l'ús d'aquest nom per a definir un subgrup de casos amb els següents signes: anèmia macrocítica, plaquetes normals o elevades i hipoplàsia eritroide en la MO²¹.

És una de les SMD amb millor pronòstic, s'associa a una mediana de supervivència de 66 mesos i la transformació a LMA es calcula inferior al 20%²². La validació en 136 pacients elaborada per Maarsen i cols. (2013) mostra el bon pronòstic d'aquesta entitat establint la mediana de SG en 91 mesos i la probabilitat d'evolució a LMA en el 13,7%¹⁹.

6) Síndrome mielodisplàstica inclassificable (SMD-I)

La SMD-I és un subtipus de SMD que manca de criteris per a la seva correcta classificació en qualsevol de les entitats anteriorment mencionades. Hi ha tres situacions que porten a la classificació d'una SMD com inclassificable:

- a) Pacients amb trets propis de CRDU o CRDM però amb 1% de blastes en SP.
- b) Casos amb displàsia unilínia però associats a pancitopènia.
- c) Pacients amb citopènies persistents (més de 6 mesos), amb $\leq 1\%$ de blastes en SP i $< 5\%$ en la MO però amb displàsia evident en menys del 10% de les cèl·lules en una o més línies mieloides i amb alteracions citogenètiques evidents de SMD. Aquest tipus de pacients han de ser seguits amb cura per la possible evolució a subtipus més específic de SMD.

El pronòstic d'aquest tipus de SMD s'ha definit en la posterior validació de la classificació per part de Maassen i cols. (2013). En els casos amb displàsia unilínia o multilínia amb 1% de blastes en SP, la mediana de SG era de 35 mesos i la probabilitat d'evolució a LMA als 5 anys del 13,9%. En els casos amb displàsia unilínia associada a pancitopènia, mediana de SG de 30 mesos i evolució a LMA del 17,6% als 5 anys. En

aquest estudi de validació suggereixen l'eliminació de la categoria SMD-I ja que és possible relocalitzar aquests pacients en la categoria de CRDM¹⁹.

En la Taula 5 es resumeixen les principals característiques de les SMD segons la classificació OMS 2008⁶.

Taula 5. Classificació de les SMD segons la classificació OMS 2008⁶

Subtipus	Citopènies	% blastes en SP	% blastes en MO	Sideroblastes en anell a MO (%)	Displàsia
CRDU	Una o dos	<1	<5	<15	Una línia
ARSA	Anèmia	0	<5	≥15	Eritroide
CRDM	Citopènia/es	<1 No bastons d'Auer <1x10 ⁹ /L monòcits	<5 No bastons d'Auer	<15 o ≥15	Mínim dues línies
AREB-1	Citopènia/es	<5 No bastons d'Auer <1x10 ⁹ /L monòcits	5-9 No bastons d'Auer	Indiferent	Indiferent
AREB-2	Citopènia/es	5-19 +/- bastons d'Auer <1x10 ⁹ /L monòcits	10-19 +/- bastons d'Auer	Indiferent	Indiferent
SMD amb del(5q) aïllada	Anèmia	<1 No bastons d'Auer	<5 No bastons d'Auer	Indiferent	Megacariòcits amb nucli hipolobulat
SMD-I	Citopènies	≤1	<5		<10% en més d'una línia més alteració citogenètica

Abreviatures: AR: anèmia refractària; AREB: anèmia refractària amb excés de blastes; ARSA: anèmia refractària amb sideroblastes amb anell; CRDM: citopènia refractària amb displàsia multilínia; MO: medul·la òssia; SMD-I: síndrome mielodisplàstica inclassificable; SP: sang perifèrica.

2.2.4. Alteracions citogenètiques en les SMD

Al voltant del 50% de les SMD *de novo* presenten alteracions citogenètiques en el moment del diagnòstic²³. Aquest percentatge pot augmentar fins el 85-90% en el cas de SMD secundàries a substàncies mutagèniques²⁴.

A diferència de les LMA, les translocacions i inversions són alteracions rares en les SMD. Les alteracions més freqüents són les que impliquen guany o pèrdua de material cromosòmic. D'aquesta forma, és més freqüent observar delecions o monosomies, seguides de trisomies totals o parcials. Tenint en compte aquesta informació podríem assumir que un dels principals mecanismes moleculars implicats en el desenvolupament d'una SMD pot ser la pèrdua o inactivació d'un gen supressor de tumors.

En el punt 4.1 es discutiran els diferents estudis que s'han portat a terme per determinar la incidència i impacte pronòstic de les alteracions citogenètiques. No obstant, cal destacar dos estudis, un d'ells portat a terme a l'Estat Espanyol, amb vora 1000 SMD primàries²⁵; i l'altre, portat a terme pel Grup Alemany-Austríac, amb més de 2000 pacients²⁶. Aquests dos grans estudis han pogut definir la incidència de cadascuna de les alteracions citogenètiques en les SMD. D'aquesta forma, les alteracions més freqüents són: la deleción d'una part del braç llarg del cromosoma 5 (del(5q) o 5q-, ≈30%), monosomia total o parcial del cromosoma 7 (-7/del(7q) o 7q-, ≈20%), trisomia del cromosoma 8 (≈15%), pèrdua d'una part del braç llarg del cromosoma 20 (del(20q) o 20q-, ≈10%) i pèrdua del cromosoma sexual masculí (-Y, ≈6%). Cal dir que la incidència d'aquesta última alteració és controvertida ja que s'ha observat que els homes poden perdre el cromosoma Y conseqüència de l'edat²⁷. A la Figura 8 es mostra la incidència d'alteracions citogenètiques en les SMD en l'estudi de Haase i cols. (2007)²⁶.

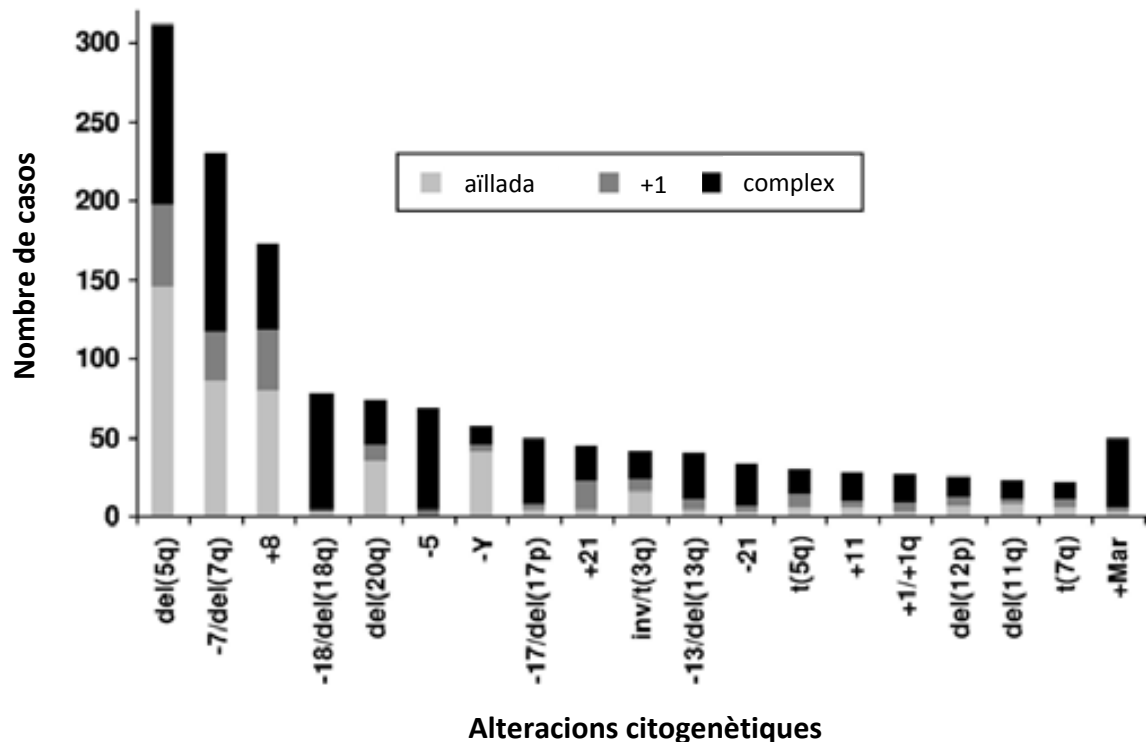


Figura 8. Incidència d'alteracions citogenètiques en les SMD (Adaptació de Haase i cols., 2007²⁶)

La presència de cariotips complexesh es troba en un percentatge important en les SMD, aproximadament un 13%. A més, cal destacar que hi ha una sèrie d'alteracions no recurrents presents en menys de l'1% de casos, en les quals és molt difícil la determinació del seu impacte pronòstic. Aquestes alteracions són, entre d'altres, der(1;7), +1q, -1/1p-, t(5q), +11, t(11q23), -13/13q-, del(16q), del(17p), +21, -21 i -X²⁸.

En l'apartat 2.2.3.2 hem tractat la classificació morfològica de les SMD segons la OMS. Cadascun dels subtipus de SMD acostuma a portar associades una sèrie d'alteracions citogenètiques que es descriuen en la Taula 6. A més, algunes alteracions citogenètiques es troben associades a alteracions morfològiques específiques: la deleció 5q es pot trobar associada a megacariòcits mono o hipolobulats, la deleció de 17p amb neutròfils hiposegmentats tipus Pelger-Hüet i neutròfils petits vacuolats, la deleció 20q amb implicació de cèl·lules eritroides i megacariòcits, i alteracions en el cromosoma 3 (inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2)) amb augments de megacariòcits

^hs'entén com a **cariotip complex** la presència de 3 o més alteracions citogenètiques (pertanyents a una mateixa clona o a independents).

anòmals. A mida que s'adquireixen formes més evolucionades de les SMD, augmenta el percentatge d'alteracions citogenètiques.

Taula 6. Associació d'alteracions citogenètiques amb subtipus de SMD²³

Subtipus de SMD	Freqüència	Alteracions cromosòmiques (ordenades per freqüència)
AR	≈25-30%	-7/del(7q), del(5q), cariotip complex
ARSA	≈10%	+8
CRDM	≈50%	-7/del(7q), cariotip complex, del(5q), +8
AREB-1	≈50%	del(5q), cariotip complex, -7/del(7q), +8, del(20q)
AREB-2	≈55%	Cariotip complex, +8, del(5q), -7/del(7q), del(20q)
SMD amb del(5q) aïllada	100%	del(5q)

Abreviatures: AR: anèmia refractària; AREB: anèmia refractària amb excés de blastes; ARSA: anèmia refractària amb sideroblastes amb anell; CRDM: citopènia refractària amb displàsia multilínia; SMD: síndrome mielodisplàstica.

L'impacte pronòstic de cadascuna de les alteracions citogenètiques es discuteix en el punt 2.2.5.

A continuació es descriu l'alteració citogenètica més freqüent en les SMD i objecte d'estudi en aquesta tesi.

2.2.4.1. La deleció 5q

La deleció 5q és la pèrdua d'una part variable del braç llarg del cromosoma 5. Normalment, es tracta d'una deleció intersticial, és a dir, que no implica els telòmers. És una de les alteracions citogenètiques més freqüents, es troba en el 30% dels pacients amb alteracions citogenètiques clonals. En la meitat d'aquests es troba com a única alteració però també es pot trobar associada a una altra alteració cromosòmica (5%) o formant part d'un cariotip complex (≈10%)²⁶.

La Figura 9 mostra la implicació de la deleció de 5q en les SMD, alteració no específica de l'entitat de la OMS del 2008⁶ "SMD amb deleció 5q aïllada".

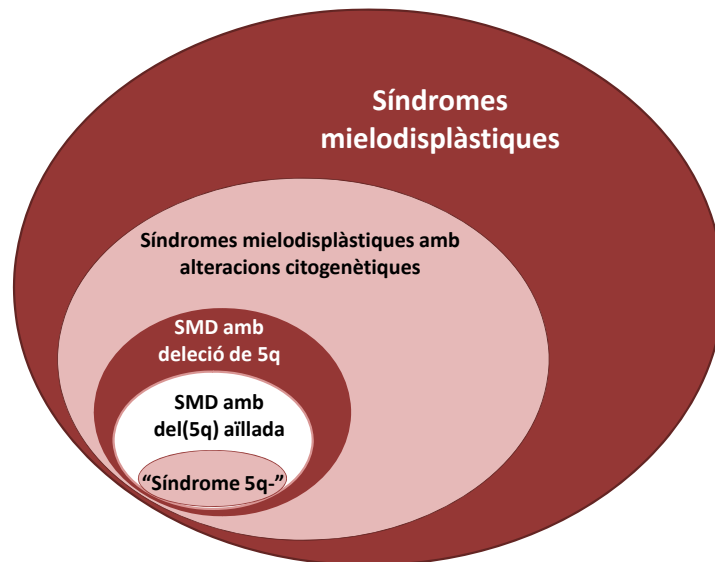


Figura 9. Diagrama que mostra la incidència i rellevància diagnòstica de la deleció de 5q en les SMD (classificació OMS del 2008)

La majoria de SMD amb deleció de 5q presenten deleccions llargues, no obstant, alguns pacients presenten deleccions més petites que han permès la determinació de regions comunes delecionades (RCD)²⁹. La Figura 10 mostra les dos RCD definides en la deleció:

- **RCD 1:** 5q32-33, característica de la "Síndrome 5q-".
- **RCD 2:** 5q31, característica de la resta de SMD i de LMA.

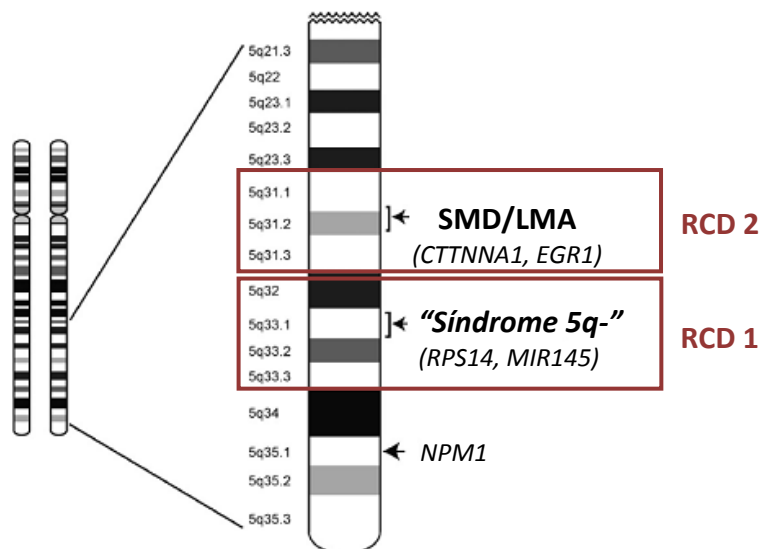


Figura 10. Esquema de les dos RCDs en el cromosoma 5 i els gens clau (Adaptació d'Ebert, 2011²⁹)

Abreviatures: LMA: leucèmia mieloide aguda; SMD: síndrome mielodisplàstica.

La RCD que més s'ha estudiat és la més distal, corresponent a la "Síndrome 5q-" i que conté al voltant de 40 gens³⁰. Per determinar quin és el gen responsable del fenotip es va avaluar l'efecte de la disminució de l'expressió de diferents gens ubicats a 5q32-33. La tècnica que es va utilitzar és la d'ARN d'interferència, a l'inhibir el gen *RPS14* es va observar el bloqueig de la diferenciació eritroide. L'expressió de *RPS14* en SMD amb delecio de 5q és del 50% de l'expressió en SMD no del(5q), el que porta a pensar que el mecanisme d'acció és l'haploinsuficiència³¹. La disminució d'expressió de *RPS14* produeix augment dels nivells totals de p53, el que condueix a que els gens diana de p53 implicats en la parada del cicle cel·lular es vegin afectats³².

També s'han identificat dos microRNAs implicats en el fenotip de la "Síndrome 5q-": miR-145 (localitzat en la RCD1) i miR-146a (localitzat a 5q34). El *knockdown* d'aquests dos gens resulta en trombocitosi, neutropènia moderada i displàsia megacariocítica en un model murí³³.

Un altre gen important en les neoplàsies mieloides és *NPM1*, aquest gen es troba delecionat en casos en que la delecio de 5q és llarga i s'associa a un fenotip més agressiu³⁴.

No tots els pacients amb delecio de 5q compleixen les característiques definides en la "Síndrome 5q-", fet que fa pensar que hi ha altres alteracions que poden contribuir en el fenotip de les SMD amb delecio de 5q, tals com: alteracions citogenètiques acompanyants, mutacions en gens individuals o alteracions epigenètiques.

2.2.5. Índexs pronòstics

Les SMD són un grup heterogeni de malalties clonals que presenten una gran variabilitat pronòstica, tant en termes de SG com d'evolució a LMA. Per tant, és de gran importància intentar predir de forma precisa i individualitzada el pronòstic d'un pacient per poder adaptar-ne el tractament el màxim possible.

L'any 1997 es va publicar l'índex pronòstic que s'ha estat utilitzant fins a l'actualitat en la pràctica clínica diària de les SMD, l'***International Prognostic Scoring System (IPSS)***^{35,36}. Aquest índex es va dur a terme a partir de més de 800 pacients i tenia en compte tres variables que han demostrat tenir pes pronòstic en supervivència i

ⁱ**Haploinsuficiència:** estat en el que només es té una còpia funcional del gen, la qual no produeix suficient producte gènic per donar lloc a un fenotip normal, per tant, condueix a un fenotip aberrant.

evolució a LMA: percentatge de blastes a MO, el cariotip i les citopènies^j. A la seva vegada el cariotip es subdivideix en tres categories en funció de les alteracions citogenètiques: pronòstic bo, intermedi o dolent. Tenint en compte aquestes tres variables s'assigna una puntuació que estratifica els pacients en quatre grups pronòstics diferents (Taula 7), amb diferències estadísticament significatives en termes de SG i evolució a LMA:

- **Baix:** 0 punts. Mediana de SG: 5,7 anys. Evolució a LMA del 25% dels pacients: 9,4 mesos.
- **Intermedi-1:** 0,5-1 punts. Mediana de SG: 3,5 anys. Evolució a LMA del 25% dels pacients: 3,3 mesos.
- **Intermedi-2:** 1,5-2 punts. Mediana de SG: 1,2 anys. Evolució a LMA del 25% dels pacients: 1,1 mesos.
- **Alt:** 2,5-3,5. Mediana de SG: 0,4 anys. Evolució a LMA del 25% dels pacients: 0,2 mesos.

Taula 7. Índex pronòstic internacional (IPSS)^{35,36}

Variables pronòstiques	0 punts	0,5 punts	1 punt	1,5 punts	2 punts
Blastes en MO	<5%	5-10%	-	11-20%	21-30%
Cariotip*	Bo	Intermedi	Dolent	-	-
Citopènies	0-1	2-3	-	-	-

***Cariotip:** **Bo:** normal, -Y, del(5q), del(20q) (com a única alteració); **Dolent:** complex (≥ 3 alteracions) o anomalies del cromosoma 7; **Intermedi:** altres alteracions úniques o dobles

Abreviatures: MO: medul·la òssia.

No obstant l'IPSS presenta importants limitacions: l'aplicació de la classificació FAB quan la classificació vigent és la de la OMS, prop del 30% de les SMD no presenten estudi citogenètic, el cariotip de pronòstic intermedi és un calaix de sastre que conté alteracions citogenètiques heterogènies, així com el pes excessiu dels blastes en relació amb el cariotip³⁷. Tenint en compte part d'aquestes limitacions, l'any 2007, es

^jHemoglobina <10g/dL, neutròfils absoluts <1.8x10⁹/L i plaquetes <100x10⁹/L^{35,36}.

va desenvolupar el **WHO classification-based prognostic scoring system (WPSS)**³⁸. Aquest índex pronòstic es va desenvolupar inicialment amb més de 400 pacients i, posteriorment, es va validar amb més de 700. Les variables pronòstiques que té en compte són: la classificació de la OMS 2001, la dependència transfusional i les categories de risc citogenètiques proposades per l'IPSS (Taula 8). D'aquesta forma es defineixen cinc grups de risc: molt baix (0 punts), baix (1 punt), intermedi (2 punts), alt (3-4 punts), molt alt (5-6 punts). Tot i que s'ha demostrat el seu valor pronòstic, no s'ha generalitzat l'ús de l'WPSS per la subjectivitat en la valoració de la displàsia morfològica i en els diferents criteris per iniciar suport transfusional.

Taula 8. Índex pronòstic basat en la classificació de la OMS 2001 (WPSS)³⁸

Variable pronòstica	0 punts	1 punt	2 punts	3 punts
Categoria de la OMS 2001	AR, ARSA, "Síndrome 5q-"	CRDM, CRDM-SA	AREB-1	AREB-2
Cariotip*	Bo	Intermedi	Dolent	-
Requeriments transfusionals⁺	No	Regular	-	-

***Cariotip:** **Bo:** normal, -Y, del(5q), del(20q) com a única alteració; **Dolent:** complex (≥ 3 alteracions) o anomalies del cromosoma 7; **Intermedi:** altres alteracions úniques o dobles

⁺**Requeriments transfusionals:** com a mínim una transfusió cada 8 setmanes en un període de 4 mesos

Abreviatures: AR: anèmia refractària; AREB: anèmia refractària amb excés de blastes; ARSA: anèmia refractària amb sideroblastes en anell; CRDM: citopènia refractària amb displàsia multilínia; CRDM-SA: citopènia refractària amb displàsia multilínia i sideroblastes en anell.

L'any 2008 es va començar a gestar una versió nova de l'IPSS amb més de 7000 pacients, a partir de bases de dades de tot el món. Aquest nou IPSS rep el nom de **IPSS-R** i es basa en les variables presents en l'IPSS però amb noves categories (Taula 9). Estratifica els pacients en cinc grups de risc: molt baix (0-1,5 punts), baix (>1,5-3 punts), intermedi (>3-4,5 punts), alt (>4,5-6 punts), molt alt (>6 punts).

Taula 9. Índex pronòstic internacional revisat (IPSS-R)³⁹

Variable	0 punts	0,5 punts	1 punt	1,5 punts	2 punts	3 punts	4 punts
Grup de risc citogenètic	Molt bo	-	Bo	-	Intermedi	Dolent	Molt dolent
Blastes en MO (%)	0-2	-	3-4,9	-	5-10	>10	-
Hb (g/dL)	≥10	-	8-9,9	<8	-	-	-
Plaquetes (x10⁹/L)	≥100	50-99	<50	-	-	-	-
PMN (x10⁹/L)	≥0,8	<0,8	-	-	-	-	-

Abreviatures: Hb: hemoglobina; MO: medul·la òssia; PMN: polimorfonuclears

Un dels principals canvis que s'introdueix en el nou IPSS (l'IPSS-R)³⁹ és la nova categorització pronòstica de les alteracions citogenètiques. En l'antic IPSS, el pes pronòstic del cariotip havia estat infravalorat. Un estudi amb més de 2000 pacients va determinar el major pes pronòstic de la citogenètica, per sobre del nombre de blastes³⁷. La nova proposta pronòstica citogenètica (a partir de quasi 3000 pacients) va permetre la identificació de 19 categories citogenètiques diferents²⁸. La Taula 10 mostra els diferents grups citogenètics amb impacte pronòstic (efecte en la SG i l'evolució a LMA).

Taula 10. Subgrups citogenètics pronòstics. Adaptació de Schanz i cols., 2012²⁸

	Subgrup pronòstic				
	Molt bo	Bo (referència)	Intermedi	Dolent	Molt dolent
		Normal	Única: del(7q)	Única: inv(3)/t(3q)/del(3q)	Complex (>3 alteracions)
	Única: del(11q)	Única: del(5q)	+8	-7	
	-Y	del(12p)	i(17q)	Doble amb -	
		del(20q)	+19	7/del(7q)	
		Doble amb del(5q)	Altres Clons independents	Complex (3 alteracions)	
			Altres doble		
SG*	60,8	48,6	26,0	15,8	5,9
Hazard ratio	0,5 (0,3-0,7)	1.0 (0,9-1,1)	1,6 (1,4-1,8)	2,6 (2,1-3,2)	4,2 (3,4-5,2)
LMA*	NA	NA	78,0	21,0	8,2
Hazard ratio			2,2 (1,8-2,7)	3,4 (2,5-4,6)	4,9 (3,6-6,7)

*SG i risc d'evolució a LMA expressat en mediana de mesos.

Abreviatures: LMA: leucèmia mieloide aguda; NA: no assolit; SG: supervivència global.

Aquesta nova categorització genètica condueix a un millor coneixement de l'impacte pronòstic de les alteracions citogenètiques, especialment, respecte l'estratificació de l'IPSS, en que en la categoria de pronòstic intermedi s'inclouen una miscel·lània d'alteracions. A la Figura 11 es mostra com canvien els subgrups citogenètics pronòstics en el nou sistema d'estratificació citogenètica.

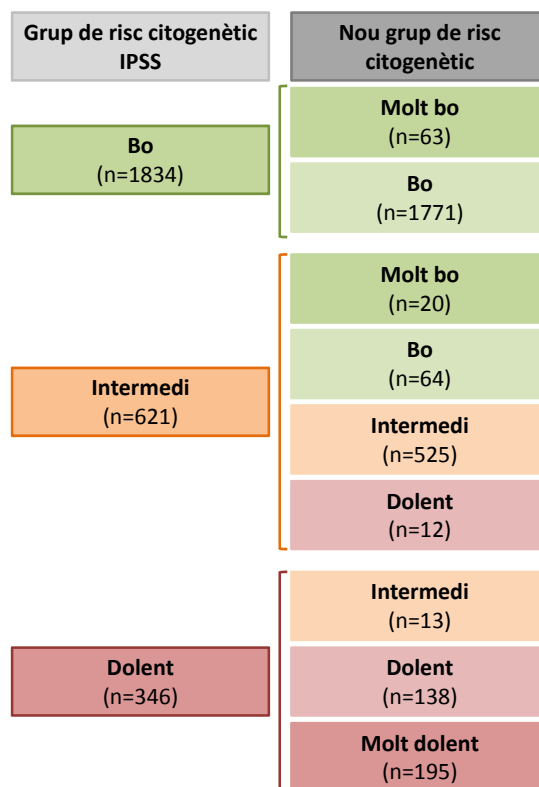


Figura 11. Canvi dels subgrups pronòstics en el nou sistema comparat amb el mòdul citogenètic de l'IPSS²⁸

2.2.6. Tractament

L'objectiu del tractament en les SMD és controlar els signes i símptomes, així com les citopènies i el risc d'evolució a LMA, reduir el nombre de transfusions i, finalment, millorar la qualitat de vida i la SG.

La decisió d'iniciar tractament en les SMD es basa en el pronòstic individual. D'aquesta forma es defineixen dues grans categories: pacients de baix risc i pacients d'alt risc (Taula 11).

Taula 11. Definició de pacients de baix i alt risc tenint en compte els diferents índex pronòstic (IPSS, IPSS-R i WPSS)¹⁴

Baix risc	Alt risc
1- IPSS de baix risc, i WPSS i IPSS-R baix i molt baix.	1- IPSS de risc intermedi-2 o alt, i/o WPSS i IPSS-R de risc alt o molt alt.
2- IPSS intermedi-1, i WPSS i IPSS-R de risc intermedi que no presentin alguna de les següents característiques:	2- IPSS intermedi-1, i/o WPSS i IPSS-R de risc intermedi que presentin com a mínim alguna de les següents característiques:
a. Anomalia citogenètica de risc alt o molt alt segons l'IPSS-R.	a. Anomalia citogenètica de risc alt o molt alt segons l'IPSS-R.
b. Plaquetes $<30 \times 10^9/L$	b. Plaquetes $<30 \times 10^9/L$
c. Polimorfonuclears $<0,5 \times 10^9/L$	c. Polimorfonuclears $<0,5 \times 10^9/L$
d. Mielofibrosi	d. Mielofibrosi

Abreviatures: IPSS: Índex pronòstic internacional; IPSS-R: Índex pronòstic internacional revisat; WPSS: Índex pronòstic basat en la classificació de la OMS 2001.

Les indicacions de tractament que es detallen en el punt 2.2.6.1 i el 2.2.6.2 es basen en les recomanacions elaborades pel Grup Espanyol de SMD que recull el document titulat *Guías españolas de diagnóstico y tratamiento de los síndromes mielodisplásicos y la leucemia mielomonocítica crónica*¹⁴.

2.2.6.1. Tractament en els pacients de baix risc

Les opcions terapèutiques en els pacients de baix risc varien des de l'observació, en casos sense citopènies o citopènies sense necessitat de tractament, fins a trasplantament al·logènic. Principalment, es poden distingir dos grans grups:

- Tractament de suport, on el principal objectiu és la millora global de símptomes o signes provocats per la malaltia de forma inespecífica.
- Tractament farmacològic actiu, on el principal objectiu és la millora de les citopènies i la simptomatologia, especialment, l'anèmia.

El tractament de suport inclou el tractament de l'anèmia, neutropènia, trombocitopènia i la sobrecàrrega de ferro transfusional.

El tractament de l'anèmia^k es basa en el *suport transfusional amb concentrats d'hematies*. Conseqüència de les transfusions repetides de concentrats d'hematies es produeix una sobrecàrrega fèrrica, tòxica per a determinats òrgans. La insuficiència cardíaca ha mostrat ser la principal causa de mort deguda al cúmul de ferro cardíac. Per aquest motiu, en alguns pacients pot estar indicat el tractament amb un agent quelant del ferro, el fàrmac de primera elecció és el deferasirox⁴⁰. El principal objectiu és mantenir la sobrecàrrega en uns nivells que no causi danys viscerals (cor, fetge, pàncrees, hipòfisi,...).

Pel tractament de l'anèmia també s'usen *agents estimulants de l'eritropoesi* que poden millorar els nivells d'hemoglobina, així com disminuir les necessitats transfusionals.

La neutropènia és freqüent en els pacients amb SMD, amb una incidència al voltant del 45%. En aquests casos, es recomana l'ús d'*antibiòtics* de forma profilàctica i de *factors estimulants de colònies de granulòcits*, però no de forma generalitzada. Els antibiòtics estan indicats en pacients sota tractament mielotòxic i/o infeccions greus.

La incidència de la trombocitopènia és molt variable. En tal cas, es poden tractar amb *transfusions de concentrats de plaquetes*, en que el principal objectiu és evitar o tractar hemorràgies majors o amb risc vital. També es disposa d'*anàlegs de la trombopoetina* que poden augmentar el nombre de plaquetes⁴¹. Tot i això, el seu ús només es recomana sota un assaig clínic.

El tractament farmacològic actiu es basa en fàrmacs tals com la lenalidomida, tractament immunosupressor, agents hipometilants,... Donat que part del treball que es presenta es basa en pacients diagnosticats de SMD tractats amb lenalidomida en farà una especial menció.

La *lenalidomida* és un anàleg de la talidomida, amb potent capacitat antiangiogènica i immunomoduladora, per aquest motiu s'inclou dins del grup de fàrmacs IMID (*Immunomodulator Drug*). Està aprovat als Estats Units pel tractament dels pacients

^kL'Organització Mundial de la Salut defineix anèmia com valor d'hemoglobina inferior a 13g/dL en homes i inferior a 12g/dL en dones.

amb SMD de baix risc (IPSS baix i intermedi-1) amb deleció 5q (aïllada o acompanyada d'altres alteracions) i anèmia dependent de transfusions. Tot i això, no està aprovada a Europa pel tractament de les SMD. L'ús de la lenalidomida està justificat per dos assajos clínics de fase II en pacients amb deleció 5q^{42,43}, tot i que també ha mostrat ser eficaç en pacients sense deleció 5q i amb requeriments transfusionals⁴⁴. En pacients amb deleció 5q s'han observat molts bons resultats, en termes de resposta eritroide i citogenètica. Es va observar una taxa d'independència transfusional del 67% amb una durada de 2,2 anys, a més, el 73% dels pacients mostraven resposta citogenètica⁴³. La dosi més utilitzada de lenalidomida és de 10 mg diaris durant 21 dies seguits en cicles de 28 dies. Aquestes dades es van veure reforçades amb un assaig clínic de fase III en que es comparaven dosis de 5 mg vs. 10 mg vs. placebo. En el grup de 10 mg es va observar independència transfusional en el 56% dels pacients. La resposta al tractament és, generalment, ràpida; per aquest motiu, s'acostuma a interrompre el tractament en aquells pacients que no han respost als tres cicles⁴⁵ i no s'ha d'allargar més de 4 cicles. La no aprovació de la lenalidomida per l'Agència Europea del Medicament va ser perquè no es disposava de dades clíniques que demostrassin que el tractament amb lenalidomida no estava relacionat amb una major taxa d'evolució a LMA. No obstant, estudis posteriors com el de Kuendgen i cols. de l'any 2012⁴⁶ han rebutjat aquesta idea. L'avaluació de 295 pacients tractats amb lenalidomida (provinents de dos assajos clínics) i de 125 pacients de risc baix/intermedi-1 amb deleció 5q, dependència transfusional i no tractats amb lenalidomida, va mostrar que la incidència d'evolució a LMA als dos anys era del 6,9% i 12,1%, respectivament. El risc de progressió a LMA era similar en les dues cohorts, tot i que el tractament amb lenalidomida s'associava a una millora en la supervivència. La toxicitat associada al tractament és, bàsicament, hematològica (trombocitopènia i neutropènia) i és més freqüent en pacients amb deleció 5q.

En determinats casos, les SMD van acompanyades d'alteracions immunes dels limfòcits T, que produeix mielosupressió d'origen autoimmune i contribueix a l'hematopoesi ineficaç. Per aquest motiu, l'ús de *gammaglobulina antitimocítica combinada o no amb ciclosporina A* (medicament immunosupressor) han mostrat ser eficaços en el tractament de les SMD⁴⁷. Les indicacions d'aquest tractament són molt limitades i es

reserven a pacients que han fracassat en altres línies prèvies de tractament. A més, es tracta d'un tractament complex i que s'associa a una important toxicitat.

Els *agents hipometilants*, tals com l'azacitidina i la decitabina, són fàrmacs que tenen la capacitat d'inhibir l'ADN metiltransferasa¹ i així revertir el silenciament transcripcional dels gens supressors de tumors i restaurar el funcionament normal de les cèl·lules hematopoètiques alterades. Els agents hipometilants han mostrat gran eficàcia en les SMD, especialment, en els pacients d'alt risc. No obstant, podria considerar-se'n l'ús de l'azacitidina en pacients de baix risc sense resposta o en cas de fracàs a agents estimulats de l'eritropoesi, i en pacients amb presència de deleció 5q no responedors a la lenalidomida. Actualment, l'Agència Europea del Medicament, entre d'altres^m, n'ha aprovat l'ús en pacients adults no candidats a rebre transplantament de progenitors hematopoètics amb SMD de risc intermedi-2 i alt d'acord amb l'IPSS. Per últim, cal mencionar el *transplantament al·logènic de progenitors hematopoètics* que és la única alternativa terapèutica curativa en pacients amb SMD. El transplantament no és una opció de primera línia, tot i que s'ha de considerar individualment en pacients joves refractaris a altres tractaments.

2.2.6.2. Tractament en els pacients d'alt risc

L'objectiu del tractament en aquest grup de pacients és modificar la història natural de la malaltia, allargant la SG i reduint el risc d'evolució a LMA.

Les indicacions terapèutiques en SMD d'alt risc inclou agents hipometilants, quimioteràpia intensiva de tipus LMA i transplantament al·logènic de progenitors hematopoètics.

L'azacitidina és el *fàrmac hipometilant* d'elecció en el tractament de les SMD d'alt risc (enfront a la decitabina) i està aprovat a Espanya amb aquesta indicació. L'azacitidina s'ha de considerar com el tractament de primera línia en les SMD d'alt risc que no es consideren candidates a tractament intensiu o que, en cas de ser-ho, no disposin de donant apropiat per a un transplantament al·logènic. En tal cas, la selecció del

¹**ADN metiltransferasa:** Enzim que catalitza la reacció de transferència dels grups metil a l'ADN. La metilació de l'ADN condueix a la repressió dels gens supressors tumorals.

^mL'**azacitidina** també està aprovada per pacients adults no candidats a rebre transplantament de progenitors hematopoètics i diagnòstic de LMMC amb 10-29% de blastes en MO (sense patologia mieloproliferativa) o LMA amb 20-30% de blastes i displasia multilínia d'acord amb la classificació OMS.

tractament ha de ser individualitzat i basat en factors propis del pacient i de la malaltia.

La *quimioteràpia intensiva tipus LMA* està indicada en pacients menors de 65 anys i que no disposen de donant, sense comorbiditats greus i amb citogenètica de risc favorable. La taxa de resposta és del 50-60%. Els resultats a llarg termini no són gaire esperançadors ja que es calcula un risc de recaiguda molt elevat (70-80%), curta durada de la remissió (8 mesos de mediana) i de la SG (12 mesos de mediana)⁴⁸⁻⁵⁰. El transplantament autòleg en pacients amb remissió completa després de quimioteràpia no està indicat.

Com ja s'ha mencionat anteriorment, el *transplantament al·logènic de progenitors hematopoètics* és la única modalitat amb capacitat curativa en les SMD. Els factors que influeixen en el seu resultat són: edat, índex de comorbiditat, estadi de la malaltia (subtipus FAB, OMS o proporció de blastes), el grup de risc citogenètic segons l'IPSS, la dependència transfusional, la sobrecàrrega fèrrica i el temps des del diagnòstic al transplantament⁵¹⁻⁵⁶.

3. Tècniques d'anàlisi genètic

3.1. Citogenètica convencional

La CC és la tècnica que permet l'estudi dels cromosomes segons la seva mida i forma. Al llarg del temps s'han anat desenvolupant diverses tècniques que han permès la producció de patrons de bandes específics per a cada parell cromosòmic i que permet la descripció del cariotip. En funció del reactiu que s'utilitza per l'elaboració de les bandes cromosòmiques es distingeixen diferents tipus de mètodes. D'aquesta forma es distingeixen dos grans grups de tècniques de bandeig cromosòmic:

- 1- Tècniques que resulten en bandes distribuïdes al llarg de tot el cromosoma: bandes G-, Q- i R-.
- 2- Tècniques que tenyeixen estructures cromosòmiques concretes, tals com zones heterocromàtiques, bandes telomèriques o regions organitzadores del nuclèol.

Les bandes cromosòmiques són estructures llargues, d'entre 5 i 10 Mb, que poden incloure centenars de gens. La tècnica més estesa per l'estudi del cariograma és la **tècnica de bandes G**, en que la tinció amb el colorant (Giemsa, Wright, Leishman,...)

produeix un patró de bandes clares i fosques que permet la identificació diferencial dels cromosomes. Les bandes fosques acostumen a ser riques en nucleòtids AT i pobres en gens; en canvi, les bandes clares (colorant negatives) són riques en nucleòtids CG i contenen gran quantitat de gens.

L'anàlisi del cariógrama permet la definició del cariotipⁿ que tal com s'ha esmentat en el punt 2.2.4 és de gran importància en el diagnòstic i pronòstic de les SMD.

3.2. Hibridació *in situ* fluorescent

La tècnica de FISH va marcar l'inici d'una nova era, als anys 80 en l'estudi citogenètic, de regions d'ADN específiques que no poden ser detectades amb tècniques de bandeig cromosòmic.

La tècnica de FISH permet detectar i localitzar seqüències específiques d'àcids nucleics (ADN o ARN) sobre preparacions cromosòmiques, extensions cel·lulars i talls de teixit⁵⁷⁻⁶⁰. La tècnica de FISH es basa en la hibridació d'una seqüència d'ADN, que s'anomena sonda, contra la seva seqüència complementària en la mostra a estudiar; tant en metafase com en interfase. Les sondes poden estar marcades directament o indirectament amb fluorocroms. La visualització i anàlisi final té lloc al microscopi de fluorescència.

La tècnica de FISH es basa en l'habilitat de l'ADN de desnaturalització i renaturalització. La Figura 12 mostra les etapes principals de la tècnica de FISH:

- a. Es parteix d'ADN corresponent a **la sonda** (en vermell i a l'esquerra de la figura) i l'ADN de la **mostra a estudiar** (en blau i a la dreta de la figura). Les línies negres indiquen els ponts d'hidrogen que mantenen unides les dos cadenes de l'ADN.
- b. Previ a la hibridació, es porta a terme el **marcatge de la sonda**, ja sigui indirecte (marcatge amb nucleòtids modificats que contenen biotina o digoxigenina) o directe (marcatge amb nucleòtids i fluorocrom). El marcatge es porta a terme mitjançant mètodes enzimàtics com la *nick translation*⁶⁸, en que un enzim ADN polimerasa amb activitat exonucleasa trenca la cadena d'ADN i, posteriorment, afegeix nucleòtids marcats amb fluorocrom. És un mètode que es basa en l'acció de dos enzims: una ADNasa que talla l'ADN cada 500 pb i una ADN polimerasa que incorpora

ⁿEs defineix **cariotip** com l'ús de la nomenclatura per descriure els cromosomes (ja siguin normals o alterats) en una determinada cèl·lula, teixit o línia cel·lular.

nucleòtids marcats amb fluorocrom. Un pas important és l'addició d'ADN Cot-1 (seqüències repetitives d'ADN) amb l'objectiu de suprimir la hibridació de seqüències repetitives.

- c. **Desnaturalització** de l'ADN de la sonda i de la mostra a estudiar, amb calor o agents químics.
- d. **Hibridació** de la sonda amb la mostra a estudiar, per complementarietat de bases, unes 16-48 hores (un mínim de 4 hores) a 37°C. El temps variarà en funció de la sonda utilitzada.
- e. **Rentats post-hibridació**, per tal d'eliminar l'excés de sonda no unida a l'ADN diana, mitjançant solucions salines o formamida.

En cas de marcatge indirecte, hi ha un pas addicional per la detecció de l'haptè^o no fluorescent (biotina o digoxigenina), mitjançant una reacció enzimàtica. Tot i que el marcatge directe és més ràpid, el marcatge indirecte permet amplificar la senyal final.

- f. **Contratinció** de l'ADN amb DAPI II (4',6-diamidino-2-phenylindole). El DAPI II és un fluorocrom que s'uneix de forma inespecífica a l'ADN (especialment en zones riques en AT) i permet la identificació dels nuclis al microscopi de fluorescència.
- g. Visualització al **microscopi de fluorescència**. Els microscopis contenen una bombeta de mercuri que emet llum que excita els fluorocroms presents en la preparació. Per a la visualització de les senyals fluorescents s'usen filtres específics per a cadascun dels fluorocroms.

^o**Haptè**: Substància lliure de proteïnes, gairebé sempre d'un pes molecular baix, que pot reaccionar amb un anticòs.

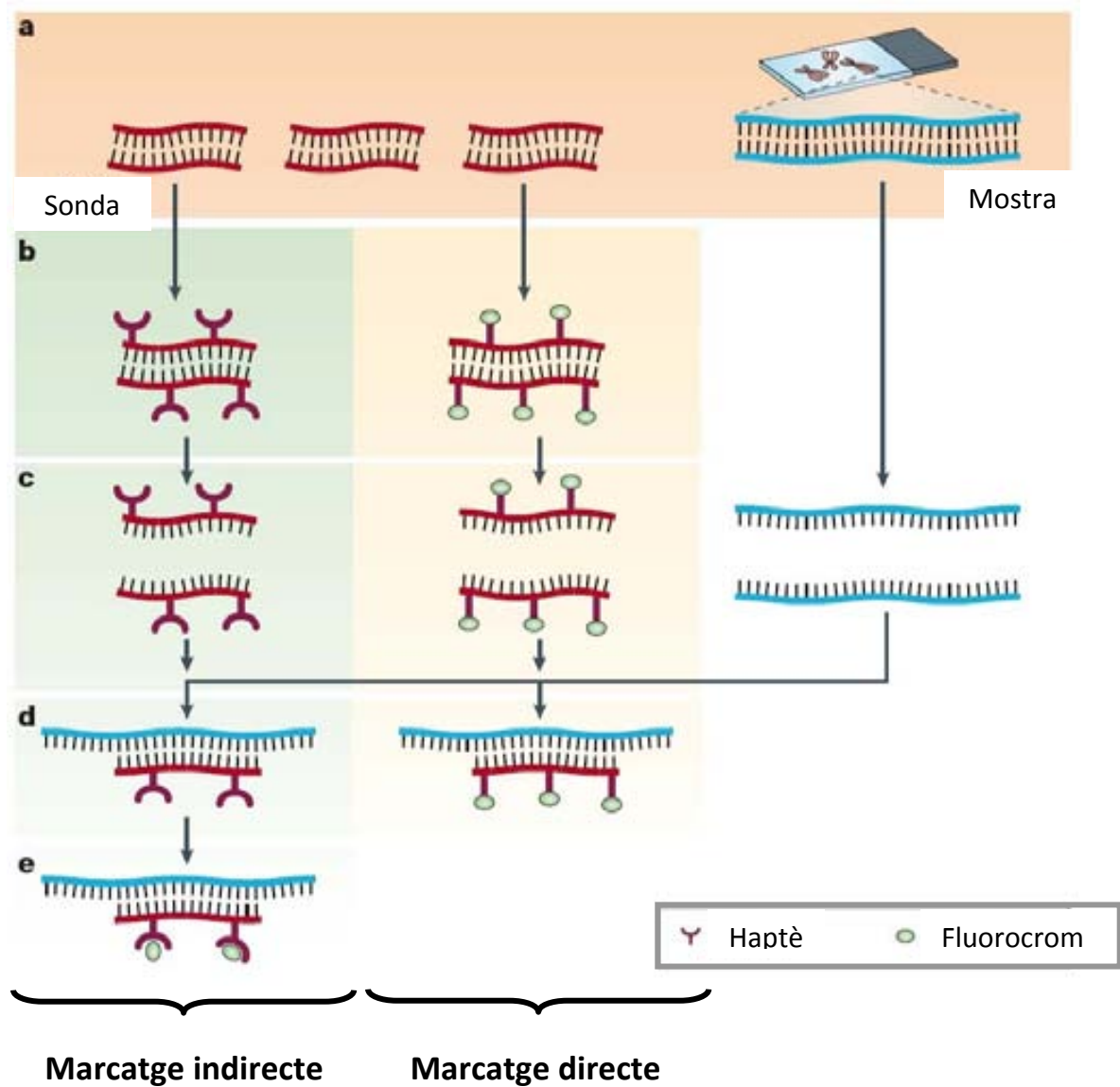


Figura 12. Etapes de la tècnica de FISH (Adaptació de Speicher i Carter, 2005⁶¹)

La tècnica de FISH s'utilitza de forma rutinària en l'estudi constitucional i de neoplàsies hematològiques i de tumors sòlids. A banda de permetre la detecció d'alteracions numèriques i estructurals a una major resolució, també pot ajudar a la identificació de cromosomes marcadors. A més, es pot utilitzar per a la confirmació de guanys i/o pèrdues detectats per altres tècniques, com els *microarrays* genòmics.

3.2.1. Tipus de sondes

En la Figura 13 es representen gràficament els diferents tipus de sondes i, a continuació, es detallen les principals característiques:

- Sonda de locus específic.** Sondes específiques per a regions concretes del genoma. Permet la identificació d'alteracions numèriques i estructurals (tals com delecions i translocacions).
- Sonda centromèrica.** Sonda que s'uneix a seqüències repetitives que són específiques de les regions centromèriques. Permet la detecció d'alteracions numèriques (guanys o pèrdues).
- Sondes telomèriques.** Sondes que reconeixen seqüències repetitives TTAGGG i que permet la visualització simultània de tots els telòmers. Sondes telomèriques específiques de cromosoma hibriden en regions subteloemèriques. Aquest tipus de sondes s'utilitzen per detectar reordenaments implicant regions subteloemèriques que són freqüents en casos de retard mental.
- Sondes de pintat cromosòmic.** Conjunt de sondes que permeten la identificació d'un cromosoma en concret. Permet la identificació de cromosomes marcadors, guanys, pèrdues o reordenaments de cromosomes concrets.

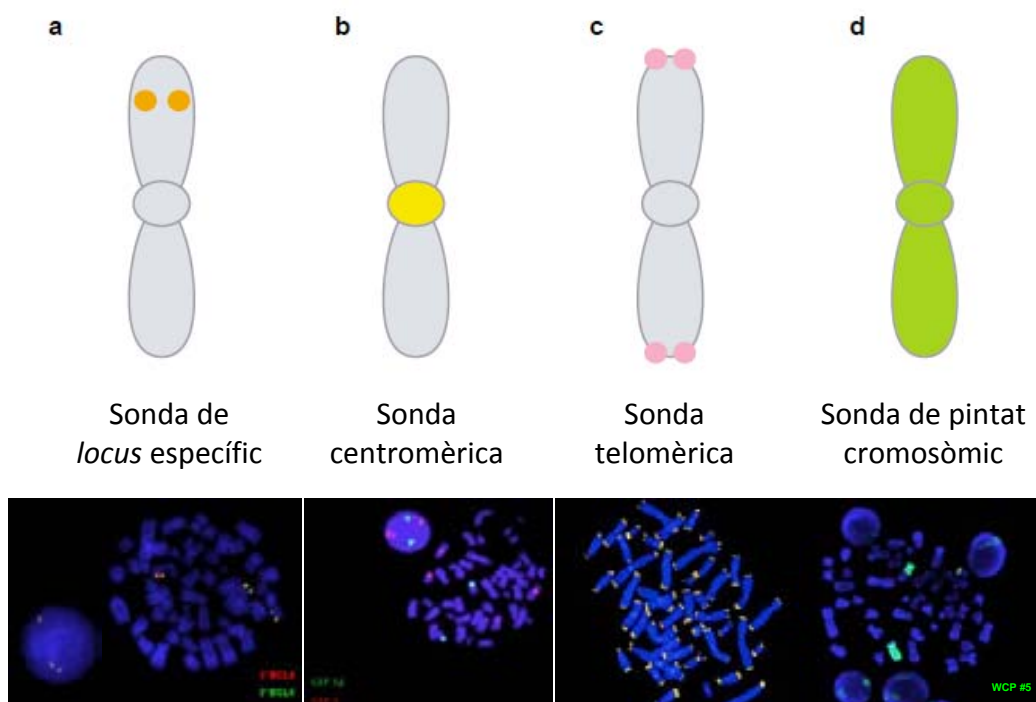


Figura 13. Exemples dels diferents tipus de sondes de FISH (Hibridació *in situ* fluorescent) (Adaptació de McNeil i Ried, 2000⁶²)

Actualment, hi ha un gran ventall de sondes comercials. No obstant, en cas de necessitar una sonda per una regió concreta es pot procedir al disseny de “sondes no comercials”.

3.2.2. Sondes no comercials

Les sondes no comercials o “casolanes” (en anglès, *hand-made*) es poden fabricar a partir de seqüències d'ADN complementari⁶³, plàsmids⁶⁴, còsmids⁶⁴, clons P1⁶⁵, fòsmids⁶⁶, YACs (de l'anglès *yeast artificial chromosome*)⁶⁷ o BACs (de l'anglès, *bacterial artificial chromosome*)⁶⁷. En funció de la longitud de l'ADN que es vol clonar s'utilitzaran uns vectors o altres.

No obstant, els vectors més utilitzats per l'elaboració de sondes són els BACs. Els BACs són F-plàsmids que contenen el fragment d'ADN a clonar (al voltant de 300 Kb, es requereix un mínim de 10 Kb) i un gen de resistència a un antibiòtic. El plàsmid és transfectat a cèl·lules *Escherichia coli* que es cultiven amb medi LB (Luria-Bertoni). Les cèl·lules que han incorporat el plàsmid són les que sobreviuran ja que contenen el gen de resistència a l'antibiòtic. El pas final és la lisi de les bactèries per aïllar les seqüències d'ADN clonades. El mètode de marcatge més estès en l'actualitat és el de la *Nick Translation*⁶⁸, ja definit anteriorment. Un cop es disposa de la sonda marcada es procedeix a la comprovació de la localització del BAC i, així, descartar possibles co-hibridacions amb altres regions del genoma. Aquesta verificació té lloc portant a terme la tècnica de FISH sobre extensions de metafases provinents d'individus sans.

3.3. Microarrays d'ADN genòmic

Un *microarray* és una col·lecció de bioelements ordenats ortogonalment en files i columnes sobre un suport sòlid. En funció dels bioelements presents en el *microarray* es distingeixen: *microarrays* d'expressió (ADN complementari), d'ADN genòmic (ADN), de teixits, de proteïnes o de cèl·lules. Els *microarrays* d'ADN genòmic s'utilitzen per l'estudi d'alteracions en el número de còpies d'ADN o per l'estudi del genotip mitjançant canvis en un únic nucleòtid (SNP, *single nucleotide polymorphism*).

Es distingeixen dos tipus de *microarrays* d'ADN genòmic: *microarrays* d'hibridació genòmica comparada (HGC) i *microarrays* de SNP.

Els **microarrays d'HGC** van sorgir com una evolució de la tècnica d'HGC, desenvolupada a principis dels anys 90⁶⁹. Es basa en la hibridació competitiva d'ADN tumoral contra ADN normal, cadascun d'ells marcats amb fluorocroms de diferent color. La hibridació es produeix sobre una extensió de metafases normals. Una limitació important de la tècnica és la seva resolució (5-10 Mb).

La tècnica de **microarrays d'HGC** es va descriure a finals dels anys 90^{70,71} però enlloc de portar a terme la hibridació sobre un portaobjectes amb metafases es produeix sobre un suport sòlid amb milers o milions de sondes, que permet l'estudi complet del genoma a una major resolució. Es distingeixen dos tipus de **microarrays d'HGC**: de BACs (BACs, d'entre 200 i 300 Kb) o d'oligonucleòtids (seqüències de 60-80 pb).

Els **microarrays de SNP** (tècnica que s'ha fet servir en la present tesi) van ser descrits a l'any 2000⁷² i són una variant dels **microarrays d'oligonucleòtids** que a més contenen variants tipus SNP. A diferència dels **microarrays d'HGC**, la hibridació no és competitiva, la mostra tumoral i control (en cas de tenir-ne) s'hibriden en **microarrays** independents i, posteriorment, es comparen els resultats obtinguts (Figura 14).

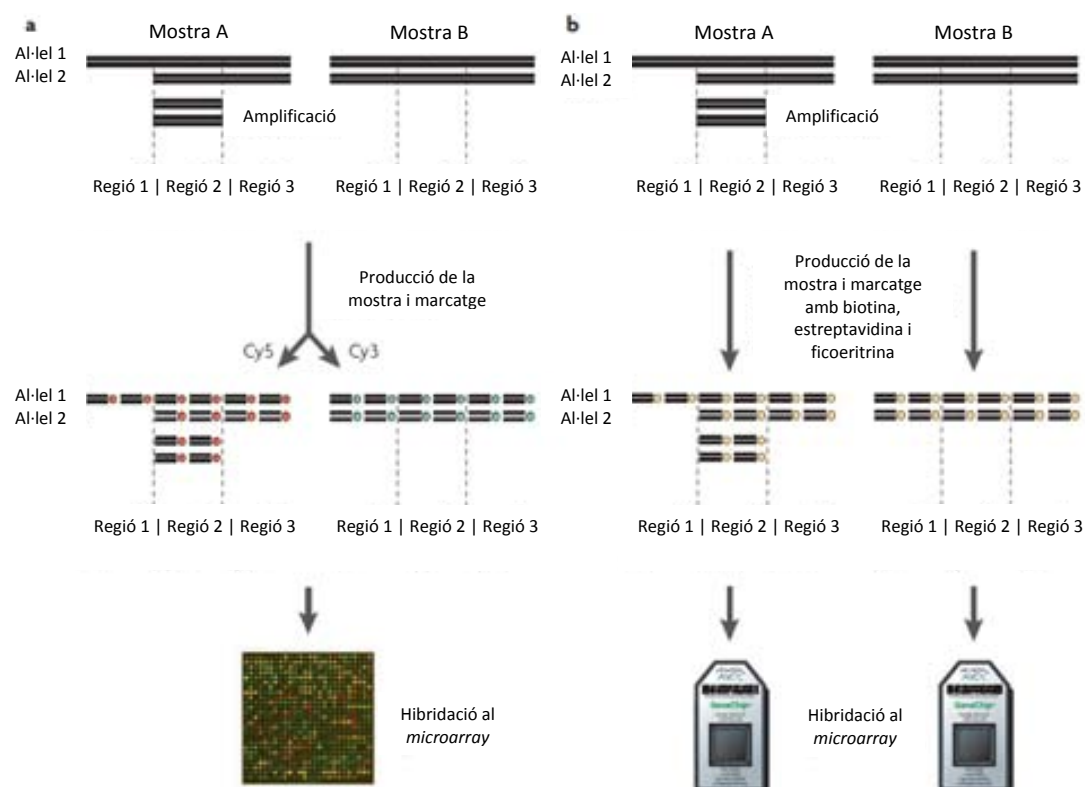


Figura 14. Esquema del procés bàsic dels **microarrays d'HGC** (a) i **microarrays de SNP** (b) (Adaptació de Gresham i cols., 2008⁷³)

Abreviatures: HGC: hibridació genòmica comparada; SNP: *single nucleotide polymorphism*

El *microarray* de SNP permet detectar canvis en el nombre de còpies (guanys i pèrdues) però a la seva vegada permet detectar la presència o absència d'un determinat SNP, el que permet conèixer simultàniament la seqüència de variants gèniques. Com a conseqüència, podem reconèixer l'origen parental de cada còpia i d'aquesta forma poder detectar possibles disomies uniparentals^p adquirides. Una disomia uniparental adquirida (DUPa) és una pèrdua d'heterozigositat^q (LOH, de l'anglès *loss of heterozigosity*) en que no hi ha canvi en el nombre de còpies. En regions on hi ha DUP es produeix pèrdua d'una part del cromosoma i posterior reemplaçament amb la còpia exacta del cromosoma romanent. El resultat és la retenció de dos còpies però amb pèrdua de diferències polimòrfiques (es passa d'un estat heterozigot a un estat homozigot). El mecanisme de formació de les DUPa es descriu en la Figura 15.

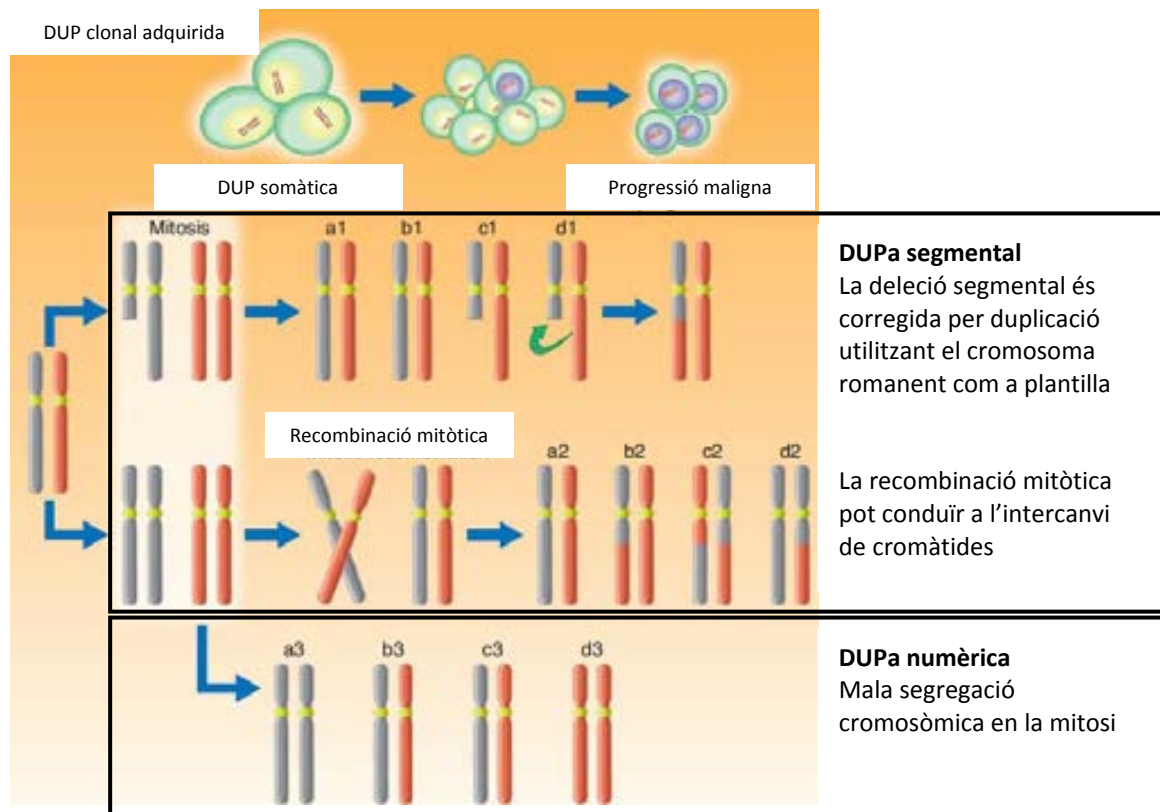


Figura 15. Possibles mecanismes de formació de disomies uniparentals adquirides (Adaptació de Makishima i cols., 2011⁷⁴)

^p**Disomia uniparental:** condició en que un individu presenta dos cromosomes que provenen del mateix progenitor.

^q**Pèrdua d'heterozigositat:** pèrdua d'un dels al·lels en un determinat *locus*, resultat d'un canvi genètic, com deleció durant la mitosi, conversió gènica o mala segregació cromosòmica.

La detecció d'aquest tipus d'alteracions és de gran importància perquè diferents tipus de DUPa tenen lloc en el càncer⁷⁴. Les conseqüències patològiques de la DUPa es descriuen en la Figura 16.

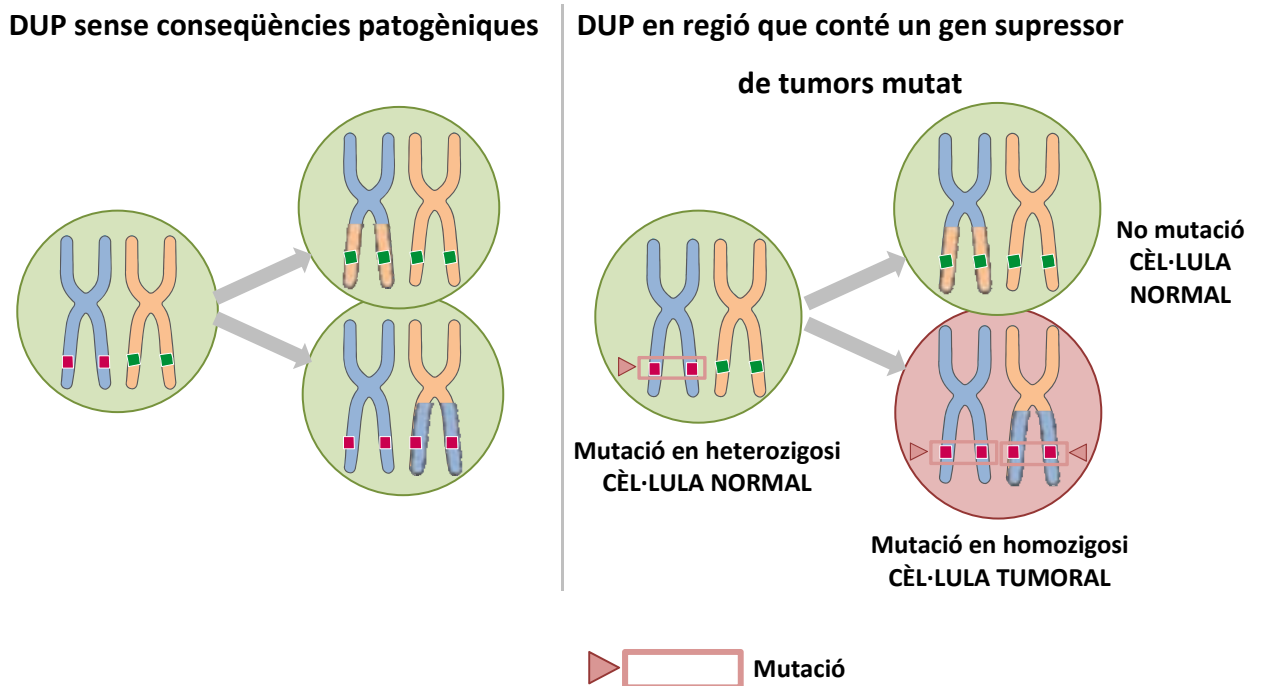


Figura 16. Conseqüències patològiques de la disomia uniparental

Abreviatures: DUP: disomia uniparental.

En la Taula 12 es mostren les avantatges i inconvenients de la tècnica de *microarrays* de HGC i de SNP.

Taula 12. Avantatges i inconvenients dels diferents tipus de *microarrays* genòmics

	Microarrays d'HGC	Microarrays de SNP
Avantatges	Plataforma robusta: bona cobertura	
	Possibilitat de disseny a mida	
	Hibridació de dos colors	Detecció de DUPa
	HGC de BACs: disseny casolà	
Inconvenients	HGC BACs: baixa resolució (180-200Kb) i especificitat (co-hibridació)	Hibridació en 2 <i>microarrays</i>

Abreviatures: HGC: hibridació genòmica comparada; SNP: *single nucleotide polymorphism*; DUPa: disomia uniparental adquirida; BAC: *bacterial artificial chromosome*.

3.4. Tècnica de seqüenciació directa

A la dècada dels 70, Frederick Sanger va desenvolupar el mètode de seqüència dideoxi, actualment, conegut com a **mètode Sanger o de seqüenciació directa**^{75,76}. Aquest mètode es basa en la síntesi de cadenes d'ADN de diferents llargades mitjançant l'addició de dideoxinucleòtids trifosfats (ddNTPs), nucleòtids sense el grup hidroxil (-OH) en l'extrem 3'. Els grups hidroxil són necessaris per la formació d'enllaços fosfodièster que permeten l'elongació de la cadena d'ADN. D'aquesta forma en incorporar un ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP o ddTTP) a l'atzar es para el procés de síntesi d'ADN i es produeixen un conjunt de seqüències de diferents mides, en que cap d'elles acaba en el mateix nucleòtid. Posteriorment, es procedeix a l'anàlisi de seqüències mitjançant un gel d'electroforesi on els fragments ordenats per mida permeten saber quina base nucleotídica es troba al final de cada fragment i així determinar la seqüència nucleotídica.

Una modificació de la tècnica de Sanger és l'addició de ddNTPs marcats amb molècules fluorescentes. Cadascun dels ddNTPs es marca amb un fluorocrom que s'excita a diferents longituds d'ona. Es porta a terme la reacció de polimerització i s'analitza en un seqüenciador que és un sistema d'electroforesi capil·lar d'alta resolució unit a un sistema de detecció de fluorescència. La Figura 17 mostra un esquema del procés.

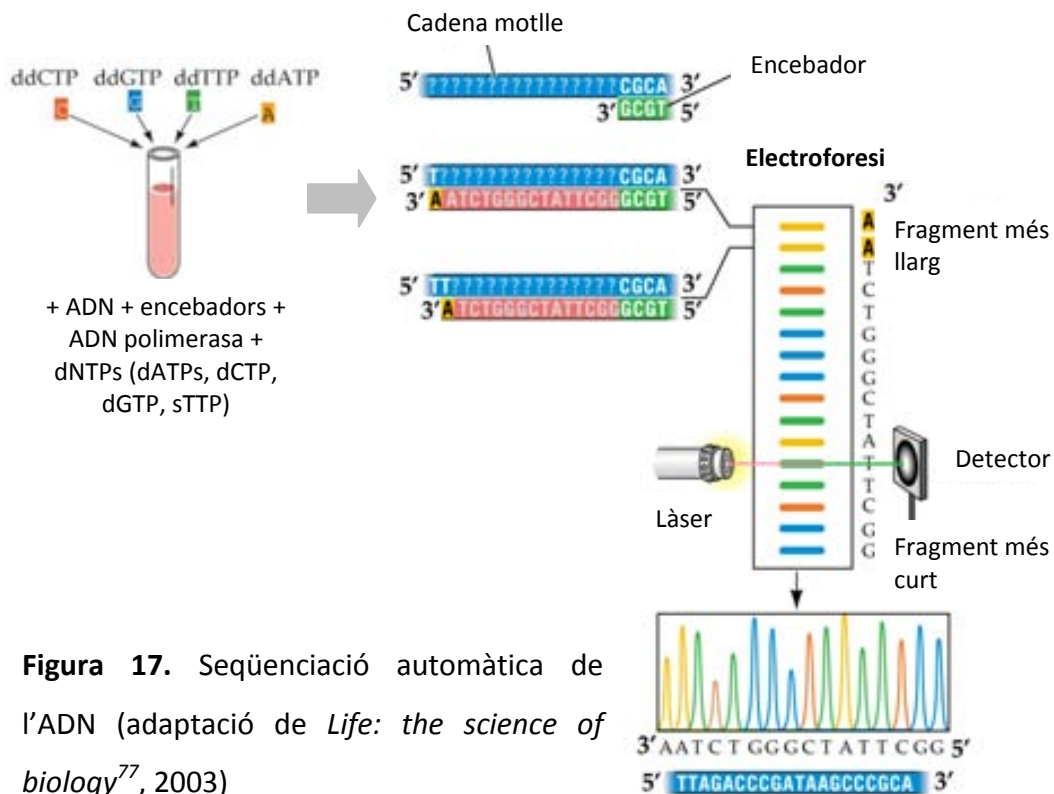


Figura 17. Seqüenciació automàtica de l'ADN (adaptació de *Life: the science of biology*⁷⁷, 2003)

En la Taula 13 es mostra una taula comparativa de les diferents tècniques utilitzades en la present tesi per la detecció d'alteracions cromosòmiques.

Taula 13. Comparació de tècniques d'anàlisi genètic

Tècnica	Detecció							
	Poliploidia	Guany i pèrdues	Translocació recíproca	Reordenament no equilibrat	Amplificació	Clonalitat	DUPa	Mutacions puntuals
Cariotip	+	+	+	+	+	+	-	-
Microarray d'HGC	-	+	-	+	+	-	-	-
Microarray de SNP	-	+	-	+	+	-	+	-
FISH	+	+	+	+	+	+	-	-
Seqüenciació*	-	-	-	-	-	+	-	+

*Mètode Sanger o de seqüenciació directa

Abreviatures: SNP: *single nucleotide polymorphism*; FISH: hibridació *in situ* fluorescent.

4. Característiques genètiques de les SMD

Les SMD han estat àmpliament estudiades mitjançant diferents tècniques: CC, FISH, *microarrays* d'ADN genòmic i, més recentment, estudis de seqüenciació.

4.1. Estudis de citogenètica convencional

Com ja s'ha mencionat amb anterioritat, els estudis de CC són de gran importància diagnòstica i pronòstica. Amb l'objectiu de determinar el paper pronòstic de cadascuna de les alteracions citogenètiques s'han portat a terme varis estudis multicèntrics. Les principals troballes d'aquests estudis es resumeixen en la Taula 14. És ben conegut i ho demostren totes les sèries que han estudiat l'impacte pronòstic de les alteracions citogenètiques en les SMD, que la deleció de 5q com a única alteració és una alteració associada a bon pronòstic. No obstant, cal determinar el paper pronòstic de les alteracions citogenètiques que poden acompanyar a la deleció de 5q. Per això, centrant-se només en aquest subgrup de pacients s'han publicat fins la presentació d'aquesta tesi, principalment, quatre estudis^{22,78-80}.

Taula 14. Estudis citogenètics ens diferents sèries. Adaptació de Haase, 2008²³

Autor, any	Nombre de pacients	% casos alterats	Categorització pronòstica		
			Bo*	Intermedi	Dolent
Knapp i cols. ⁸¹ , 1985	174	38	Normal		Complex
Nowell i cols. ^{82,83} , 1986-1989	144	44	5q-, 20q-	+8	-7/7q-
Billström i cols. ⁸⁴ , 1988	169	44	Normal, 5q-	+8	-7/7q-
Pierre i cols. ⁸⁵ , 1989	247	43	Normal		Complex
Morel i cols. ⁸⁶ , 1993	408	37	Normal, 5q-, -Y, -7/7q-, 20q-	+8	Complex
Toyama i cols. ⁸⁷ , 1993	401	50	+8	-7/7q-	Complex
White i cols. ⁸⁸ , 1994	198	38	Normal, 5q-	12p-, +21	Complex, +8, 20q-
Greenberg i cols. ³⁵ , 1997	816	40	Normal, 5q-, 20q-, -Y	La resta	Complex, alteracions del 7
Solé i cols. ²⁵ , 2005	968	51	Normal, 5q-, 20q-, -Y, 11q-, 12p-	t(3q), +8, +9, t(11q), 17p-	Complex, -7/7q-, i(17q)
Haase i cols. ²⁶ , 2007	2072	51	Normal, +1/+1q, t(1q), 5q-, t(7q), 9q-, 12p-, alteració del 15, t(17q), 20q-, -21, +21, -X, -Y	t(3q), -7/7q-, +8, 11q-, t(11q23), +19, complex (=3)	Complex (>3), t(5q)
Bernasconi i cols. ⁸⁹ , 2007	491	60	Normal, 5q-, 20q-, -Y, 11q-, 12p-	-7/7q-, la resta	Complex, alteracions de 3q
Pozdayakova i cols. ⁹⁰ , 2008	1029	45	Normal, 5q-, 20q-, -Y	+8, la resta	Complex, -7/7q-
Schanz i cols. ²⁸ , 2012	2801	45	Normal, 5q-, 20q-, -Y, 12p-, 11q-, doble amb 5q-	7q-, +8, i(17q), +19, la resta, qualsevol doble	Complex, inv(3)/t(3q)/3q-, -7, doble amb -7/7q-
Greenberg i cols. ³⁹ , 2012	7012	2588	Molt bo: -Y, 11q- Bo: Normal, 5q-, 12p-, 20q-, doble amb 5q-	7q-, +8, +19, i(17q), resta, qualsevol doble	Dolent: -7, inv(3)/t(3q)/3q-, doble amb -7/7q, complex (=3 alteracions) Molt dolent: Complex (>3 alteracions)

* Si no es descriu el contrari, totes les alteracions es consideren com a canvis únics.

4.2. Estudis amb la tècnica de FISH

La tècnica de FISH ha mostrat ser de gran utilitat en l'estudi de les SMD, ja que les principals alteracions d'aquest de grup malalties hematològiques són els guanys i les pèrdues. Són nombrosos els estudis en que s'han aplicat una bateria de sondes per demostrar la incidència d'alteracions citogenètiques en casos en que la CC havia mostrat un cariotip normal. En la Taula 15 es mostren els principals estudis en que l'aplicació de la tècnica de FISH ha mostrat ésser d'utilitat en l'estudi de les SMD i la incidència de la deleció 5q.

Taula 15. Sèries en que han estudiat la deleció 5q mitjançant la tècnica de FISH

Autor, any	Nombre de pacients	FISH 5q-/-5 n (%) casos alterats	Regió analitzada
Rigolin i cols. ⁹¹ , 2001	101	5 (5,0)	5q31
Shen i cols. ⁹² , 2001	48	6 (12,5)	5q31
Romeo i cols. ⁹³ , 2002	40	2 (5,0)	5q33-34 (<i>CSF1R</i>)
Bernasconi i cols. ⁹⁴ , 2003	57	2 (3,5)	5q31 (<i>EGR1</i>)
Yilmaz i cols. ⁹⁵ , 2005	21	3 (14,3)	5q31 (<i>EGR1</i>)

4.3. Estudis de *microarrays* genòmics

En la última dècada els estudis de llargues sèries de SMD amb tècniques d'alta resolució com són els *microarrays* genòmics han augmentat considerablement. No obstant, hi ha tres grans estudis que han servit per assentar i demostrar la utilitat dels *microarrays* en l'estudi de les SMD. A continuació es comentaran els més destacats.

L'any 2007, Mohamedali i cols.⁹⁶ van publicar un estudi en que analitzaven 119 SMD de baix risc amb *microarrays* genòmics d'Affymetrix® (50K, 250K i 500K; *microarrays* de SNP), detectant amplifícacions, delecions i DUP, 8, 10 i 46%, respectivament; aquest estudi es va portar a terme sense teixit control normal del mateix pacient. L'any 2009, Heinrichs i cols.⁹⁷ van estudiar una sèrie de 51 SMD (33 dels quals tenien cariotip normal) amb el *microarray* de 250K d'Affymetrix® (*microarray* de SNP), un 41% dels pacients presentaven alteracions, i si es centraven en els que tenien cariotip normal, un 15%. Aquest estudi, va mostrar un pas endavant ja que l'anàlisi dels resultats es va

produir amb teixit control del mateix pacient. Per últim, la sèrie més àmplia estudiada és la corresponent a Tiu i cols.⁹⁸ amb l'estudi de 250 SMD i criteris d'anàlisi més estrictes. La plataforma usada era la d'Affymetrix® (250K i 6.0; *microarrays* de SNP). Per CC, 118 pacients (47%) mostraven un cariotip normal. Junt amb els resultats de *microarrays*, el 28% presentaven un cariotip alterat, i el 27% alteracions addicionals a les detectades per CC.

No obstant, també s'han portat a terme estudis centrats en SMD amb deleció 5q amb la finalitat de determinar la RCD, així com la utilitat i la implicació pronòstica de les alteracions addicionals detectades per *microarrays*. Hi ha tres estudis que s'han centrat en l'estudi d'aquest subgrup de pacients. En la Taula 16 es mostren les principals característiques i resultats obtinguts.

Taula 16. Estudis de SMD amb deleció 5q mitjançant *microarrays* genòmics

Autor, any	Núm. casos	Diagnòstic	Mostra	Tipus <i>microarray</i>	Resultats*
Evers i cols., 2007 ⁹⁹	n=13		MO a partir de	<i>Microarray</i> d'HGC:	<u>CC</u> : deleció 5q aïllada
	9	"Síndrome 5q-"	cèl·lules fixades	44A, Agilent®	<u>Microarrays</u> :
	1	AREB-1			Punt de trencament: inicial: 5q14.3
	1	AREB-2			final: 5q33.2-q33.3
	1	LMA post-SMD			Alteracions addicionals en tots els casos
	1	SMD-I			<u>Pèrdues</u> : 1p21.1 (182.6 Kb) -polimorfisme descrit-
					<u>Guanys</u> : 19p13.3 (47.1 Kb) -polimorfisme descrit-
					20q13.33 (56.9 Kb) -polimorfisme descrit-
					22q12.3 (227.6 Kb)
Wang i cols., 2008 ¹⁰⁰	n=42**		Neutròfils de SP	<i>Microarray</i> de SNP:	RCD tant en sèrie global com "Síndrome 5q-": 5q32 (2.9 Mb)
	21	SMD amb		50K, Affymetrix®	No alteracions addicionals en "Síndrome 5q-"
	21	del(5q) "Síndrome 5q-"			Alteracions addicionals en "SMD 5q-": 10/21 (5 no detectat per CC):
					<u>Pèrdues</u> : 7p22.p11.2; 7q21.3q36.3; 12p12.1p13.1; 12q21.33q22; 13q21.1
					<u>Guanys</u> : trisomia 8
					<u>LOH</u> : 4q21.21 (2.3 Mb), 4q13.1 (1.2 Mb), 4q26q27 (0.8 Mb), 4q13.1q13.2 (1.3 Mb), 6q13q14.1 (1.2 Mb), 6q14.3q15 (3.1 Mb), 8q21.11 (2.3 Mb), 9p21.1 (2.1 Mb)
					No presents en la línia germinal: 3q25.32, 5p14.3p14.2, 6q12, 10p12.31p12.2

Jerez i cols., 2012 ¹⁰¹	n=1155		MO	Microarray de SNP:	Deleció 5q en 104 SMD (22%) amb una mediana de deleció de 71.4 Mb
	473	SMD		6.0, Affymetrix®; i	(1,9-131,28 Mb)
	625	SMD/NMP		Illumina Human	RCD:
	252	LAM		CytoSNP-12,	- <u>“Síndrome 5q-”</u> : 5q32-q33.2 (8,5 Mb).
	114	AA		Illumina®	- <u>SMD i LMA</u> : 5q31.2-q31.2 (1,92 Mb)
	246	NMP			En casos amb 5q- com a única alteració per CC, 52% alteracions addicionals per <i>microarrays</i> : deleció 7q (27/137); LOH a 17p (26/137). Tots dos associats a LMA o SMD d’alt risc. No alteracions citogenètiques addicionals en “Síndrome 5q-” però sí LOH (1p, 1q, 6q, 10q i 18q).

*Només es mostren les alteracions addicionals recurrents, les observades en dos o més casos

**En 8 casos s’ha validat amb cèl·lules T del propi pacient per descartar anomalies de la línia germinal

Abreviatures: AA: anèmia aplàsica; CC: citogenètica convencional; HGC: hibridació genòmica comparada; LMA: leucèmia mieloide aguda; LOH: pèrdua d’heterozigositat, de l’anglès *loss of heterozygosity*; MO: medul·la òssia; NMP: neoplàsia mieloproliferativa; RCD: regió comuna delecionada; SMD: síndrome mielodisplàstica; SP: sang perifèrica.

4.4. Estudis mutacionals

Els gens mutats en les SMD es classifiquen segons la funció de les proteïnes per les quals codifiquen, d'aquesta forma es distingeixen cinc grans grups (Taula 17).

Taula 17. Gens mutats en les SMD^{102,103}

	Gen afecte (freqüència)	Conseqüència biològica
Maquinària d'<i>splicing</i>^f	<i>SF3B1</i> (25-30%), <i>U2AF1</i> (5-10%), <i>ZRSR2</i> (5%), <i>SRSF2</i> (10%), <i>SF3A1</i> (1%), <i>PRPF40B</i> (1%), <i>UA2F2</i> (1%), <i>SF1</i> (1%)	Alteracions en l' <i>splicing</i> que resulten en salt d'exons, retenció d'introns o exons donant lloc a proteïnes amb funció alterada
Regulació epigenètica	<i>TET2</i> (20-25%), <i>DNMT3A</i> (8%), <i>IDH1/IDH2</i> (2-3%), <i>ASXL1</i> (10-15%), <i>EZH2</i> (5%)	Hipermetilació de gens implicats en cycle cel·lular, poden perdre la seva funció i derivar en un augment de la proliferació
Factors de transcripció	<i>RUNX1</i> (15-20%) i <i>ETV6</i> (2%)	Afectació de la diferenciació cel·lular
Senyalització quinasa	<i>JAK2</i> (1-2%), <i>NRAS/KRAS</i> (5-10%), <i>PTPN11</i> (3%), <i>c-CBL</i> (1-2%)	Activació contínua de la senyalització tirosin-quinasa
Dany genòmic	<i>TP53</i> (5-10%)	No resposta al dany genòmic, inestabilitat genòmica

La identificació de mutacions és un fet comú en les SMD i han demostrat tenir una clara relació genotip-fenotip, sobretot en el cas del gen *SF3B1* que s'associa a SMD amb sideroblastes en anell^{104,105}; així com una important implicació pronòstica. Es destaca el mal pronòstic de les mutacions que afecten als següents gens: *TP53*, *EZH2*, *ETV6*, *RUNX1* i *ASXL1*^{106 107}.

Centrant-nos en les SMD amb deleció 5q, varis estudis s'han portat a terme. Els principals gens estudiats així com la seva implicació pronòstica es mostren en la Taula 18.

^f**Splicing:** procés pel qual s'eliminen els introns en el pre-ARN amb la finalitat d'obtenir ARN madur.

Taula 18. Gens mutats en les SMD amb deleció 5q

Gen	Locus	Freqüència	Implicació pronòstica
<i>TP53</i> ¹⁰⁸⁻¹¹²	17p13	7-25%	Mal pronòstic. Associat a SMD d'alt risc, secundàries i LMA. Alta freqüència d'evolució a LMA
<i>DNMT3A</i> ¹¹¹	2p23.3	22%	No definida
<i>SF3B1</i> ¹¹¹	2q33.1	16%	No definida
<i>IDH1/2</i> ^{79,113,114}	2q33.3/15q26.1	0-22%	Associada a SMD d'alt risc
<i>NRAS</i> ¹⁰⁸	1p13.2	0%	No definida
<i>JAK2</i> ¹¹³	9p24.1	6,4%	No definida
<i>MPL</i> ⁷⁹	1p34	3,8%	No definida

Abreviatures: LMA: leucèmia mieloide aguda; SMD: síndrome mielodisplàstica.

Hipòtesi i objectius

La fe és donar el primer pas, fins i tot quan no es veu tota l'escala

Martin Luther King Jr

Hipòtesi

Les SMD són un grup heterogeni de malalties clonals. La classificació actual de la OMS 2008 inclou set subtipus diferents de SMD en l'adult. La meitat de les SMD presenten alteracions citogenètiques, que són informatives per establir el diagnòstic i pronòstic de la malaltia, essent la CC el *gold standard* per l'estudi genètic. A excepció de la "SMD associada a la deleció 5q aïllada", cap subtipus reconegut per la OMS s'associa a un marcador genètic específic. Tot i això, és important estudiar l'heterogeneïtat de la deleció 5q en les SMD.

Les tècniques de CC, FISH, seqüenciació i *microarrays* genòmics permeten detectar alteracions recurrents en neoplàsies, tant hematològiques com sòlides. Les SMD com a grup heterogeni han estat profundament estudiades i són d'especial interès els casos sense alteracions citogenètiques. L'aplicació de tècniques de major sensibilitat com la FISH i major resolució, com els *microarrays* genòmics han permès la detecció d'alteracions críptiques i així explorar nous marcadors genètics. La deleció de 5q és una alteració que present de forma aïllada es troba associada a bon pronòstic, no obstant, pocs estudis s'han centrat en el subgrup de SMD que presenten aquesta alteració i les implicacions que poden tenir les alteracions addicionals i les críptiques.

La **hipòtesi** plantejada es basa en que les alteracions citogenètiques presents en les SMD són un factor responsable de la fisiopatologia de la malaltia, així com del seu pronòstic. Per aquest motiu, estudis multicèntrics, amb un major nombre de pacients, en que es recullen dades clíniques de pacients diagnosticats de SMD poden ajudar a la determinació dels factors responsables del pronòstic del subgrup de pacients que aparentment, des del punt de vista citogenètic, són similars. A més, l'estudi de les SMD amb tècniques genètiques de major sensibilitat i resolució que la CC, així com la FISH, la seqüenciació o els *microarrays* genòmics, permeten la detecció d'alteracions genètiques subjacents i poder identificar possibles marcadors. Aquests tindrien valor diagnòstic i d'estratificació pronòstica com la possible evolució a LMA o la resposta a tractament, i podrien ser estudiats per tècniques disponibles en un laboratori de diagnòstic hematològic.

Objectius

Objectius generals

L'objectiu del treball és caracteritzar les SMD amb deleció 5q, així com la implicació pronòstica de les alteracions acompanyants. D'aquesta manera es vol analitzar la relació de les esmentades troballes amb les característiques clíniques, biològiques i evolutives dels pacients.

Objectius concrets

1. Mitjançant la tècnica de FISH:
 - 1.1. Analitzar la incidència de la deleció 5q en les SMD que per CC no la presentaven.
 - 1.2. Analitzar l'eficiència de la detecció de la deleció de 5q observada mitjançant CC.
2. En pacients que per CC presentaven una deleció 5q, recollir dades clínico-biològiques amb la finalitat:
 - 2.1. Analitzar la incidència de les alteracions citogenètiques acompanyants a la deleció 5q.
 - 2.2. Analitzar els factors amb impacte pronòstic sobre la SG.
 - 2.3. Determinar els factors amb impacte pronòstic sobre l'evolució a LMA.
3. En pacients amb deleció 5q tractats amb lenalidomida:
 - 3.1. Caracteritzar el perfil genètic mitjançant *microarrays* genòmics de SNP.
 - 3.2. Estudiar la incidència de mutacions en els gens: *ASXL1*, *CBL*, *IDH1*, *IDH2*, *TET2* i *TP53*.
 - 3.3. Avaluat el significat clínic-biològic de les alteracions genètiques (guanys, pèrdues, pèrdues d'heterozigositat o mutacions) en relació a les característiques clíniques, resposta al tractament amb lenalidomida i evolució clínica.

Resultats

Abans d'actuar, escolta. Abans de reaccionar, pensa. Abans de gastar, guanya. Abans de criticar, espera. Abans de pregar, perdona. Abans de fugir, intenta-ho

Ernest Hemingway

Els resultats es presenten en format de tres articles:

Treball I

Mallo M, Arenillas L, Espinet B, Salido M, Hernández JM, Lumbreras E, del Rey M, Arranz E, Ramiro S, Font P, González O, Renedo M, Cervera J, Such E, Sanz GF, Luño E, Sanzo C, González M, Calasanz MJ, Mayans J, García-Ballesteros C, Amigo V, Collado R, Oliver I, Carbonell F, Bureo E, Insunza A, Yañez L, Muruzabal MJ, Gómez-Beltrán E, Andreu R, León P, Gómez V, Sanz A, Casasola N, Moreno E, Alegre A, Martín ML, Pedro C, Serrano S, Florensa L, Solé F. *Fluorescence in situ hybridization improves the detection of 5q31 deletion in myelodysplastic syndromes without cytogenetic evidence of 5q*. *Haematologica* 2008;93(7):1001-1008. Factor d'impacte (2008): 5,978.

Contribució al treball:

Realització de la tècnica de FISH en tots els pacients de l'Hospital Central l'Aliança i l'Hospital del Mar (n=168), recollida dels resultats dels diferents centres del *Grupo Español Cooperativo de Citogenética Hematológica* així com comunicació directa amb els investigadors dels diferents grups, anàlisi i interpretació de les dades i redacció de l'article final. També es va portar a terme la presentació en diferents grups de treball i congressos nacionals i internacionals.

Treball II

Mallo M, Cervera J, Schanz J, Such E, García-Manero G, Luño E, Steidl C, Espinet B, Vallespí T, Germing U, Blum S, Ohyashiki K, Grau J, Pfeilstöcker M, Hernández JM, Noesslinger T, Giagounidis A, Aul C, Calasanz MJ, Martín ML, Valent P, Collado R, Haferlach C, Fonatsch C, Lübbert M, Stauder R, Hildebrandt B, Krieger O, Pedro C, Arenillas L, Sanz MÁ, Valencia A, Florensa L, Sanz GF, Haase D, Solé F. *Impact of adjunct cytogenetic abnormalities for prognostic stratification in patients with myelodysplastic syndrome and deletion 5q*. *Leukemia* 2011;25(1):110-120. Factor d'impacte (2011): 9,561.

Contribució al treball:

Reclutament de dades dels diferents centres participants, selecció de les SMD amb delecó 5q, depuració de la base de dades, anàlisi i interpretació de les dades i escriptura de l'article final. També es va portar a terme la presentació en diferents grups de treball i congressos nacionals i internacionals.

Treball III

Mallo M, del Rey M, Ibáñez M, Calasanz MJ, Arenillas L, Larráyo MJ, Pedro C, Jerez A, Maciejewski J, Costa D, Nomdedeu M, Diez-Campelo M, Lumbreras E, González-Martínez T, Marugán I, Such E, Cervera J, Cigudosa JC, Álvarez A, Florensa L, Hernández JM, Solé F. *Response to lenalidomide in myelodysplastic syndromes with del(5q): influence of cytogenetics and mutations*. British Journal of Haematology 2013. Veure Annex 1. Factor d'impacte (2011): 4,941.

Contribució al treball:

Reclutament de mostres de pacients, anàlisi i selecció de les mostres, realització de les tècniques de *microarrays* i FISH, centralització en la recollida de dades clíniques, anàlisi de *microarrays* de SNP, anàlisi i interpretació de les dades i redacció de l'article final. També es va portar a terme la presentació en diferents grups de treball i congressos nacionals i internacionals.

1. Treball I: La hibridació *in situ* fluorescent millora la detecció de la deleció 5q31 en síndromes mielodisplàstiques (SMD) sense evidència citogenètica de 5q-

Més del 50% dels pacients amb SMD presenten alteracions citogenètiques al moment del diagnòstic. L'alteració més freqüent és la deleció 5q. L'objectiu d'aquest primer treball és aplicar la tècnica de FISH de 5q31 en pacients amb SMD amb cariotip normal, absència de metafases o cariotip alterat sense evidència de deleció 5q.

Es van recollir **716** mostres de SMD primaris de diferents centres pertanyents al *Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica (GCECGH)*. Es van dividir en dos grups:

- **Grup A:** SMD sense evidència de deleció 5q per CC (n=637).
- **Grup B (control positiu):** SMD amb deleció 5q (n=79).

Van ser diagnosticats 659 pacients segons la classificació FAB. Els diagnòstics més freqüents van ser AR, ARSA i AREB pel grup A; AR i AREB pel grup B. Cinc-cents cinquanta-cinc van ser diagnosticats segons la classificació OMS 2001. Els diagnòstics més freqüents eren AR, ARSA, AREB-1 i AREB-2 pel grup A; "Síndrome 5q-", AREB-1 i CRDM pel grup B. De 57 pacients no es disposava de diagnòstic.

La tècnica de FISH es va realitzar sobre material fixat provinent de l'estudi citogenètic (24 hores sense mitògens) amb la sonda de FISH 5q31. Es van analitzar entre 100 i 400 nuclis i el llindar de positivitat es va establir entre el 3 i el 10%, definit per cada centre participant.

Considerant el **grup A** de forma global, 38 de 637 pacients (5,96%) van mostrar un resultat positiu per FISH. Aquest grup a la seva vegada es va dividir en tres grans grups en funció del resultat citogenètic:

- 1- Cariotip normal: 13 de 474 pacients (2,7%) van donar positiu, en termes de percentatge. El grup que presentava un major rendiment va ser el grup amb menys de 10 metafases analitzades.
- 2- Sense metafases: 11 de 54 pacients (20,4%) van mostrar un resultat positiu.
- 3- Cariotip alterat: 9 d'11 (91,8%) amb el cariotip alterat amb el cromosoma 5 afectat per CC va mostrar un resultat positiu per FISH. En cas de no presentar el cromosoma 5 afectat, un 5,1% eren positius (5 de 98 casos). Del grup amb el

cromosoma 5 implicat, en destaca un cas amb monosomia 5, es tractava d'un pacient amb resultat concomitant d'AREB i mieloma múltiple.

En els casos en que va ser possible es van analitzar metafases per detectar la deleció de 5q i així poder determinar si l'alteració citogenètica estava restringida als nuclis en interfase. En més de la meitat dels casos, la deleció 5q també es va observar en metafase, el que fa pensar que la manca de detecció per CC es deu més al nombre de metafases analitzades que a la presència d'una alteració críptica. L'aplicació de la tècnica de FISH en alguns casos va permetre una millor interpretació i redefinició del cariotip.

Els casos positius presentaven els següents diagnòstics: AR (44,7%) i AREB (26,3%) segons la classificació FAB; i "Síndrome 5q-" (42,1%) segons la classificació OMS. Aquests resultats coincideixen amb els observats en la sèrie global.

Catorze casos tenien una orientació citològica de "Síndrome 5q-". En 9 casos (64,3%), la tècnica de FISH va mostrar la deleció de 5q, essent el grup més afectat el de sense metafases i el de cariotip normal, cinc i tres casos, respectivament.

En el **grup B** es va confirmar la deleció 5q en tots els casos. També es va comparar el percentatge de cèl·lules amb deleció 5q en ambdues tècniques (CC vs. FISH). Es va observar una concordança pobre (0,284), essent la mitjana de detecció de: $58,20 \pm 26,62\%$ vs. $53,85 \pm 22,73\%$.

Considerant aquests resultats, la tècnica FISH de 5q seria d'aplicació obligatòria en casos amb SMD sense metafases, en cas de cariotip alterat amb el cromosoma 5 implicat o en casos de sospita morfològica de "Síndrome 5q-".

Fluorescence *in situ* hybridization improves the detection of 5q31 deletion in myelodysplastic syndromes without cytogenetic evidence of 5q-

Mar Mallo,^{1,2} Leonor Arenillas,¹ Blanca Espinet,¹ Marta Salido,¹ Jesús M^a Hernández,³ Eva Lumbreras,³ Mónica del Rey,³ Eva Arranz,^{4,5} Soraya Ramiro,⁴ Patricia Font,⁴ Olga González,⁴ Mónica Renedo,⁴ José Cervera,⁶ Esperanza Such,⁶ Guillermo F. Sanz,⁶ Elisa Luño,⁷ Carmen Sanzo,⁷ Miriam González,⁷ María José Calasanz,⁸ José Mayans,⁹ Carlos García-Ballesteros,⁹ Victoria Amigo,⁹ Rosa Collado,¹⁰ Isabel Oliver,¹⁰ Félix Carbonell,¹⁰ Encarna Bureo,¹¹ Andrés Insunza,¹¹ Lucrecia Yañez,¹¹ María José Muruzabal,¹² Elena Gómez-Beltrán,¹³ Rafael Andreu,¹³ Pilar León,¹³ Valle Gómez,¹⁴ Ángeles Sanz,⁵ Natalia Casasola,⁵ Esperanza Moreno,¹⁴ Adrián Alegre,¹⁴ María Luisa Martín,¹⁵ Carmen Pedro,¹⁶ Sergi Serrano,¹ Lourdes Florensa,¹ and Francesc Solé^{1,2}

¹Laboratori de Citogenètica i Biologia Molecular, Laboratori de Citologia Hematològica. Servei de Patologia, IMAS. GRETNHE, IMIM-Hospital del Mar, Barcelona; ²Departament de Biologia Celular, Fisiologia i Immunologia. Facultat de Biociències. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra; ³Servicio de Hematología y IBMCC, Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca, Salamanca; ⁴Servicio de Genética, Laboratorio Gemolab, Madrid; ⁵Unidad de Genética. Hospital Universitario La Princesa, Madrid; ⁶Servicio de Hematología, Hospital Universitario La Fe, Valencia; ⁷Servicio de Hematología. Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo; ⁸Departamento de Genética. Universidad de Navarra, Pamplona; ⁹Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Arnau de Vilanova, Valencia; ¹⁰Servicio de Hematología. Consorcio Hospital General Universitario, Valencia; ¹¹Servicio de Hematología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander; ¹²Servicio de Hematología. Hospital Sierrallana, Torrelavega; ¹³Servicio de Hematología. Hospital Universitario Dr Peset, Valencia; ¹⁴Servicio de Hematología, Hospital Universitario La Princesa, Madrid; ¹⁵Servicio de Genética. Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid; ¹⁶Servei d'Hematologia Clínica, IMAS. GRETNHE, IMIM-Hospital del Mar, Barcelona, Spain

Funding: this work was partially supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain (FI07/00107 and PI07/1009). Collaboration with Celgene Spain.

Manuscript received March 5, 2008. *Revised version arrived on* April 22, 2008. *Manuscript accepted* May 14, 2008.

Correspondence:
Dr. Francesc Solé, Laboratori de Citogenètica i Biologia Molecular Servei de Patologia, Hospital del Mar Passeig Marítim 25-29 08003 Barcelona, Spain.
Phone: +34.93.2483521
Fax: +34.93.2483131
e-mail: fsole@imas.imim.es

©2008 Ferrata Storti Foundation.
This is an open-access paper.

ABSTRACT

Background

More than 50% of patients with myelodysplastic syndromes present cytogenetic aberrations at diagnosis. Partial or complete deletion of the long arm of chromosome 5 is the most frequent abnormality. The aim of this study was to apply fluorescence *in situ* hybridization of 5q31 in patients diagnosed with *de novo* myelodysplastic syndromes in whom conventional banding cytogenetics study had shown a normal karyotype, absence of metaphases or an abnormal karyotype without evidence of del(5q).

Design and Methods

We performed fluorescence *in situ* hybridization of 5q31 in 716 patients, divided into two groups: group A patients (n=637) in whom the 5q deletion had not been detected at diagnosis by conventional banding cytogenetics and group B patients (n=79), in whom cytogenetic analysis had revealed the 5q deletion (positive control group).

Results

In group A (n=637), the 5q deletion was detected by fluorescence *in situ* hybridization in 38 cases (5.96%). The majority of positive cases were diagnosed as having the 5q- syndrome. The deletion was mainly observed in cases in which the cytogenetics study had shown no metaphases or an aberrant karyotype with chromosome 5 involved. In group B (n=79), the 5q deletion had been observed by cytogenetics and was confirmed to be present in all cases by fluorescence *in situ* hybridization of 5q31.

Conclusions

Fluorescence *in situ* hybridization of 5q31 detected the 5q deletion in 6% of cases without clear evidence of del(5q) by conventional banding cytogenetics. We suggest that fluorescence *in situ* hybridization of 5q31 should be performed in cases of a suspected '5q- syndrome' and/or if the cytogenetic study shows no metaphases or an aberrant karyotype with chromosome 5 involved (no 5q- chromosome).

Key words: myelodysplastic syndromes, karyotype, fluorescence *in situ* hybridization

Citation: Mallo M, Arenillas L, Espinet B, Salido M, Hernández JM, Lumbreras E, del Rey M, Arranz E, Ramiro S, Font P, González O, Renedo M, Cervera J, Such E, Sanz GF, Luño E, Sanzo C, González M, Calasanz MJ, Mayans J, García-Ballesteros C, Amigo V, Collado R, Oliver I, Carbonell F, Bureo E, Insunza A, Yañez L, Muruzabal MJ, Gómez-Beltrán E, Andreu R, León P, Gómez V, Sanz A, Casasola N, Moreno E, Alegre A, Martín ML, Pedro C, Serrano S, Florensa L, and Solé F. Fluorescence *in situ* hybridization improves the detection of 5q31 deletion in myelodysplastic syndromes without cytogenetic evidence of 5q-. *Haematologica* 2008; 93:1001-1008. doi: 10.3324/haematol.13012

Introduction

Myelodysplastic syndromes (MDS) are a group of clonal hematopoietic stem cell diseases characterized by dysplasia and ineffective hematopoiesis in one or more myeloid cell lines.¹ In 1982, the French-American-British (FAB) group developed a morphological classification that distinguishes five MDS subtypes based on the percentage of bone marrow and peripheral blood blasts, the percentage of bone marrow ringed sideroblasts and the level of circulating monocytes.² In 2001, the World Health Organization (WHO) proposed a new classification which represents an extension of the FAB proposal with several modifications taking into account dysplasia, cytopenias, percentage of blasts and cytogenetic and molecular findings. The WHO classification identified the following MDS subtypes: refractory anemia (RA), refractory anemia with ringed sideroblasts (RARS), '5q- syndrome' (MDS 5q-), refractory cytopenia with multilineage dysplasia (RCMD), RCMD with ringed sideroblasts (RCMD-RS), refractory anemia with excess of blasts (RAEB) type 1 (RAEB-1), RAEB type 2 (RAEB-2) and MDS, unclassifiable (MDS-U). Two FAB subtypes were reclassified in the WHO classification: chronic myelomonocytic leukemia (CMML) was considered as a myelodysplastic/myeloproliferative disease (MDS/MPD) and refractory anemia with excess of blasts in transformation (RAEB-t) as acute myeloid leukemia (AML). Moreover, the WHO classification considers MDS associated with an isolated del(5q) chromosome abnormality as a new entity within MDS: '5q- syndrome'. This entity was defined as macrocytic anemia, marrow and blood blast cell percentage <5%, an isolated del(5q) cytogenetic abnormality and a favorable clinical course. The bone marrow is usually hypercellular or normocellular with normal or increased megakaryocytes, many of which have hypolobulated nuclei (in most of cases $\geq 50\%$). The most common clinical symptoms are usually related to anemia that causes transfusion dependency.¹

The prognosis and clinical course of MDS vary among patients. Several scoring systems have, therefore, been established in order to predict the prognosis with regards to survival and evolution to AML. These scoring systems are mainly based on multiple prognostic parameters such as the percentage of blasts, age, karyotype, number of cytopenias and transfusion requirements.³⁻⁶ The International Prognostic Scoring System (IPSS), introduced in 1997, became the gold standard for risk assessment in patients with *de novo* MDS.⁴ However, subsequent studies revealed some pitfalls of the system; one of the most important was the inclusion of the less frequent single chromosome defects and double defects in the intermediate cytogenetic category.⁷⁻¹⁰

Cytogenetic findings have been demonstrated to play an important role in both the diagnosis and prognosis of MDS and have been given more weight in the WHO classification, which recognizes the '5q- syndrome' as a new subtype of MDS.¹ Conventional

banding cytogenetics remains an integral component and standard in the diagnostic work up of patients with suspected MDS. Although MDS are not associated with any specific chromosomal abnormality, there are some frequent alterations: 5q-, -7/7q-, +8, -18/18q-, 20q-, -5, -Y, -17/17p- (including i(17q)).¹⁰

Partial or complete deletion of the long arm of chromosome 5 is the most recurrent cytogenetic abnormality in MDS patients, being found in 10-15% of all cases of *de novo* MDS.⁸⁻¹⁰ Abnormalities of chromosome 5 can present as either a sole karyotypic abnormality or in combination with other chromosomal abnormalities.¹¹ In clinical practice, the 5q deletion can be detected by cytogenetics or by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with a fluorescently labeled probe that recognizes the 5q31 locus (EGR1).

Recently, lenalidomide (CC-5013, Revlimid®; Celgene) was approved by the USA Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of patients with MDS with an interstitial deletion of the long arm of chromosome 5. Patients with del(5q) MDS frequently have symptomatic anemia, and the treatment of this condition has traditionally consisted of red blood cell transfusions and, for some, iron chelation therapy.¹² Clinical trials assessing the efficacy of lenalidomide in MDS showed that this drug can reduce transfusion requirements and reverse cytologic and cytogenetic abnormalities in patients who have MDS with the 5q31 deletion.^{13,14}

The aim of the present study was to apply the FISH technique in patients diagnosed with MDS in whom cytogenetic analysis had shown a normal karyotype, absence of metaphases or an abnormal karyotype without evidence of del(5q). FISH would allow the detection of the 5q deletion in those cases in which cytogenetic analysis had not found the deletion. In consequence, these patients might be candidates for treatment with lenalidomide.

Design and Methods

Patients

Seven hundred and sixteen patients diagnosed with MDS were retrospectively included in the study. All of them came from centers affiliated to the Spanish Haematological Cytogenetics Working Group (GCECGH). The patients were divided into two groups: group A consisted of 637 patients who did not present the 5q deletion at diagnosis as determined by cytogenetics, while group B comprised 79 patients in whom cytogenetic analysis had revealed the 5q deletion, who were, therefore, used as positive controls. All cases were diagnosed as having primary MDS: 659 patients according to the FAB classification and among them, 555 could also be classified according to the WHO criteria. For 57 patients no diagnostic data were available to classify them according to either the FAB or WHO criteria. The patients' diagnoses are listed in Table 1.

Among the 637 cases in group A, we had cytologic information for 307 and 14 of them had a morphologic

ical orientation of '5q- syndrome'.

The study was conducted with the approval of the ethical committee from our institution and in keeping with the guidelines of the Declaration of Helsinki.

Cytogenetic and FISH analyses

Cytogenetic and FISH studies were performed according to the standard methods used in our laboratory.¹⁵ Seven hundred and seventeen samples from 716 patients were analyzed by cytogenetics and FISH with LSI5q31 (EGR1)/D5S23, D5S21 probe (Abbott Molecular Inc, Des Plaines, IL, USA) at the individual centers. In two cases, whole chromosome 5 and 6 painting (Metasystems GmbH, Altlussheim, Germany) was also performed. These studies were carried out on bone marrow cells from 24-hour cultures. For FISH studies, between 100 and 400 nuclei were analyzed in order to detect the 5q deletion and/or monosomy 5. At least ten metaphases were analyzed for the painting study.

The cut-off value established to consider a sample as 5q- positive by FISH varied among the centers, from 3% to 10%. The cut-off was defined as the average plus two or three standard deviations analyzing 10-20 peripheral blood or bone marrow control samples and 200-500 nuclei.

Statistical methods

In order to analyze differences between the proportion of cells with 5q deletion detected by conventional banding cytogenetics and FISH, a statistical analysis called *one-way intraclass correlation coefficient* was applied. This test assesses rating reliability by comparing the variability of different ratings of the same subject to the total variation across all ratings and all subjects; the result is a value between zero and one: zero is indicative of no concordance between FISH and cytogenetic results, while one indicates complete concordance.

Results

Group A: no evidence of 5q- by conventional banding cytogenetics

When FISH for 5q31 was applied in the 637 cases in which the cytogenetic study had not revealed 5q-, the 5q deletion was detected in 38 patients (5.96%). The results are shown in Table 2, which presents the percentage of 5q deletion detected by FISH in different groups divided according to the results of conventional banding cytogenetics: normal karyotype (in 20 or less metaphases) (2.7%), no metaphases or not evaluable (due to the poor morphology of chromosomes)

Table 1. FAB and WHO diagnoses of myelodysplastic syndromes patients included in the present study.

FAB classification	Group A n=637, n (%)	Group B n=79, n (%)	WHO classification	Group A n=500, n (%)	Group B n=55, n (%)
RA	214 (33.6)	32 (40.5)	RA	69 (13.8)	1 (1.8)
RARS	160 (25.1)	6 (7.6)	RARS	82 (16.4)	0
RAEB	145 (22.8)	20 (25.3)	'5q- syndrome'	16 (3.2)	25 (45.4)
RAEB-t	18 (2.8)	0	RCMD	95 (19)	7 (12.7)
CMML	53 (8.3)	1 (1.2)	RCMD-RS	46 (9.2)	3 (5.4)
MDS-U	10 (1.6)	0	RAEB-1	50 (10.2)	12 (21.8)
Unknown	37 (5.8)	20 (25.3)	RAEB-2	62 (12.4)	6 (10.9)
			MDS-U	14 (2.8)	0
			MDS/MPD CMML	39 (7.8)	1 (1.8)
			MDS/MPD,U-RARS associated with marked thrombocytosis	6 (1.2)	0
			MDS/MPD no CMML	2 (0.4)	0
			AML	18 (3.6)	0

RA: refractory anemia; RARS: refractory anemia with ringed sideroblasts; RAEB: refractory anemia with excess of blasts; RAEB-t: refractory anemia with excess of blasts in transformation; CMML: chronic myelomonocytic leukemia; MDS-U: MDS unclassifiable; RCMD: refractory cytopenia with multilineage dysplasia; RCMD-RS: refractory cytopenia with multilineage dysplasia with ringed sideroblasts; MDS/MPD: myelodysplastic/myeloproliferative disease; AML: acute myeloid leukemia.

Table 2. Cytogenetic and FISH 5q31 data from cases without evidence of 5q- by conventional banding cytogenetics (group A).

Conventional banding cytogenetics result	Cases (n=637)	5q31-, n (%)	FISH result	
			-5, n (%)	+5, n (%)
Normal CBC (20 metaphases)	324	9 (2.7)	0	1 (0.3)
Normal CBC (10-19 metaphases)	107	2 (1.9)	0	0
Normal CBC (1-9 metaphases)	43	2 (4.6)	0	0
CBC without metaphases	54	11 (20.4)	0	0
Abnormal CBC with chromosome 5 affected	11	9 (81.8)	0	0
Abnormal CBC without chromosome 5 affected	98	5 (5.1)	1 (1)	0

(20.4%) and abnormal karyotype (with chromosome 5 affected, 81.8%, or not, 5.1%).

Two cases are worth noting. The first one (#39) is a patient diagnosed as having RAEB/RAEB-1 and multiple myeloma, who presented a complex karyotype with no aberration of chromosome 5. FISH analysis revealed monosomy of chromosome 5 (in 18% of nuclei), which had not been observed by cytogenetics. FISH analysis in eight metaphases did not reveal the monosomy 5. The second case (#40) is a patient, diagnosed with RARS/RCMD-RS and multiple myeloma,

who presented a trisomy 5 (49% of nuclei); this aberration had not been seen by cytogenetics (46,XY[20]). FISH did not reveal trisomy 5 in either of the two metaphases analyzed (Table 3).

Table 3 shows the diagnostic morphological and cytogenetic data of cases in which the 5q deletion was detected by FISH. A high number of these patients had RA (17/38, 44.7%) or RAEB (10/38, 26.3%), according to the FAB classification. As regards the WHO classification, the majority of the positive cases (16/38, 42.1%) had '5q- syndrome'.

Table 3. Morphological and cytogenetic data from myelodysplastic syndromes patients with a 5q alterations detected only by FISH.

Case	FAB	WHO	Karyotype by conventional banding cytogenetics	Percentage of aberrant nuclei %	Metaphase FISH analysis (altered/total metaphases analyzed)	'5q- syndrome' morphology
1	RAEB	5q- syndrome	No metaphases	35	NA	Unknown
2	RA	5q- syndrome	No metaphases	42	NA	Unknown
3	RAEB	5q- syndrome	No metaphases	95	NA	Unknown
4 ^a	RAEB-t	AML	46,XX,add(2)(p22),-5,-11,del(12)(q13),add(18)(q23),add(19)(q13),+2mar[20]	99	NA	Unknown
5	RARS	RCMD-RS	47,XY,der(5)t(5:17)(q10q10),del(7)(q33),+8,der(12)t(12:13)(p13;q13)[18]/46,XY[2]	90	NA	Unknown
6	RA	5q- syndrome	N20	30	NA	Unknown
7	RAEB	RAEB-2	46,XY,t(11;17)(q24;q21)[3]/46,XY[12]	90	NA	Unknown
8	RA	-	N20	18	NA	Unknown
9	RAEB	-	N20	60	NA	Unknown
10	RA	5q- syndrome	N1-9	20	NA	Unknown
11	RA	5q- syndrome	N10-19	85	NA	Unknown
12	RA	5q- syndrome	N20	54	NA	Unknown
13	RAEB	RAEB-1	46,XX,der(5),t(5;6)(q13;q14),del(6)(q14)[18]/46,XX[2]	90.5	3/5	Unknown
14	RA	5q- syndrome	N20	8	1/20	Unknown
15 ^a	RAEB-t	AML	45,XY,del(1)(q11),-5,add(7)(q36),der(21)t(1;21)(q22;q35)[13]/46,XY[4]/ polyploid(id.add12p)[3]	87	10/10	Unknown
16	RA	-	N20	25	1/3	Unknown
17	RA	5q- syndrome	N1-9	66	3/7	Unknown
18	RAEB	-	46,XX,-7,+G[18]/46,XX[2]	25	2/10	Unknown
19	RA	5q- syndrome	46,XY,del(1)(p34)[4]/46,XY[9]	5	0/20	Yes
20	RA	5q- syndrome	Not evaluable	70	NA	Yes
21	RA	5q- syndrome	Not evaluable	62	NA	Yes
22	RA	5q- syndrome	Not evaluable	52	NA	Yes
23	RAEB	RAEB-2	50,XX,+1,+8,+11,add(11)(p13),+mar [15]/46,XX [7]	53.5	NA	No
24	RAEB	-	49,XY,+2,+3,-7,+12,+mar [12]/46,XY[6]	72.5	NA	No
25	RAEB	RAEB-2	No metaphases	44.5	NA	No
26	RA	5q- syndrome	N20	50	3/3	Yes
27	RARS	5q- syndrome	No metaphases	21	NA	Yes
28	RAEB	RAEB-2	N20	14	1/1	Yes
29	RA	5q- syndrome	N10-19	18	6/7	Yes
30	RA	RA	No metaphases	7	NA	No
31	RA	CRDM	No metaphases	30	NA	Yes
32	CMML	MDS/MPD CMML	46,XY,t(3;5)(p21;q14) [11]	50	NA	No
33 ^a	Unknown	-	45,X,-Y[21]/42,XY,-5,-7,-8,t(15;?)(p13;?),-16,-17,add(17)(p13),+mar[21]/46,XY[8]	53.5	10/10	Unknown
34 ^a	Unknown	-	45,XY,-5,-17,-21,+2mar[21]/46,XY[9]	68	5/7	Unknown
35 ^a	Unknown	-	47,X,add(Y)(q12),-5,-15,-17,-18,-21,+22,+5mar[22]/46,XY[8]	35	4/10	Unknown
36 ^a	Unknown	-	45,XX,-4,-5,-12,-17,+3mar[4]/46,XX[26]	38.5	3/10	Unknown
37	Unknown	-	No metaphases	40	NA	Unknown
38	Unknown	-	N20	6	2/11	Unknown
39 ^b	RAEB+MM	RAEB-1+MM	46,XX,add(11)(q25),del(16)(q22),+19,-21,del(22)(q11)[15]/47,XX,der(7),add(11)(q25),del(16)(q22),+19,-21,del(22)(q11),+r[3]/92,XXX,id,+r,+r[1]/46,XX[6]	18	0/8	Unknown
40 ^c	RARS+MM	RCMD-RS+MM	N20	49	0/2	Unknown

N20: normal karyotype in 20 metaphases; N10-19: normal karyotype in 10-19 metaphases; N1-9: normal karyotype in 1-9 metaphases; NA: not available; MM: multiple myeloma. ^aThese patients showed, by conventional banding cytogenetics, a monosomy of chromosome 5 but FISH demonstrated a deletion of 5q. ^bCase with monosomy 5. ^cCase with trisomy 5.

In FISH 5q- positive cases, the available FISH slides were reassessed in order to analyze the 5q- chromosome in metaphases. In 7 of 13 cases with normal karyotype and 5q- detected by FISH, the FISH slides were reviewed and metaphases with 5q deletion were detected (the results are shown in Table 3). Among five cases showing an abnormal karyotype with no involvement of chromosome 5, two cases were re-evaluated looking for metaphases. In one of them, two out of ten metaphases presented 5q-, whereas, in the other case the 5q- was not detected in any of 20 metaphases. In six of nine cases with an abnormal karyotype and chromosome 5 involved, the reanalyzed metaphases showed 5q-.

Two of these cases are worth particular comment. The first one (#15) is a patient with RAEB-t/AML who had monosomy 5 according to cytogenetic analysis but the FISH study revealed only a deletion of 5q31. The metaphase analysis showed two chromosomes with a similar size, one of them with a 5q31 deletion. Whole chromosome painting for chromosome 5 was also performed; it revealed one normal chromosome 5 and another one with a portion of chromosome 5, this marker chromosome could not be identified. The other interesting case (#13), at the time of diagnosis of RAEB/RAEB-1, had, according to cytogenetic analysis, a translocation involving chromosome 5. The interphase analysis of FISH 5q revealed a deletion of the 5q31 region. The deletion was also observed when analyzing the metaphases. Whole chromosome painting of chromosomes 5 and 6 was carried out in order to confirm the t(5;6). The whole FISH studies enabled the patient's cytogenetic profile to be defined as: 46,XX,der(5)t(5;6)(q13;q14),der(6)t(5;6)(q33;q14)[18]/ 46,XX[2].

Fourteen cases were referred with a cytologic diagnosis of '5q- syndrome' without evidence of 5q- by cytogenetics; among them, nine (cases #19, 20, 21, 22, 26, 27, 28, 29 and 31) were found to have the 5q deletion by FISH.

Group B: evidence of 5q- by conventional banding cytogenetics (positive controls)

Seventy-nine samples from patients, whose cytogenetic studies had shown 5q deletion were used as positive controls. In all of them, FISH for 5q31 was performed and confirmed the 5q deletion. We compared the proportion of cells with 5q- detected by conventional banding cytogenetics with that detected by FISH applying a statistical analysis called *one-way intra-class correlation coefficient*. We obtained a value of 0.284, showing a lack of significant concordance in the detection of 5q- by FISH and cytogenetics. Furthermore, this statistical test gave an average 5q- detection of about 58.20±26.62% for conventional banding cytogenetics and 53.85±22.73% for the FISH technique.

We also analyzed the distribution of gender among patients with deletion of 5q, although we only had information about sex for 489 patients. Of 38 patients from group A (5q- evidence by cytogenetics), 10 (26.3%) were male, 14 (36.8%) female and in 14 (36.8%) the gender was unknown (Table 3). Regarding cases with a diagnosis of '5q- syndrome', one was

male (6.25%), seven were female (43.75%) and the gender was unknown for eight (50%). Among 79 patients with 5q- detected by conventional banding cytogenetics (group B), 28 (35.4%) were male and 51 (64.6%) female. Of the cases with '5q- syndrome' (n=25), five (20%) were male and 20 (80%) female.

Discussion

To our knowledge, this is the largest reported series of primary MDS in which 5q deletion was studied by FISH in cases with no evidence of 5q- in the karyotype. In group A, we found 5q31 deletion by FISH in about 6% of the cases. Deletion 5q was observed more frequently in cases with an abnormal karyotype with chromosome 5 involved (81.8%), and in cases with no mitoses or in those that could not be evaluated because of the poor morphology of the chromosomes (20.4%).

Within group A, among the cases with a normal karyotype (n=474), FISH detected 5q- in 13 cases (2.7%). Our results are in agreement with those of previous studies (Table 4) in which the FISH technique detected the 5q deletion in 0% to 14% of cases.¹⁶⁻²² The percentage of 5q- detection differed depending whether metaphases or interphase nuclei were studied. This could be related to a different rate of mitoses in cells carrying or not the 5q deletion. We tried to provide support for this hypothesis by analyzing metaphases from the FISH slides (only seven of 13 cases could be assessed): all of them presented some metaphases with the 5q deletion. This might indicate that the finding of the deletion in the FISH analysis, but not in the conventional banding cytogenetic study, could be due to the number of cells analyzed rather than a cryptic deletion. This explanation could be applied to case #40 in which a trisomy 5 was detected by FISH while cytogenetics showed a normal karyotype in 20 metaphases.

It is interesting to note that in our series a high percentage of the cases of 5q- detected by FISH were in those cases without mitoses or which were not evaluable (20.4%). This might be because the 5q- clone could have a low proliferation and a high apoptotic rate. Nevertheless, when Washington *et al.* studied

Table 4. Comparison of FISH findings with those of previous series of myelodysplastic syndromes with normal cytogenetic results.

Author	N.	FISH 5q-/5, n. (%)	Region analyzed
Rigolin <i>et al.</i> ¹⁶ (2001)	101	5 (5)	5q31
Shen <i>et al.</i> ¹⁷ (2001)	48	6 (12.5)	5q31
Ketterling <i>et al.</i> ¹⁸ (2002)	31	0	5q31 (EGR1)
Cherry <i>et al.</i> ¹⁹ (2003)	29	0	5q31 (EGR1)
Bernasconi <i>et al.</i> ²⁰ (2003)	57	2 (3.5)	5q31 (EGR1)
Beyer <i>et al.</i> ²¹ (2004)	17	0	PAC 144G9 (5q31)
Yilmaz <i>et al.</i> ²² (2005)	21	3 (14.3)	5q31 (EGR1)
Present series (2008)	474	13 (2.7)	5q31 (EGR1)

apoptosis in '5q- syndrome' and other RA, they found significantly lower rates of apoptosis in bone marrow cells isolated from patients with '5q- syndrome' than in the cells from patients with other RA.²³ Our hypothesis about the proliferation and the apoptotic rate of cells with 5q- is speculation based on our findings comparing cytogenetics and FISH results and further studies are needed to understand the behavior of cells that carry the 5q deletion.

It is noteworthy that nine cases with an abnormal karyotype involving chromosome 5 were found to have the 5q31 deletion when studied by FISH. Indeed, in our series we have six cases with a complex karyotype that showed monosomy 5. Five (cases #4, 32, 33, 34 and 35) of them had marker chromosomes in the conventional banding cytogenetic studies and were identified by FISH as 5q- chromosomes (see Table 3). The other case (#15) presented a monosomy 5 by conventional banding cytogenetics but no marker chromosomes. The FISH analysis revealed 5q deletion in interphase nuclei and in metaphases as well. Whole chromosome 5 painting showed a normal chromosome 5 and another chromosome with material from both chromosome 5 and of unknown origin.

Several studies have shown the usefulness of molecular cytogenetic techniques, such as spectral karyotyping (SKY) or multicolor FISH (M-FISH) and FISH to define abnormal karyotypes involving chromosome 5 or presenting with monosomy 5.²⁴⁻²⁹ These studies demonstrate that FISH analysis can provide additional information about chromosome 5 abnormalities. It would, therefore, be recommendable to use FISH techniques to study those cases with monosomy 5 and/or marker chromosomes in order to identify translocations with a breakpoint in 5q or possible 5q- chromosomes.

Returning to our series, three cases (#5, 13 and 32) showing a translocation involving chromosome 5 by cytogenetics were all found to have 5q31 deletion by FISH. FISH analysis of metaphases was not available for cases #5 and 32, while for patient #13, the FISH analysis revealed 90.5% of deleted nuclei and whole chromosome 5 painting helped to redefine the karyotype. These findings suggest that in cases with an abnormal karyotype involving chromosome 5 (and no evidence of 5q- by cytogenetics) it should be mandatory to apply FISH of the 5q31 region in order to detect interstitial deletions.

In our series, 5% of cases with 5q- by FISH had an abnormal karyotype without involvement of chromosome 5. Among them, two patients (cases #23 and 24) showed a complex karyotype without evidence of 5q- but by conventional banding cytogenetics had marker chromosomes. These could have been 5q- chromosomes, and this hypothesis could have been confirmed by analyzing metaphases from FISH slides but, unfortunately, this was not possible in either of the cases.

Three cases (#7, 18 and 19) had an abnormal karyotype without evidence of 5q-; these findings could suggest the presence of two clones: one with 5q- and another one with an abnormal karyotype. A similar hypothesis could explain the case previously men-

tioned (#39) which presented with an abnormal karyotype with two normal chromosomes 5 and monosomy 5 by FISH. This might have been confirmed by analyzing more metaphases. In one case (#18), with available fixed material, the conventional banding cytogenetic analysis was performed again and no 5q- chromosome was identified. We could assume that there were two clones, one with '-7, +G' and another one with 5q-. Two groups have studied cytogenetics of unrelated clones in MDS. The most commonly encountered abnormalities in the unrelated clones in patients with RA were del(5q), +8 and -7. Aberrations such as +8 and 5q- could be secondary abnormalities that develop during tumor progression.³⁰⁻³¹

In the present study, we also used FISH to analyze 79 cases with a karyotype which had presented 5q- (group B). FISH confirmed the deletion in all cases. Regarding the proportion of cells with 5q- detected by cytogenetics and FISH, a previous study affirmed that the percentage of cells with 5q deletion detected by cytogenetics was usually lower than that detected by FISH. Nevertheless, the authors pointed out that FISH cannot be a substitute for conventional banding cytogenetics.³² According to our experience the 5q deletion can be correctly identified by both techniques, but, due to the small differences in the mean percentage of deletion 5q cells detected by cytogenetics and FISH; we cannot conclude that one technique had a higher sensitivity than the other.

In patients with 5q- detected by FISH (from group A), we were not able to compare the proportion of females and males due to the fact that gender was unknown for 14 of the patients. With regards to patients with the diagnosis of '5q- syndrome', we were able to assume a high predominance of females although there are eight patients with this diagnosis for whom we do not know the gender. We were, however, able to assess the sex ratio within group B because we had gender information for all these patients: there were more females (64.6%) than males. Examining gender distribution in patients with the '5q- syndrome', we found that 80% of these patients were female. This is in agreement with the well-known female predominance of '5q- syndrome'.³³

In nine cases, which were referred with the cytologic diagnosis of '5q- syndrome' without evidence of 5q- by cytogenetics, the 5q deletion was detected by FISH. In these cases, FISH helped to make the definitive diagnosis, which must be based on the presence of the cytogenetic anomaly.

Conventional banding cytogenetics and FISH techniques are both able to detect del(5q). FISH is a good technique to find the 5q deletion and it has a similar efficacy to cytogenetics. Even so, it has some limitations; it can only detect anomalies that its probes are designed to detect. FISH should not be used alone at diagnosis because of the clinical implication of the karyotype;^{4,8,10,34} it is a complementary technique to achieve a more accurate cytogenetic analysis.

In conclusion, taking into account our results in a large series of cases of primary MDS studied by FISH,

we consider that it is mandatory to apply FISH of 5q31 to detect 5q deletion in cases with an abnormal karyotype involving chromosome 5 and in cases without metaphases or that are not evaluable. In cases with a normal karyotype or an abnormal karyotype without evidence of 5q-, it would be recommendable to apply FISH in order to confirm the morphological diagnosis of '5q- syndrome' and to diagnose MDS patients with 5q deletion. Both groups of patients could be candidates for treatment with lenalidomide.

Authorship and Disclosures

MM contributed to the conception and design of the study, acquisition, analysis and interpretation of data, drafting the article and revising it critically for important intellectual content, and gave final approval of the ver-

sion to be published. LA, BE, MS, JMH, EL, MdR, EA, SR, PF, OG, MR, JC, ES, GFS, EL, CS, MG, MJC, JM, CG-B, VA, RC, IO, FC, EB, AI, LY, MJM, EG-B, RA, PL, VG, AS, NC, EM, AA, MLM, CP, SS, and LF: referred cases and revised the final version of the manuscript. The order of the authorship was based on the contribution of each author to the design of the study, data interpretation and writing of the manuscript. FS: contributed to the study design, data interpretation, supervised the whole study and wrote and revised the last version of the manuscript. All authors approved the version to be published. The authors also reported no potential conflicts of interest. Cytogenetics and some clinical information concerning some of the patients included in the present study have been previously reported (ref. #8). Preliminary findings of this study were presented at the 49th Annual Meeting of the Asociación Española de Hematología y Hemoterapia, Pamplona, October 25-27, 2007.

References

- Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (eds). Pathology and Genetics. Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press, 2001.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnik HR, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1982; 51:189-99.
- Sanz GF, Sanz MA, Vallespí T, del Cañizo MC, Torrabadella M, García S, et al. Two regression models and a scoring system for predicting survival and planning treatment in myelodysplastic syndromes: a multivariate analysis of prognostic factors in 370 patients. *Blood* 1989;74:395-408.
- Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997;89:2079-88.
- Bennett JM, Komrokji RS. The myelodysplastic syndromes: diagnosis, molecular biology and risk assessment. *Hematology* 2005;10:258-69.
- Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, Della Porta M, Pascutto C, Invernizzi R, et al. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 2007;25:3503-10.
- Solé F, Espinet B, Sanz G, Cervera J, Calasanz MJ, Luño E, et al. Incidence, characterization and prognostic significance of chromosomal abnormalities in 640 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 2000;108:346-56.
- Solé F, Luño E, Sanzo C, Espinet B, Sanz GF, Cervera J, et al. Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2005;90:1168-78.
- Bernasconi P, Klersy C, Boni M, Cavigliano PM, Calatroni S, Giardini I, et al. World Health Organization classification in combination with cytogenetic markers improves the prognostic stratification of patients with de novo primary myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 2007;137:193-205.
- Haase D, Germing U, Schanz J, Pfeilstocker M, Nosslinger T, Hildebrandt B, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* 2007;110:4385-95.
- Heim S, Mitelman F. Chromosome abnormalities in the myelodysplastic syndromes. *Clin Haematol* 1986; 15:1003-21.
- Nimer SD. Clinical management of myelodysplastic syndromes with interstitial deletion of chromosome 5q. *J Clin Oncol* 2006;24:2576-82.
- List A, Kurtin S, Roe DJ, Buresh A, Mahadevan D, Fuchs D, et al. Efficacy of lenalidomide in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* 2005;352:549-57.
- List A, Dewald G, Bennett J, Giagounidis A, Raza A, Feldman E, et al. Myelodysplastic Syndrome-003 Study Investigators. Hematologic and cytogenetic response to lenalidomide in myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *N Engl J Med* 2006;355:1456-65.
- Solé F, Salido M, Espinet B, Garcia JL, Martinez Climent JA, Granada I, et al. Splenic marginal zone B-cell lymphomas: two cytogenetic subtypes, one with gain of 3q and the other with loss of 7q. *Haematologica* 2001;86:71-7.
- Rigolin GM, Bigoni R, Milani R, Cavazzini F, Roberti MG, Bardi A, et al. Clinical importance of interphase cytogenetics detecting occult chromosome lesions in myelodysplastic syndromes with normal karyotype. *Leukemia* 2001;15:1841-7.
- Shen Y, Xue Y, Li J. [Detection of -5/5q-chromosome abnormality in myelodysplastic syndromes by interphase fluorescence in situ hybridization] [article in Chinese, with English abstract]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2001;22:517-9.
- Ketterling RP, Wyatt WA, VanWier SA, Law M, Hodnefield JM, Hanson CA, et al. Primary myelodysplastic syndrome with normal cytogenetics: utility of 'FISH panel testing' and M-FISH. *Leuk Res* 2002;26:235-40.
- Cherry AM, Brockman SR, Pateroster SF, Hicks GA, Neuberg D, Higgins RR, et al. Comparison of interphase FISH and metaphase cytogenetics to study myelodysplastic syndrome: an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) study. *Leuk Res* 2003;27:1085-90.
- Bernasconi P, Cavigliano PM, Boni M, Calatroni S, Klersy C, Giardini I, et al. Is FISH a relevant prognostic tool in myelodysplastic syndromes with a normal chromosome pattern on conventional cytogenetics? A study on 57 patients. *Leukemia* 2003; 17:2107-12.
- Beyer V, Castagné C, Mühlematter D, Parlier V, Gmür J, Hess U, et al. Systematic screening at diagnosis of -5/del(5)(q31), -7, or chromosome 8 aneuploidy by interphase fluorescence in situ hybridization in 110 acute myelocytic leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome patients: concordances and discrepancies with conventional cytogenetics. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;152:29-41.
- Yilmaz Z, Sahin FI, Kizilkilic E, Karakus S, Boga C, Ozdogu H. Conventional and molecular cytogenetic findings of myelodysplastic syndrome patients. *Clin Exp Med*

- 2005;5:55-9.
23. Washington LT, Jilani I, Estey E, Albitar M. Less apoptosis in patients with 5q-syndrome than in patients with refractory anemia. *Leuk Res* 2002;26:899-902.
 24. Kakazu N, Taniwaki M, Horiike S, Nishida K, Tatekawa T, Nagai M, et al. Combined spectral karyotyping and DAPI banding analysis of chromosome abnormalities in myelodysplastic syndrome. *Genes Chrom Cancer* 1999;26:336-45.
 25. Lindvall C, Nordenskjöld M, Porwit A, Björkholm M, Blennow E. Molecular cytogenetic characterization of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes with multiple chromosome rearrangements. *Haematologica* 2001;86:1158-64.
 26. Van Limbergen H, Poppe B, Michaux L, Herens C, Brown J, Noens L, et al. Identification of cytogenetic subclasses and recurring chromosomal aberrations in AML and MDS with complex karyotypes using M-FISH. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;33:60-72.
 27. Bram S, Swolin B, Rödger S, Stockelberg D, Ogård I, Bäck H. Is monosomy 5 an uncommon aberration? Fluorescence in situ hybridization reveals translocations and deletions in myelodysplastic syndromes or acute myelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;142:107-14.
 28. Trost D, Hildebrandt B, Beier M, Müller N, Germing U, Royer-Pokora B. Molecular cytogenetic profiling of complex karyotypes in primary myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2006;165:51-63.
 29. Herry A, Douet-Guilbert N, Morel F, Le Bris MJ, De Braekeleer M. Redefining monosomy 5 by molecular cytogenetics in 23 patients with MDS/AML. *Eur J Haematol* 2007;78:457-67.
 30. Heim S, Mitelman F. Cytogenetically unrelated clones in hematological neoplasms. *Leukemia* 1989;3:6-8.
 31. Musilová J, Michalová K, Zemanová Z, Brezinová J. Multiple unrelated clones in myelodysplastic syndrome and in acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1996;88:141-3.
 32. Zou YS, Fink SR, Stockero KJ, Paternoster SF, Smoley SA, Tun HW, et al. Efficacy of conventional cytogenetics and FISH for EGR1 to detect deletion 5q in hematological disorders and to assess response to treatment with lenalidomide. *Leuk Res* 2007;31:1193-7.
 33. Giagounidis AA, Germing U, Haase S, Hildebrandt B, Schlegelberger B, Schoch C, et al. Clinical, morphological, cytogenetic, and prognostic features of patients with myelodysplastic syndromes and del(5q) including band q31. *Leukemia* 2004;18:113-9.
 34. Bernasconi P, Klersy C, Boni M, Cavigliano PM, Giardini I, Rocca B, et al. Incidence and prognostic significance of karyotype abnormalities in de novo primary myelodysplastic syndromes: a study on 331 patients from a single institution. *Leukemia* 2005;19:1424-31.

2. Treball II: Impacte de les alteracions citogenètiques acompanyants per a l'estratificació pronòstica en els pacients amb síndrome mielodisplàstica i deleció 5q

La deleció 5q (amb o sense alteracions addicionals) es troba present en el 10-15% de les SMD *de novo*. La presència d'alteracions addicionals i/o excés de blastes disminueix la SG. L'objectiu principal d'aquest segon treball va ser determinar les característiques i història natural d'una sèrie llarga de pacients amb SMD *de novo* i deleció 5q per identificar factors pronòstics.

Es van recollir **541** pacients amb diagnòstic de SMD primari i deleció 5q per CC (en un mínim de 10 metafases). Es va recollir el diagnòstic FAB i, en cas de ser possible, també segons la classificació OMS 2001. A més, es va incloure edat, sexe, característiques de la malaltia al moment del diagnòstic per poder relacionar-ho amb la SG i l'evolució a LMA. També es va fer una classificació citogenètica basant-se en la detecció d'alteracions citogenètiques addicionals (nombre i estatus -alteració acompanyant única o dins d'un cariotip complex-).

L'anàlisi estadístic es va portar a terme amb l'objectiu de comparar valors entre diferents grups, així com determinar la mediana de SG i la probabilitat de transformació a LMA.

La sèrie de 541 pacients incloïa 183 homes i 358 dones, amb una mediana d'edat de 68 anys. Des del punt de vista citogenètic: 299 (55,3%) presentaven deleció aïllada de 5q, 93 (17,2%) deleció de 5q amb una alteració acompanyant; i 149 (27,5%) deleció de 5q dins d'un cariotip complex. Les alteracions més freqüents (no formant part d'un cariotip complex) eren: deleció de 12p, trisomia 21, trisomia 8 i deleció de 20q. Deu casos presentaven clons no relacionats.

Els punts de trencament de la deleció 5q (analitzats en 383 pacients) més freqüents eren: q13q33, q13q31 i q22q33.

Comparant les SMD amb dos o més alteracions acompanyants al 5q- (5q- + ≥ 2), amb els que presenten una única alteració acompanyant (5q- + 1) o la deleció aïllada (5q-) es van observar diferències significatives de: sexe, plaquetes, recompte absolut de neutròfils i presència de citopènies (0-3), percentatge de blastes a MO i percentatge de metafases amb del(5q). També es van observar diferències de diagnòstic entre els dos

grups: en el grup de 5q- el diagnòstic més freqüent era: AR i AREB o “Síndrome 5q-”, seguit d’AREB-1 i AREB-2; en el grup de 5q- + 1, els diagnòstics més freqüents eren AR i AREB, o AREB-2 i CRDM; per últim, en el grup de cariotip complex, l’entitat més freqüent era AREB, ja fos AREB-1 o AREB-2.

Els estudis d’**impacte sobre la SG** es van portar a terme en 512 pacients (94,6% de la sèrie, dels quals es disposava informació de seguiment) i la **probabilitat actuarial d’evolució a LMA** als 5 anys en 299 pacients (55,3%). La mediana de seguiment era de 17,2 mesos i la mediana de SG de 36,8 mesos. Seixanta-sis pacients van evolucionar a LMA i la probabilitat d’evolució als 5 anys era del 38,8%. En la sèrie global, la SG i l’evolució a LMA estava influïda per: edat, sexe, plaquetes, nombre de citopènies, percentatge de blastes a MO, diagnòstic, estratificació segons índex IPSS, el nombre d’alteracions addicionals a la deleció 5q i el percentatge de metafases amb del(5q). La concentració d’hemoglobina i el punt de trencament de la deleció únicament tenia efecte sobre la SG. Es va observar com el punt de trencament q22q33 tenia menor mediana de SG (24 vs. 40,9 mesos) però la diferència no era significativa ($P=0,228$).

Respecte l’**efecte de les alteracions addicionals** sobre la SG es distingeixen dos grans grups: 5q- (63,4 mesos) i 5q- + 1 (46,0 mesos) vs. 5q- + ≥ 2 (6,8 mesos) ($P<0,001$). No s’observaven diferències significatives ($P=0,131$) entre el grup 5q- i el grup 5q- + 1. En canvi, respecte l’evolució a LMA als 5 anys s’observen tres grups: 5q- (21,1%) vs. 5q- + 1 (57,6%) vs. 5q- + ≥ 2 (84,0%) ($P<0,001$). El bon pronòstic de presentar una única alteració addicional no es manté en termes d’evolució a LMA i, malauradament, no es va poder determinar quina alteració acompanyant única conferia pitjor pronòstic donat el baix nombre de casos amb les diferents alteracions, tot i això, els casos amb -7/7q- presentaven menor SG encara que no estadísticament significativa. Aquests grups citogenètics amb impacte pronòstic (dos grups per SG i tres per evolució a LMA) es mantenen si es restringeix l’anàlisi als casos amb menys de 5% i menys de 10% de blastes en MO, el que indica el fort impacte pronòstic de les alteracions citogenètiques en les SMD amb deleció 5q.

L’anàlisi multivariant va mostrar l’impacte pronòstic independent en termes de SG i d’evolució a LMA de: la citogenètica, plaquetes amb punt de tall de $150 \times 10^9/L$ i percentatge de blastes a MO. L’edat (<60 vs. ≥ 60 anys) i el sexe mostraven impacte pronòstic sobre la SG.

La “**Síndrome 5q-**” es considera una entitat diferent a la resta de SMD: presenten major recompte absolut de neutròfils, plaquetes i, en conseqüència, menys citopènies. També es va observar que presentaven menys proporció de metafases amb la deleció 5q (70% vs. 90%).

La mediana de SG era de 65,9 mesos i la probabilitat d’evolució a LMA als 5 anys era del 12,1% (n=140). Els factors amb efecte advers sobre la SG eren: gènere masculí, edat superior a 60 anys i plaquetes $\leq 150 \times 10^9/L$. L’anàlisi multivariant va mostrar que el factor més important era el recompte de plaquetes seguit de l’edat. Aquests resultats no es van complir en l’evolució a LMA.

Per últim, l’estudi restringit a les **SMD de risc baix o intermedi-1** no mostrava diferències de SG o evolució a LMA. L’impacte pronòstic dels dos grups citogenètics es conservava en les SMD de la nostra sèrie de risc intermedi-1 així com l’edat i les plaquetes. Respecte evolució a LMA, tenien impacte pronòstic les tres categories citogenètiques i el sexe.

La principal troballa d’aquest estudi és l’impacte pronòstic de les alteracions addicionals a la deleció 5q, així com l’efecte pronòstic de les plaquetes i l’edat en la “**Síndrome 5q-**”. Aquests resultats poden ser de gran ajuda a clarificar les controvèrsies entorn a l’aprovació de la lenalidomida per part de l’Agència Europea del Medicament.

ORIGINAL ARTICLE

Impact of adjunct cytogenetic abnormalities for prognostic stratification in patients with myelodysplastic syndrome and deletion 5q

M Mallo^{1,2,3,12}, J Cervera^{1,3,12}, J Schanz⁴, E Such^{1,3}, G García-Manero⁵, E Luño^{1,3}, C Steidl⁴, B Espinet¹, T Vallespi^{1,3,6}, U Germing⁴, S Blum⁷, K Ohyashiki^{8,9}, J Grau^{1,3}, M Pfeilstöcker⁴, JM Hernández^{1,3}, T Noesslinger⁴, A Giagounidis⁴, C Aul⁴, MJ Calasanz^{1,3}, ML Martín^{1,3}, P Valent¹⁰, R Collado^{1,3}, C Haferlach^{9,11}, C Fonatsch⁴, M Lübbert⁴, R Stauder⁴, B Hildebrandt⁴, O Krieger⁴, C Pedro³, L Arenillas³, MÁ Sanz³, A Valencia^{1,3}, L Florensa³, GF Sanz^{3,13}, D Haase^{4,9,13} and F Solé^{1,2,3,9,13}

¹Spanish Haematological Cytogenetics Working Group, Spain; ²Faculty of Life Sciences, Department of Cell Biology, Physiology, and Immunology, Autonomous University of Barcelona, Bellaterra, Spain; ³Spanish MDS Registry Group, Spain; ⁴German–Austrian MDS Study Group, Germany and Austria; ⁵Department of Leukemia, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, USA; ⁶International Working Group on Morphology of MDS (MDS Foundation); ⁷Hematology Service, University Hospital Vaudois, Lausanne, Switzerland; ⁸Division of Hematology, The First Department of Internal Medicine, Tokyo Medical University, Tokyo, Japan; ⁹International Working Group on MDS Cytogenetics (MDS Foundation); ¹⁰Department of Medicine I, Medical University of Vienna, Vienna, Austria and ¹¹Munich Leukemia Laboratory, Munich, Germany

This cooperative study assessed prognostic factors for overall survival (OS) and risk of transformation to acute myeloid leukemia (AML) in 541 patients with *de novo* myelodysplastic syndrome (MDS) and deletion 5q. Additional chromosomal abnormalities were strongly related to different patients' characteristics. In multivariate analysis, the most important predictors of both OS and AML transformation risk were number of chromosomal abnormalities ($P < 0.001$ for both outcomes), platelet count ($P < 0.001$ and $P = 0.001$, respectively) and proportion of bone marrow blasts ($P < 0.001$ and $P = 0.016$, respectively). The number of chromosomal abnormalities defined three risk categories for AML transformation (del(5q), del(5q) + 1 and del(5q) + ≥ 2 abnormalities) and two for OS (one group: del(5q) and del(5q) + 1; and del(5q) + ≥ 2 abnormalities, as the other one); with a median survival time of 58.0 and 6.8 months, respectively. Platelet count ($P = 0.001$) and age ($P = 0.034$) predicted OS in patients with '5q-syndrome'. This study demonstrates the importance of additional chromosomal abnormalities in MDS patients with deletion 5q, challenges the current '5q-syndrome' definition and constitutes a useful reference series to properly analyze the results of clinical trials in these patients.

Leukemia (2011) 25, 110–120; doi:10.1038/leu.2010.231; published online 30 September 2010

Keywords: '5q-syndrome'; cytogenetics; deletion 5q; myelodysplastic syndromes

Introduction

Myelodysplastic syndromes (MDS) are a group of clonal hematopoietic stem cell diseases characterized by dysplasia and ineffective hematopoiesis in one or more myeloid cell lines. MDS is associated with a variable overall survival (OS) and a relatively high risk of progression to acute myeloid leukemia (AML). Evolution to AML and the clinical consequences of cytopenias are main causes of morbidity and mortality in MDS.^{1–3}

Although many specific chromosomal abnormalities have been associated with MDS, partial or complete deletion of the long arm of chromosome 5 (deletion 5q), with or without additional karyotypic abnormalities, is present in 10–15% of patients with *de novo* MDS, and thus is the most frequently documented recurrent cytogenetic abnormality in MDS.^{4–8} Outcomes among MDS patients with deletion 5q vary greatly, both in terms of OS and risk of transformation to AML.^{5,8–11} The presence of additional chromosomal abnormalities or an excess of blasts shortens OS and increases the risk of AML transformation.^{5,8,10,11} The '5q-syndrome' is the only MDS group considered to represent a separate cytogenetically defined disease category in the World Health Organization (WHO) classification. Patients with this syndrome, mostly women, are characterized by the presence of isolated deletion 5q, a blast count below 5%, favorable prognosis and a low rate of AML transformation.^{2,3} So far, no other characteristic besides the proportion of bone marrow (BM) blasts and the existence of additional chromosomal abnormalities has been recognized and universally accepted as a predictor of outcome for patients with MDS and deletion 5q.^{10,11} Further, no variable has been shown to impact the clinical course of patients with WHO-defined '5q-syndrome'. Lenalidomide therapy has activity in single-arm clinical trials in patients with International Prognostic Scoring System (IPSS) low or intermediate-1 risk, red blood cell transfusion dependency and deletion 5q,^{12–14} leading to approval by the US Food and Drug Administration for this indication. In contrast, the European Medicines Agency refused approval of lenalidomide for these patients, because there were no historical data against which the safety of lenalidomide could be compared, especially regarding the expected risk of AML transformation.¹⁵ Thus, the analysis of further prognostic parameters for OS and AML transformation in large series of MDS patients with deletion 5q is of importance.

The major aim of this global cooperation study was to assess the characteristics and natural history of a large series of 541 patients with *de novo* MDS and deletion 5q to identify prognostic factors of outcome.

Materials and methods

Patients and diagnostic criteria

A total of 541 patients with primary MDS and deletion 5q, included in the Spanish Haematological Cytogenetic Working

Correspondence: Dr F Solé, Laboratori de Citogenètica Molecular, Servei de Patologia, Hospital del Mar, Passeig Marítim, 25-29, 08003 Barcelona, Spain.

E-mail: fsole@parcdesalutmar.cat

¹²These authors equally contributed to this work.

¹³These authors equally contributed to the coordination of the project. Received 29 April 2010; revised 11 August 2010; accepted 26 August 2010; published online 30 September 2010

Group/Spanish Registry of MDS (234 patients), German–Austrian MDS Study Group (198 patients), MD Anderson Cancer Center (85 patients), Tokyo Medical University (12 patients) and other centers participating in the International Working Group on MDS Cytogenetics (12 patients) databases were the subject of this analysis. Several patients in this study had been included in previously published reports,^{5,9,11} but without focusing on deletion 5q. Cases belonging to the Spanish Haematological Cytogenetic Working Group, Spanish Registry of MDS and MD Anderson Cancer Center were scrutinized and double checked before inclusion for avoiding duplication.

The cases were collected between November 1972 and September 2008. The diagnosis of MDS was made according to the classification proposal of the French–American–British (FAB) study group.¹ Patients with a diagnosis of refractory anemia with excess blasts in transformation or chronic myelomonocytic leukemia by FAB criteria were excluded because they are no longer considered as MDS by the WHO classification system. Whenever possible, patients were reclassified by WHO 2001 criteria.² Patients with an ambiguous diagnosis of MDS and those who had previously received chemotherapy or radiotherapy (therapy-related MDS) were excluded. In all patients included in this study, deletion 5q had been detected by conventional cytogenetics. The cytogenetic analysis of BM specimens was performed at the individual centers following standard chromosome-banding procedures, being cross-validated among centers in previously published studies. Inclusion in the study required the analysis of at least 10 metaphases per case. The criteria defined by the International System for Human Cytogenetic Nomenclature in 2005 were used for identification of abnormal clones.¹⁶ For example, a karyotype was considered complex when more than two independent cytogenetic abnormalities were found. When two or more clones with two aberrations were noted, the patient was categorized in the complex aberration group, whereas patients with two karyotypically independent clones with a single change in one clone and two anomalies in the second one were not considered as complex chromosomal abnormalities. Loss of Y chromosome was considered as one chromosomal abnormality. In this series, an unrelated clone was defined as a clone with cytogenetic aberrations that did not derive from the progenitor clone with the deletion 5q. The unrelated clones were considered as additional aberrations, accompanying the deletion 5q, for the definition of its cytogenetic complexity.¹⁷ All the cytogenetic information corresponding to the German–Austrian MDS Study Group was initially reviewed by JS and DH; and the Spanish Haematological Cytogenetic Working Group/Spanish Registry of MDS cytogenetic information by MM, BE and FS. The final revision was carried out by FS, deleting those cases with incomplete cytogenetic information. The final diagnosis was provided by each institution, all of them with recognized experience in this pathology.

In keeping with the guidelines of the Declaration of Helsinki Principles, this retrospective noninterventional study was conducted with the approval of the internal review board from the participating institutions belonging to each registry/cooperative group/center or following individual institutional guidelines.

Prognostic factors

Different patient and disease characteristics, recorded at the time of diagnosis, were examined in the prognostic factor analysis to establish their possible relationship with OS and AML transformation. Basic demographic data included age and sex. Hematological parameters were hemoglobin level, absolute

neutrophil count (ANC), platelet count, number of cytopenias and proportion of blast cells in BM, all of them taking cutoff points and groups defined by the 1997 IPSS into account.¹⁰ For platelet count, an additional cutoff point of 150×10^9 per liter was analyzed. Initially, we chose to test this value based on the higher platelet count that characterizes the '5q-syndrome' and the low number of patients with severe thrombocytopenia in this subset. After showing its association with prognosis in those patients, we decided to examine its potential impact in the overall series as well.

Classification systems included FAB¹ and WHO 2001² classifications, and IPSS scoring system. The IPSS risk categories considered were those in the original report (low, intermediate-1, intermediate-2 and high).¹⁰ Cytogenetic findings recorded and analyzed were the presence of additional chromosome abnormalities, including the number of additional abnormalities (karyotype complexity) and the most prevalent specific additional abnormalities found (chromosome 1, chromosome 3, -7, 7q-, +8, +11, +13, 12p-, chromosome 17, -18/18q-, 20q-, +21, -X/-Y and unrelated clones, taking into account if they were accompanying deletion 5q as a single additional chromosome abnormality or in the context of a complex karyotype), the proportion of metaphases carrying deletion 5q, and the most frequent break points of the 5q-deleted region (q13q31, q13q33, q22q33, q12q33, q14q34 and other break points). Initially, the number of additional chromosomal abnormalities was grouped into six categories: none (isolated deletion 5q), one, two, three, four and five or more additional abnormalities. After showing that the clinical outcome for patients with two or more additional abnormalities was almost identical, only three cytogenetic categories were considered for all subsequent analysis: isolated deletion 5q, deletion 5q plus one additional abnormality and deletion 5q plus two or more additional abnormalities.

Statistical analysis

Comparisons of proportions and ranks of variables between different groups were performed by χ^2 -test, Fisher's exact test, Student's *t*-test, Mann–Whitney *U*-test or one-way ANOVA with *post hoc* Tukey's test, as appropriate.

The Kaplan–Meier product limit method was used to estimate the probability of OS and risk of AML transformation,^{18–21} OS was measured from hematological diagnosis to death or last follow-up. All deaths, whether related or not to MDS, were considered as the end point of the follow-up interval. Patients treated with intensive AML-type chemotherapy (11 patients), hematopoietic stem cell transplantation (3 patients) or with lenalidomide (3 patients) were considered as censored data at the time of starting treatment, when the starting date of treatment was available. AML transformation was measured from diagnosis to AML development. Patients dying from any cause before developing AML were considered as censored data in the date of death for the calculation of AML transformation curves. To avoid any potential bias in the estimation of the risk of AML transformation, only patients from those registries/centers with information about AML evolution was available in most of instances were included in the calculation of AML transformation risk. Statistical comparisons between different actuarial curves were based on log-rank tests.^{19–21}

Multivariate analysis using the Cox proportional hazards regression method for temporal events was used to identify the most significant independent prognostic variables for OS and AML transformation.²² Characteristics selected for possible inclusion in the multivariate model were those for which there

was some indication of a significant association with OS or AML transformation in the univariate analysis (Table 4), $P < 0.05$. Only cases with complete data for all variables were included in the regression procedure. The forward stepwise procedure was stopped when the P -value for entering an additional variable was above 0.05. All P -values reported are two sided. The selected P -value for considering differences statistically significant in all analyses was < 0.05 . All analyses were performed using the statistical package SPSS version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Characteristics of the patients

The overall series included 183 men (34%) and 358 women (66%) with a median age of 68 years (range, 33–92 years). The main characteristics of the patients at the time of diagnosis are summarized in Table 1. The median value for hemoglobin level, ANC and platelet count was 9.0 g per liter (range, 2.5–14.0), 1.8×10^9 per liter (range, 0.10–38.40) and 181×10^9 per liter (range, 4–1610), respectively, whereas median BM blast count was 4.0%. Most of the patients were classified as RA (49.2%) or RAEB (42.7%) according to the FAB classification; and '5q-syndrome' (39.7%), RAEB-2 (29.0%) or RAEB-1 (21.7%) by the WHO 2001 criteria.

In total, 299 patients (55.3%) had deletion 5q as the sole chromosomal abnormality, 93 (17.2%) had one additional abnormality and 149 (27.5%) had a complex karyotype with two or more associated abnormalities. The most frequent single additional anomalies to deletion 5q were del(12p) ($n=11$), trisomy 21 ($n=10$), trisomy 8 ($n=9$) and del(20q) ($n=8$). Of note, there were no patients with deletion 5q and loss of chromosome Y. However, as expected, majority of patients were women (ratio 1:2.1). In the context of complex karyotypes, aberrations most commonly found were those affecting chromosome 17 ($n=40$), -18/18q- ($n=36$), trisomy 8 ($n=35$), del(20q) ($n=30$), monosomy 7 ($n=28$) and involvement of chromosome 3 ($n=25$).

Ten of the cases included in the series (2.0%) had unrelated clones (without deletion 5q), with trisomy 8 (four cases) and del(12p) (two cases), being the most frequent cytogenetic aberrations.

The most common 5q-deleted regions in 383 cases, in which this information was available, were q13q33 (49.4%), q13q31 (15.9%), q22q33 (7.8%) and 20.9% other unspecific break points. There was a strong correlation between the number of chromosomal abnormalities found in addition to deletion 5q and different hematological parameters, other cytogenetic findings, FAB and WHO subtype, and IPSS classification (Table 2). Comparing patients with ≥ 2 additional abnormalities with patients belonging to a group encompassing two cytogenetic categories (del(5q) and del(5q) + 1), we observed that there were differences in sex distribution ($P < 0.001$), and hemoglobin level between both groups ($P = 0.074$). Platelet count and ANC showed differences between both groups ($P < 0.001$) and a higher incidence of cytopenias as well ($P < 0.001$). The proportion of blasts in BM was higher ($P < 0.001$) as well as the higher proportion of cases with metaphases carrying the deletion 5q ($P < 0.001$).

FAB and WHO diagnoses, according to the number of chromosomal abnormalities found in addition to deletion 5q, are shown in Figure 1.

Apart from differences in characteristics inherent to the definition of '5q-syndrome' (for example, absence of additional chromosomal abnormalities and lower proportion of blasts in

Table 1 Patient characteristics

Characteristic	Number of patients, n (%)
Total number of patients	541
Age	532
< 60 years	129 (24.2)
≥ 60 years	403 (75.8)
Sex	541
Male	183 (33.8)
Female	358 (66.2)
Hemoglobin	438
< 10 g per 100 ml	308 (70.3)
≥ 10 g per 100 ml	130 (29.7)
Absolute neutrophil count	320
$< 1.8 \times 10^9$ per liter	156 (48.8)
$\geq 1.8 \times 10^9$ per liter	164 (51.2)
Platelet count	439
$< 100 \times 10^9$ per liter	129 (29.4)
$\geq 100 \times 10^9$ per liter	310 (70.6)
Cytopenias	325
None	48 (14.8)
One	115 (35.4)
Two	105 (32.3)
Three	57 (17.5)
BM blast count	497
< 5%	293 (58.8)
5–10%	90 (18.1)
11–20%	115 (23.1)
FAB subtype	508
RA	250 (49.2)
RARS	41 (8.1)
RAEB	217 (42.7)
WHO subtype	373
RA	4 (1.1)
RARS	2 (0.5)
RCMD	18 (4.8)
RCMD-RS	11 (2.9)
'5q-syndrome'	148 (39.7)
RAEB-1	81 (21.7)
RAEB-2	108 (29.0)
MDS-U	1 (0.3)
Karyotype complexity	541
Isolated 5q-	299 (55.3)
5q- + 1 abnormality	93 (17.2)
5q- + 2 abnormalities	26 (4.8)
5q- + 3 abnormalities	21 (3.9)
5q- + 4 abnormalities	19 (3.5)
5q- + ≥ 5 abnormalities	83 (15.3)
Deletion 5q break points	383
q13q31	61 (15.9)
q13q33	189 (49.4)
q22q33	30 (7.8)
q12q33	13 (3.4)
q14q34	10 (2.6)
Others	80 (20.9)
Percentage of del(5q) metaphases	365
< 100%	233 (63.8)
100%	132 (36.8)
IPSS risk group	329
Low	89 (27.1)
Intermediate-1	110 (33.4)
Intermediate-2	83 (25.2)
High	47 (14.3)

Abbreviations: BM, bone marrow; FAB, French-American-British; IPSS, International Prognostic Scoring System; MDS-U, MDS unclassifiable; RA, refractory anemia; RAEB, RA with excess of blasts; RARS, RA with ringed sideroblasts; RCMD, refractory cytopenia with multilineage dysplasia; RCMD-RS, RCMD with ringed sideroblasts; WHO, World Health Organization.

Table 2 Patient characteristics according to the karyotype complexity

	Isolated del(5q) (1)		del(5q)+1 abnormality (2)		del(5q)+≥2 abnormalities (3)		P-value		
	Median (Q1–Q3)	n (%)	Median (Q1–Q3)	n (%)	Median (Q1–Q3)	n (%)	(1) vs (2)	(1) vs (3)	(2) vs (3)
Age	68 (59–76)	292	67 (59–76)	93	68 (59–76)	147	0.772 ^a	0.357 ^a	0.294 ^a
<60 years		77 (26.4)		24 (25.8)		28 (19.0)			
≥60 years		215 (73.6)		69 (74.2)		119 (81.0)			
Sex		299		93		149	0.440 ^b	<0.001 ^b	0.031 ^b
Male		84 (28.1)		30 (32.3)		69 (46.3)			
Female		215 (71.9)		63 (67.7)		80 (53.7)			
Hemoglobin	8.9 (2.0) ^c	255	9.3 (1.9) ^c	77	8.7 (1.6) ^c	106	0.327 ^d	0.455 ^d	0.078 ^d
<10 g per 100 ml		176 (69)		47 (61.0)		85 (80.2)			
≥10 g per 100 ml		79 (31)		30 (39.0)		21 (19.8)			
Absolute neutrophil count	2.2 (1.4–3.0)	167	1.6 (1.1–2.8)	49	1.1 (0.5–2.2)	104	0.111 ^a	<0.001 ^a	0.003 ^a
<1.8 × 10 ⁹ per liter		58 (34.7)		25 (51.0)		73 (70.2)			
≥1.8 × 10 ⁹ per liter		109 (65.3)		24 (49.0)		31 (29.8)			
Platelet count	243 (145–377)	253	196 (106–295)	79	59 (33–113)	107	0.006 ^a	<0.001 ^a	<0.001 ^a
<100 × 10 ⁹ per liter		35 (13.8)		18 (22.8)		76 (71.0)			
≥100 × 10 ⁹ per liter		218 (86.2)		61 (77.2)		31 (29.0)			
BM blast count	3.0 (1.0–5.0)	275	4.0 (2.0–10.0)	81	9.0 (4.0–13.0)	142	0.009 ^a	<0.001 ^a	<0.001 ^a
<5%		203 (73.8)		51 (63.0)		39 (27.5)			
5–10%		43 (15.6)		9 (11.1)		38 (26.7)			
11–20%		29 (10.5)		21 (25.9)		65 (45.8)			
Percentage of del(5q) metaphases	75 (52.2–100.0)	179	88.7 (64.4–100.0)	76	98.1 (69.8–100.0)	110	0.227 ^b	<0.001 ^b	0.051 ^b
<100%		129 (72.1)		49 (64.5)		55 (50.0)			
100%		50 (27.9)		27 (35.5)		55 (50.0)			
Cytopenias		170		50		105	0.074 ^e	<0.001 ^b	<0.001 ^e
None		38 (22.4)		7 (14.0)		3 (2.8)			
One		79 (46.5)		21 (42.0)		15 (14.3)			
Two		46 (27.0)		15 (30.0)		44 (41.9)			
Three		7 (4.1)		3 (14.0)		43 (41.0)			
IPSS risk group		173		51		105	<0.001 ^e	<0.001 ^b	<0.001 ^b
Low		89 (51.4)		0 (0.0)		0 (0.0)			
Intermediate-1		65 (37.6)		34 (66.7)		11 (10.5)			
Intermediate-2		18 (10.4)		15 (29.4)		50 (47.6)			
High		1 (0.6)		2 (3.9)		44 (41.9)			
FAB subtype		277		85		146	0.023 ^b	<0.001 ^b	<0.001 ^b
RA		182 (65.7)		42 (49.4)		26 (17.8)			
RARS		21 (7.6)		11 (12.9)		9 (6.2)			
RAEB		74 (26.7)		32 (37.6)		111 (76.0)			
WHO subtype		217		42		114	<0.001 ^e	<0.001 ^e	0.016 ^e
'5q-syndrome'		148 (68.2)		0 (0.0)		0 (0.0)			
RA		1 (0.5)		2 (4.8)		1 (0.9)			
RARS		0 (0.0)		1 (2.4)		1 (0.9)			
RCMD		3 (1.4)		8 (19.0)		7 (6.1)			
RCMD-RS		1 (0.5)		5 (11.9)		5 (4.4)			
RAEB-1		35 (16.0)		9 (21.4)		37 (32.4)			
RAEB-2		29 (13.4)		17 (40.5)		62 (54.4)			
MDS-U		0 (0.0)		0 (0.0)		1 (0.9)			

Abbreviations: BM, bone marrow; FAB, French–American–British; IPSS, International Prognostic Scoring System; MDS-U, MDS unclassifiable; RA, refractory anemia; RAEB, RA with excess of blasts; RARS, RA with ringed sideroblasts; RCMD, refractory cytopenia with multilineage dysplasia; RCMD-RS, RCMD with ringed sideroblasts; WHO, World Health Organization.

Q1, percentile 25; Q3, percentile 75.

^aMann–Whitney *U*-test.

^b χ^2 -test.

^cThis value corresponds to the mean and s.d., in brackets.

^dOne-way ANOVA with *post-hoc* Tukey's test;

^eFisher's exact test.

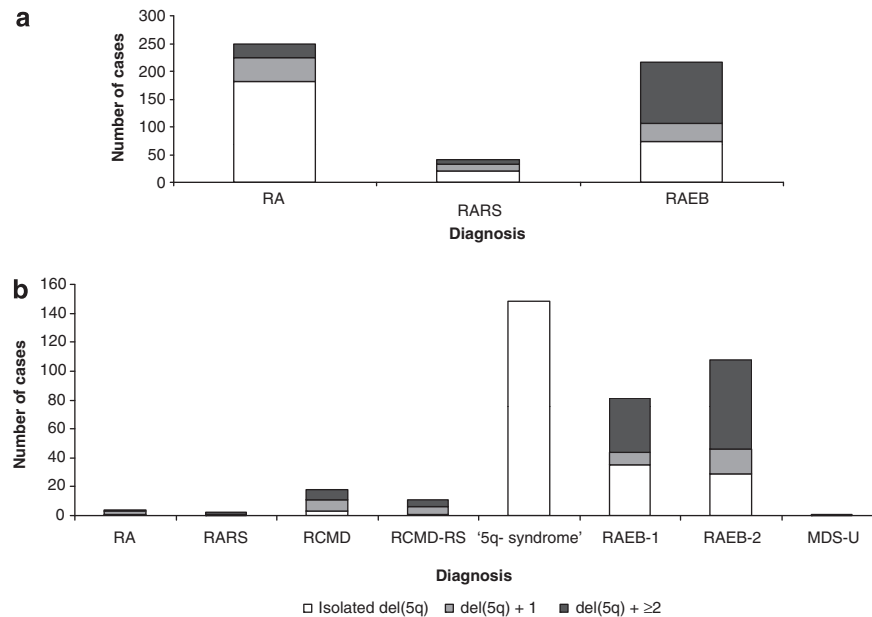


Figure 1 Incidence of the three defined cytogenetic categories (isolated del(5q), del(5q) + 1, del(5q) + ≥2) among the different morphological subtypes. (a) According to the FAB classification. (b) According to the WHO classification. Abbreviations: RA, refractory anemia; RARS, RA with ringed sideroblasts; RAEB, RA with excess of blasts; RCMD, refractory cytopenia with multilineage dysplasia; RCMD-RS, RCMD with ringed sideroblasts; MDS-U, MDS unclassifiable.

BM), this subset of patients ($n = 148$) had a higher median ANC ($P = 0.001$) and median platelet count value ($P < 0.001$) and, consequently, a lower number of cytopenias ($P < 0.001$) than the remaining patients. Further, patients with '5q-syndrome' showed a lower median percentage of metaphases carrying deletion 5q than the rest of the patients (median 70 vs 90%; $P < 0.001$) (Table 3). No significant differences in break points were observed between patients with '5q-syndrome' and the remaining patients (data not shown).

Outcome and prognostic factors in the overall series

Overall survival and AML transformation data were available in 512 (94.6%) and 299 (55.3%) patients, respectively. With a median follow-up of 17.2 months (range, 1–326) for surviving patients, 258 patients remained alive and the median OS for the whole series was 36.8 months. In total, 66 patients evolved to AML during follow-up, with the actuarial risk of AML evolution at 5 years of 38.8%. As depicted in Table 4, univariate analysis showed that both OS and risk of AML transformation were significantly influenced by age ($P < 0.001$ and $P = 0.042$, respectively), sex ($P < 0.001$ and $P = 0.029$, respectively), ANC ($P < 0.001$ and $P = 0.004$, respectively) and platelet count, number of cytopenias, proportion of BM blasts, FAB and WHO subtype, IPSS risk group and number of chromosomal abnormalities found in addition to deletion 5q ($P < 0.001$ for all variables, both OS and AML evolution), as well as the percentage of metaphases carrying deletion 5q ($P < 0.001$ and $P = 0.003$, respectively). In addition, OS was shorter in those with lower hemoglobin levels ($P = 0.030$). Different deletion break points showed an impact on outcome in terms of OS ($P = 0.008$). Although there was one break point (q22q33) that showed less median survival time, this did not differ statistically from the rest of the break points ($P = 0.228$). Figure 2 shows the actuarial curves of OS (Figure 2a) and AML transformation (Figure 2b) in the three cytogenetic groups defined according to

the number of chromosomal abnormalities found in addition to deletion 5q: isolated deletion 5q, deletion 5q plus one additional abnormality and deletion 5q plus two or more additional abnormalities. As can be appreciated, all the three aforementioned cytogenetic groups were found to have a significantly different risks of AML transformation ($P < 0.001$ for all comparisons), but regarding OS only two risk groups could be clearly identified, patients with deletion 5q alone or with one additional chromosomal abnormality and patients with two or more additional abnormalities. Although patients with deletion 5q plus one additional abnormality had a somewhat shorter OS than patients with isolated deletion 5q (median OS, 63.4 and 46.0 months, respectively) differences in OS between these two groups were not statistically significant ($P = 0.131$). We were not able to determine the potential impact in the outcome of any of the additional aberrations because of the low number of cases as a single anomaly accompanying to the deletion 5q. In contrast, patients with two or more additional abnormalities showed a significantly shorter OS than the other two groups of patients (median OS, 6.8 months; $P < 0.001$).

The same prognostic impact of the three cytogenetic groups, defined by the number of chromosomal abnormalities found in addition to deletion 5q, on OS and risk of AML transformation was evident when the analysis was restricted to patients with <5% and <10% blasts in BM (Figure 3).

As shown in Table 5, in multivariate analysis the characteristics showing an independent prognostic impact concerning OS and AML transformation risk were the number of chromosomal abnormalities found in addition to deletion 5q ($P < 0.001$ for both outcomes); the platelet count ($P < 0.001$ and $P = 0.001$, respectively) and the proportion of blasts in BM ($P < 0.001$ and $P = 0.016$, respectively). Age and sex also added significant prognostic information for OS ($P = 0.001$ and $P = 0.020$, respectively). The independent prognostic impact of platelet count in multivariate analysis was observed studying this variable both as a dichotomous and continuous one. When this

Table 3 Comparative of clinical characteristics of patients with '5q-syndrome'

	'5q-syndrome'		'non-5q-syndrome'		P-value
	Median (Q1-Q3)	n (%)	Median (Q1-Q3)	n (%)	
Age	70 (59-79)	147	67 (60-75)	385	0.070 ^a
<60 years		39 (26.5)		90 (23.4)	
≥60 years		108 (73.5)		295 (76.6)	
Sex		148		393	0.035 ^b
Male		43 (29.1)		140 (35.6)	
Female		105 (70.9)		253 (64.4)	
Hemoglobin	9.0 (1.9) ^c	133	8.9 (1.9) ^c	305	0.420 ^d
<10 g per 100 ml		92 (69.2)		216 (70.8)	
≥10 g per 100 ml		41 (30.8)		89 (29.2)	
Absolute neutrophil count	2.2 (1.5-3.3)	86	1.6 (0.9-2.7)	234	<0.001 ^a
<1.8 × 10 ⁹ per liter		26 (30.2)		130 (55.6)	
≥1.8 × 10 ⁹ per liter		60 (69.8)		104 (44.4)	
Platelet count	295 (174-412)	130	138 (60-262)	309	<0.001 ^a
<100 × 10 ⁹ per liter		13 (10.0)		116 (37.5)	
≥100 × 10 ⁹ per liter		117 (90.0)		193 (62.5)	
BM blast count	2.0 (1.0-3.0)	141	6.0 (3.0-11.0)	357	<0.001 ^a
<5%		141 (100.0)		152 (42.6)	
5-10%		0 (0.0)		90 (25.2)	
11-20%		0 (0.0)		115 (32.2)	
IPSS score		89		240	<0.001 ^b
Low		70 (78.7)		19 (7.9)	
Intermediate-1		19 (21.3)		91 (37.9)	
Intermediate-2		0 (0.0)		83 (34.6)	
High		0 (0.0)		47 (19.6)	
Percentage of del(5q) metaphases	70.0 (40.0-93.1)	73	90.0 (61.1-100.0)	292	<0.001 ^b
<100%		60 (82.2)		173 (59.2)	
100%		13 (17.8)		119 (40.8)	

Abbreviations: BM, bone marrow; IPSS, International Prognostic Scoring System.

Q1, percentile 25; Q3, percentile 75.

^aMann-Whitney *U*-test.

^bχ²-test.

^cThis value corresponds to the mean and s.d., in brackets.

^dStudent's *t* test.

variable was introduced simultaneously in the regression procedure in both ways, the dichotomized manner was selected for entering the model. For this reason and for practical purposes, all results offered are those obtained with platelet count as a dichotomized variable.

Outcome and prognostic factors in patients with '5q-syndrome'

When the analysis was restricted to 144 patients with the '5q-syndrome' diagnosis and available follow-up data, median OS was 68.8 months and actuarial risk of AML transformation at 5 years was 17.1%. In univariate analysis, male patients (median OS, 40.9 vs 80.0 months for women; *P*=0.020), patients older than 60 years of age (median OS, 45.0 vs 134.5 months for patients ≤60 years of age; *P*=0.005) and those with a platelet count lower than 150 × 10⁹ per liter (median OS, 32.2 vs 80.0 months for patients with a platelet count greater than 150 × 10⁹ per liter; *P*<0.001) had a significantly shorter OS.

Multivariate analysis showed that the main factors influencing OS were platelet count (hazards ratio (HR), 3.2; *P*=0.001) and age (HR, 2.2; *P*=0.034). None of the parameters evaluated

demonstrated a significant association with AML transformation risk neither on univariate nor on multivariate analysis.

Outcome and prognostic factors in patients of low and intermediate-1 risk

Patients belonging to the low and intermediate-1 IPSS category are considered as good prognosis, as well as those MDS with deletion 5q. Comparing the outcomes of both groups of patients in our series, as expected, low IPSS patients has a median survival time higher than the intermediate-1 patients, though these differences were not statistically significant (58.9 vs 45.0 months; *P*=0.182). The actuarial AML risk at 5 years was also similar (21.2 vs 25.6%; *P*=0.437). Focusing on low-risk patients, all presented isolated 5q deletion and <5% of BM blasts. The univariate analysis did not detect any prognostic factor regarding OS and AML, for those variables that there were enough patients per group. The intermediate-1 group had patients belonging to the three cytogenetic and BM blast count predefined categories. The OS univariate analysis showed the prognosis impact of cytogenetic categories (*P*=0.020), age (*P*=0.003) and platelet count (*P*=0.002). Regarding AML,

Table 4 Results of univariate analyses of prognostic factors for OS and AML transformation in the overall series

	Overall survival				AML transformation			
	n (%)	Median survival (mo)	Patients alive at 5 years (%)	P-value	n (%)	Time to 25% probability (mo)	Cumulative probability of AML evolution at 5 years (%)	P-value
Age	506 (93.5)			<0.001	297 (54.9)			0.042
<60 years	121 (23.9)	80.0	52.4		66 (22.2)	13.5	47.7	
≥60 years	385 (76.1)	33.0	28.1		231 (77.8)	41.8	36.0	
Sex	512 (94.6)			<0.001	299 (55.3)			0.029
Male	174 (34.0)	25.0	21.2		108 (36.1)	14.9	52.1	
Female	338 (66.0)	44.9	41.9		191 (63.9)	42.1	32.4	
Hemoglobin	429 (79.3)			0.030	290 (53.6)			0.252
<10 g per 100 ml	302 (70.4)	35.0	33.7		200 (69.0)	22.9	41.9	
≥10 g per 100 ml	127 (29.6)	54.5	42.7		90 (31.6)	44.2	32.8	
Absolute neutrophil count	318 (58.8)			<0.001	285 (52.7)			0.004
<1.8 × 10 ⁹ per liter	155 (48.7)	15.0	17.1		136 (47.7)	13.2	47.3	
≥1.8 × 10 ⁹ per liter	163 (51.3)	38.7	45.0		149 (52.3)	51.6	28.7	
Platelet count	428 (79.1)			<0.001	290 (53.6)			<0.001
<100 × 10 ⁹ per liter	127 (29.7)	8.2	8.3		100 (34.5)	6.7	67.6	
≥100 × 10 ⁹ per liter	301 (70.3)	47.0	57.1		190 (65.5)	48.6	30.4	
Cytopenias	323 (59.7)			<0.001	286 (52.9)			<0.001
None	47 (14.6)	65.9	53.4		44 (15.4)	NR	15.9	
One	115 (35.6)	50.9	36.1		100 (35.0)	34.5	44.8	
Two	104 (32.2)	19.7	20.5		92 (32.1)	15.0	32.2	
Three	57 (17.6)	7.9	5.2		50 (17.5)	67	76.6	
BM blast count	479 (88.5)			<0.001	296 (54.7)			<0.001
<5%	277 (57.8)	50.9	44.3		151 (51.0)	51.1	31.3	
5–10%	88 (18.4)	19.7	26.2		63 (21.3)	13.5	42.1	
11–20%	114 (23.8)	11.0	12.5		82 (27.7)	8.4	55.9	
IPSS risk group	327 (60.4)			<0.001	289 (53.4)			<0.001
Low	88 (26.9)	58.9	49.1		78 (27.0)	65.0	21.2	
Intermediate-1	109 (33.3)	45.0	34.3		94 (32.5)	52.4	25.6	
Intermediate-2	83 (25.4)	13.4	15.2		74 (25.6)	9.1	65.0	
High	47 (14.4)	6.5	0.0		43 (14.9)	5.2	100.0	
FAB subtype	488 (90.2)			<0.001	2889 (53.4)			<0.001
RA	232 (47.5)	57.0	47.3		117 (40.5)	51.4	29.8	
RARS	41 (8.4)	38.9	36.1		20 (6.9)	10.8	—	
RAEB	215 (44.1)	14.9	17.3		152 (52.6)	9.7	48.1	
WHO subtype	362 (66.9)			<0.001	255 (47.1)			<0.001
'5q-syndrome'	140 (38.7)	65.9	51.3		86 (33.7)	65.0	18.2	
RA	4 (1.1)	31.6	33.3		3 (1.2)	—	100.0	
RARS	2 (0.6)	2.7	0.0		2 (0.8)	—	100.0	
RCMD	17 (4.7)	31.0	15.9		10 (3.9)	—	100.0	
RCMD-RS	11 (3.0)	20.8	16.4		6 (2.4)	4.7	100.0	
RAEB-1	79 (21.8)	18.0	20.0		62 (24.3)	15.4	30.6	
RAEB-2	108 (29.8)	10.4	13.0		85 (33.3)	8.7	63.4	
MDS-U	1 (0.3)	9.7	0.0		1 (0.4)	—	—	
Percentage of del(5q) metaphases	353 (65.2)			<0.001	250 (46.2)			0.003
<100%	225 (63.7)	39.6	35.2		170 (68.0)	51.1	34.4	
100%	128 (36.3)	16.2	20.1		80 (42.0)	8.4	53.4	
Deletion 5q break points	370 (68.4)			0.008				0.386
q13q31	60 (16.2)	57.1	47.4		33 (15.9)	52.4	47.4	
q13q33	181 (48.9)	39.6	38.7		110 (53.2)	26.0	38.7	
q22q33	30 (8.1)	24.0	28.2		13 (6.3)	13.2	28.2	
q12q33	13 (3.5)	57.4	46.7		10 (4.8)	—	46.7	
q14q34	10 (2.7)	73.0	33.8		1 (0.5)	—	33.8	
Others	76 (20.6)	19.7	26.9		40 (19.3)	15.4	26.9	
Karyotype complexity	512 (94.6)			<0.001	299 (55.3)			<0.001
Del(5q)	275 (53.7)	63.4	50.6		160 (53.5)	65.0	21.1	
Del(5q) + 1	89 (17.4)	46.0	40.4		43 (14.4)	14.9	57.6	
Del(5q) + 2	26 (5.1)	13.9	0.0		16 (5.4)	4.7	100.0	
Del(5q) + 3	21 (4.1)	8.1	0.0		15 (5.0)	2.6	100.0	
Del(5q) + 4	19 (3.7)	7.6	0.0		13 (4.3)	3.9	100.0	
Del(5q) + ≥5	82 (16.0)	5.7	2.3		52 (17.4)	4.2	100.0	

Abbreviations: AML, acute myeloid leukemia; BM, bone marrow; FAB, French–American–British; IPSS, International Prognostic Scoring System; MDS-U, MDS unclassifiable; NR: not reached; OS, overall survival; RA, refractory anemia; RAEB, RA with excess of blasts; RARS, RA with ringed sideroblasts; RCMD, refractory cytopenia with multilineage dysplasia; RCMD-RS, RCMD with ringed sideroblasts; WHO, World Health Organization.

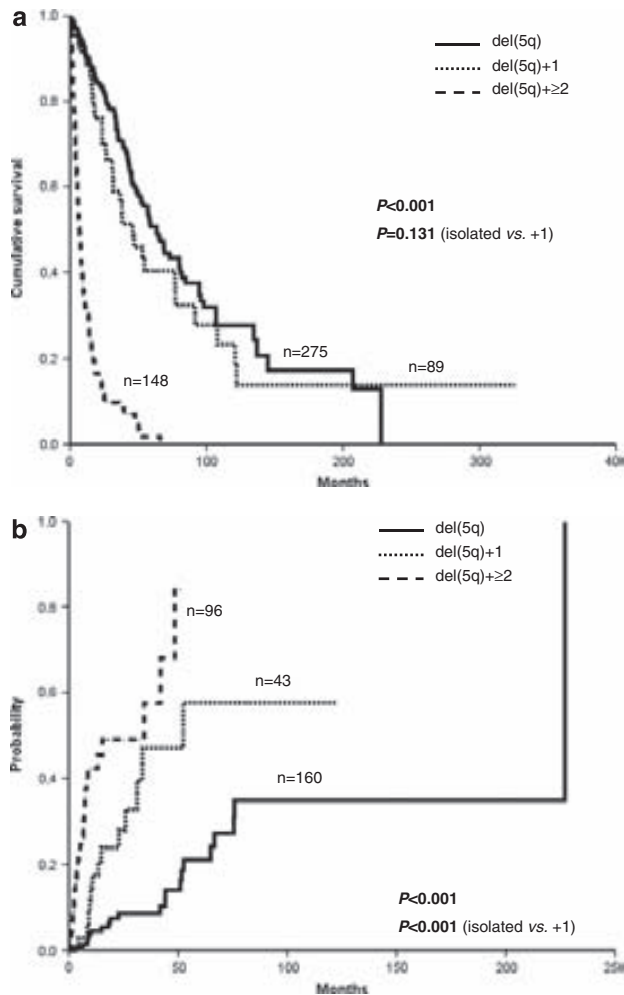


Figure 2 Kaplan–Meier curves according to the three defined cytogenetic categories (isolated del(5q), del(5q) + 1, del(5q) + ≥2). (a) Actuarial probability of overall survival. (b) Cumulative probability of AML transformation.

cytogenetic categories ($P=0.008$) and sex ($P=0.027$) revealed their prognostic impact in the intermediate-1 subset of patients.

Discussion

In this paper we present the results of a larger multicenter cooperative study that recruited the largest to-date known series of *de novo* MDS patients with deletion 5q in the pre-lenalidomide era. This has allowed us to assess the clinical characteristics, natural history and prognostic factors, with special emphasis on cytogenetic findings; being the risk of transformation to AML one of the highlights of this study. This was one of the controversial points for the approval of lenalidomide by the European Medicines Agency. Although a phase III clinical trial comparing lenalidomide vs placebo has shown some preliminary data about the risk of AML transformation in patients treated and not treated with lenalidomide,¹² herein, we have studied extensively this parameter in nontreated patients, taking different prognostic factors into account.

We confirmed the strong relationship between the number of additional chromosomal abnormalities (apart from deletion 5q

and outcomes, and we are able to show that the patterns of these additional karyotype abnormalities define two distinct risk groups concerning the probability of OS and three concerning the risk of AML transformation. Platelet count and sex were the only variables independently associated with OS in a specific subanalysis of patients with WHO-defined ‘5q–syndrome’.

As to cytogenetic abnormalities, we found that the most frequent single additional abnormalities to deletion 5q were: del(12p), trisomy 21, trisomy 8 and del(20q), the incidences of which were within the ranges reported in the literature.²³ It should be noted, however, that the number of aberrations of chromosome 7 (–7/7q–) occurring as the sole additional abnormality in this series ($n=5$) was not large enough to help us to clarify its prognostic value, though a slightly nonstatistically significant decrease in OS was observed in this subset of patients (data not shown).

Regarding break points observed in our series, our results agree with previous studies.^{9,24–26} However, some of the variability in the reported deletion break points may result from the difficulties of interpretation in suboptimal chromosomal preparations and the interpersonal variability as well. For the whole series, we observed an association between the deleted regions and its outcomes, in terms of OS. Nevertheless, we did not find association of the length of the deleted segment with respect to OS. Of note, no significant differences in break points were observed between patients with the ‘5q–syndrome’ and the rest of the series, in contrast with which was previously reported.²⁷

Karyotype complexity is a well-known prognostic factor in MDS.^{5,8,10,11,28,29} However, in MDS patients with deletion 5q prognostic value of the number of chromosomal abnormalities in addition to deletion 5q (for example, complexity of the karyotype) is still a matter of debate, with previous reports showing conflicting results. In 2003, Stewart *et al.*³⁰ analyzed outcomes of hematopoietic stem cell transplants in patients with MDS or AML and deletion 5q as the sole karyotypic abnormality ($n=20$) vs deletion 5q in combination with other chromosomal abnormalities ($n=37$). Overall, patients with deletion 5q as the sole karyotypic abnormality had lower rate of relapse and increased relapse-free survival. In addition to that, the blast count (<5%) was the only factor significantly associated with relapse-free survival. In 2004, Giagounidis *et al.*⁹ reported a series of 76 MDS patients with deletion 5q in which those with one additional abnormality to deletion 5q had a significant worse prognosis. However, the analysis was restricted to a subset of just 10 patients with a single additional abnormality. Recently, Holtan *et al.*³¹ studying 130 deletion 5q MDS patients (including 39 with isolated deletion 5q and 16 plus one additional aberration) found similar survival for these two groups. Finally, in the largest series reported before the present one, Haase *et al.*⁵ did not find statistical differences in OS between both groups of patients (82 patients with one additional abnormality out of 168 deletion 5q MDS patients). In this enlarged series, we also failed to find a significantly different OS between patients with a sole deletion 5q ($n=275$) and those with a single additional abnormality ($n=89$), despite this latter group showed a somewhat shorter survival (46.0 vs 63.4 months; $P=0.131$). Nevertheless, this similarity was not kept for the risk of AML evolution, an outcome not extensively evaluated in previous studies, as patients with a single additional abnormality showed a higher risk of evolution to AML (57.6 vs 21.1% at 5 years; $P<0.001$). Patients with two or more additional abnormalities had a dismal prognosis in terms of OS and risk to AML transformation. The data regarding transformation to AML will be of importance, specially, in the

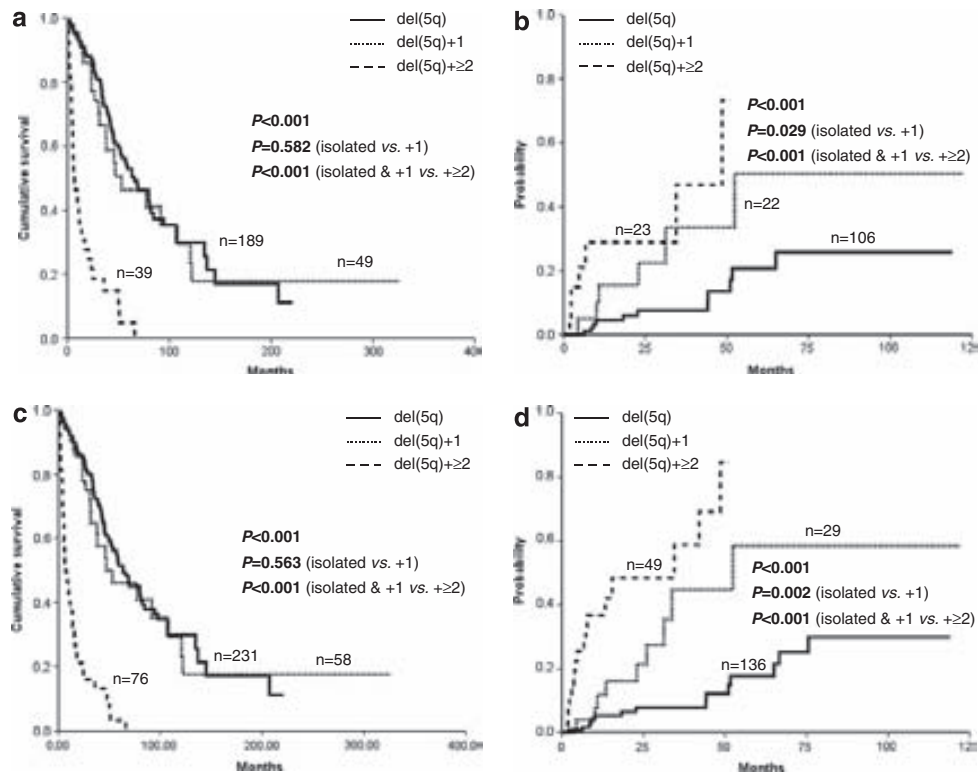


Figure 3 Kaplan–Meier curves according to the three defined cytogenetic categories (isolated del(5q), del(5q) + 1, del(5q) + ≥2) in patients with <5 and <10% blasts in bone marrow (BM). (a) Actuarial probability of overall survival for patients with a BM blast count <5%. (b) Cumulative probability of AML transformation for patients with a BM blast count <5%. (c) Actuarial probability of overall survival for patients with a BM blast count <10%. (d) Cumulative probability of AML transformation for patients with a BM blast count <10%.

Table 5 Results of multivariate analysis of prognostic factors for OS and AML transformation in the overall series

Variable	Overall survival			AML transformation		
	Categories	Hazards ratio (95% CI)	P-value	Categories	Hazards ratio (95% CI)	P-value
Karyotype complexity	del(5q) and del(5q)+1 vs del(5q)+≥2	4.1 (2.9–5.7)	<0.001	del(5q) vs del(5q)+1 vs del(5q)+≥2	2.9 (2.0–4.1)	<0.001
Platelet count	≤150 × 10 ⁹ /l vs >150 × 10 ⁹ /l	2.0 (1.5–2.8)	<0.001	≤150 × 10 ⁹ /l vs >150 × 10 ⁹ /l	2.2 (1.2–3.9)	0.001
BM blast count	<5% vs 5–10% vs 11–20% vs >20%	1.4 (1.2–1.7)	<0.001	<5 vs >5%	1.4 (1.1–1.9)	0.016
Age	<60 vs ≥60 years	1.6 (1.2–2.3)	0.001	—	—	—
Sex	Female vs male	0.7 (0.5–0.9)	0.020	—	—	—

Abbreviations: AML, acute myeloid leukemia; BM, bone marrow; CI, confidence interval; OS, overall survival.

assessment of clinical trials, a controversial point for the approval of drugs in hematological malignancies.

Multivariate analysis confirmed the independently adverse impact of the complexity of the karyotype (for instance, plus ≥2 additional aberrations) in both OS and risk of AML transformation. In contrast, differences in outcome between patients with isolated deletion 5q and those with a single additional abnormality do not seem to be fully attributable to the extra aberration *per se*. In fact, these two groups showed significant differences in variables such as BM blasts and platelet count (Table 2), which could account, at least in part, for the different outcomes.

Nowadays, the IPSS score¹⁰ still being the ‘gold standard’ for MDS stratifications and prognostication. In 2007, Malcovati

*et al.*³² published a new scoring system based on the WHO classification, called WHO classification-based prognostic scoring system, which includes the IPSS cytogenetic risk categories, the WHO classification and transfusion requirements. Unfortunately, this latter variable was not available in most of our patients and, thus we were not able to evaluate the potential prognostic importance of transfusion requirements and WHO classification-based prognostic scoring system in MDS patients with 5q deletion.

Finally, we analyzed the characteristics and outcome of 148 patients fulfilling the ‘5q-syndrome’ WHO (2001) definition (144 with available follow-up data). WHO (2008) classification³ restricts this diagnosis to MDS patients with an isolated deletion 5q without any additional chromosomal abnormality (with the

exception of a loss of the Y chromosome) and a BM blast count below 5%. Ironically, none of the patients with deletion 5q MDS in this series showed a concurrent loss of Y chromosome, although it was observed in the context of complex karyotypes. The multivariate analysis of prognostic factors in patients with WHO 2001-defined '5q-syndrome' showed that a platelet count lower or equal to 150×10^9 per liter and advanced age were adversely related to OS. In contrast, none of the parameters evaluated showed a significant association with AML transformation risk. This is the first series that includes a large number of cases with '5q-syndrome' defined according to the WHO classification; our findings could help to a better prognostic characterization of this entity. Although, Patnaik *et al.*³³ in 2010, published a large series fulfilling the current WHO-2008 definition, they were as not large as our subset of patients. However, the multivariate analysis give additional data, showing that the transfusion need at diagnosis and dysgranulopoiesis are important prognostic factors, as well as age. In addition, they contribute with data from molecular studies that is very useful in this subset of patients. They performed mutational analysis from *JAK2*, *MPL* and *IDH1* genes, which revealed mutations except for the *IDH1* gene, they are more associated with high-risk MDS or AML.^{33,34}

In summary, the results of this retrospective collaborative study, which is the largest available series of patients with primary MDS and deletion 5q, most of them receiving supportive care, show the independent prognostic impact of the number of additional chromosomal abnormalities to deletion 5q, to question the currently accepted WHO definition of the '5q-syndrome'. In addition, it is the first to show the prognostic importance of platelet count and age in patients with '5q-syndrome'. Further, this series could be very useful for the design of clinical trials in MDS patients with deletion 5q. This may be of special relevance in view of the controversies arisen by the results observed in patients treated with lenalidomide.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported (in part) by grants from the *Instituto de Salud Carlos III*, *Ministerio de Sanidad y Consumo*, Spain (FI07/00107, CA08/00141 and PI07/1009) to MM, MAS and LF, respectively; *Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer* (RTICC and FEDER) (RD06/0020/0031 and RD07/0020/2004) to MAS and FS; the European Leukemia Net; and the National Institutes of Health (NIH) grants (5PO11CA108631) to GGM. We are grateful to the Myelodysplastic Syndromes Foundation for supporting this international project. We thank Luis Benlloch, Francesc Garcia-Pallarols and Lara Nonell, for their excellent technical assistance. We thank Encarna Bureo, Marina Recio, Virginie Eclache, Daniel Armenta-Gil, José Ángel Martínez-Climent, Isana Benet, Esperanza Vizcarra, Eva Arranz, Juan C. Cigudosa and groups belonging to the Spanish Registry of MDS, as well as the technicians involved in all cytogenetics laboratories.

References

- 1 Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR *et al.* Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1982; **51**: 189–199.
- 2 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 (eds). *Pathology and Genetics. Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC: Lyon, 2001. pp. 61–73.
- 3 Brunning RD, Orazi A, Germing U, Le Beau MM, Porwit A, Baumann I *et al.* Myelodysplastic Syndromes. In: Swederlow SH, Campo E, Lee Harris N, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H *et al.* (eds). *WHO classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC: Lyon, 2008. pp. 87–107.
- 4 Bernasconi P, Klersy C, Boni M, Cavigliano PM, Calatroni S, Giardini I *et al.* World Health Organization classification in combination with cytogenetic markers improves the prognostic stratification of patients with *de novo* primary myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 2007; **137**: 193–205.
- 5 Haase D, Germing U, Schanz J, Pfeilstocker M, Nosslinger T, Hildebrandt B *et al.* New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* 2007; **110**: 4385–4395.
- 6 Heim S, Mitelman F. Chromosome abnormalities in the myelodysplastic syndromes. *Clin Haematol* 1986; **15**: 1003–1021.
- 7 Pozdnyakova O, Miron PM, Tang G, Walter O, Raza A, Woda B *et al.* Cytogenetic abnormalities in a series of 1029 patients with primary myelodysplastic syndromes: a report from the US with a focus on some undefined single chromosomal abnormalities. *Cancer* 2008; **113**: 3331–3340.
- 8 Solé F, Luño E, Sanzo C, Espinet B, Sanz GF, Cervera J *et al.* Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2005; **90**: 1168–1178.
- 9 Giagounidis AA, Germing U, Haase S, Hildebrandt B, Schlegelberger B, Schoch C *et al.* Clinical, morphological, cytogenetic, and prognostic features of patients with myelodysplastic syndromes and del(5q) including band q31. *Leukemia* 2004; **18**: 113–119.
- 10 Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G *et al.* International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997; **89**: 2079–2088. Erratum in: *Blood* 1998; **91**: 1100.
- 11 Valent P, Horny HP, Bennett JM, Fonatsch C, Germing U, Greenberg P *et al.* Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leuk Res* 2007; **31**: 727–736.
- 12 Fenaux P, Giagounidis A, Selleslag D, Beyne-Rauzy O, Mufti G, Mittelman M *et al.* RBC Transfusion independence and safety profile of lenalidomide 5 or 10 mg in Pts with low- or Int-1-Risk MDS with Del5q: results from a randomized phase III trial (MDS-004). *Blood* 2010; **114**: (abstract 390).
- 13 List A, Kurtin S, Roe DJ, Buresh A, Mahadevan D, Fuchs D *et al.* Efficacy of lenalidomide in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* 2005; **352**: 549–557.
- 14 List A, Dewald G, Bennett J, Giagounidis A, Raza A, Feldman E *et al.* Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *N Engl J Med* 2006; **355**: 1456–1465.
- 15 European Medicines Agency. Assessment report for lenalidomide Celgene Europe. London, 2008, pp 1–51, Document reference EMEA/CHMP/249329/2008.
- 16 Shaffer Lisa G, Tommerup N. ISCN 2005: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. *Karger in collaboration with cytogenetics and Genome Research* 2005.
- 17 Chun K, Hagemeyer A, Iqbal A, Slovak ML. Implementation of standardized international karyotype scoring practices is needed to provide uniform and systematic evaluation for patients with myelodysplastic syndrome using IPSS criteria: An International Working Group on MDS Cytogenetics Study. *Leuk Res* 2009; **34**: 160–165.
- 18 Kaplan E, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; **53**: 457–481.
- 19 Mantel N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother Rep* 1966; **50**: 163–170.
- 20 Peto R, Pike MC, Armitage P, Breslow NE, Cox NR, Howard SV *et al.* Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation of each patient. I. Introduction and design. *Br J Cancer* 1976; **34**: 585–612.

- 21 Peto R, Pike MC, Armitage P, Breslow NE, Cox DR, Howard SV *et al*. Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation of each patient. II. Analysis and examples. *Br J Cancer* 1977; **35**: 1–39.
- 22 Cox DR. Regression Models and Life-Tables. *J R Stat Soc B* 1972; **34**: 187–220.
- 23 Haase D. Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol* 2008; **87**: 515–526.
- 24 Bernasconi P, Boni M, Cavigliano PM, Calatroni S, Giardini I, Rocca B *et al*. Clinical relevance of cytogenetics in myelodysplastic syndromes. *Ann N Y Acad Sci* 2006; **1089**: 395–410.
- 25 Boultonwood J, Lewis S, Wainscoat JS. The 5q-syndrome. *Blood* 1994; **84**: 3253–3260.
- 26 Zou YS, Fink SR, Stockero KJ, Paternoster SF, Smoley SA, Tun HW *et al*. Efficacy of conventional cytogenetics and FISH for EGR1 to detect deletion 5q in hematological disorders and to assess response to treatment with lenalidomide. *Leuk Res* 2007; **31**: 1185–1189.
- 27 Ebert BL. Deletion 5q in myelodysplastic syndrome: a paradigm for the study of hemizygous deletions in cancer. *Leukemia* 2009; **23**: 1252–1256.
- 28 Morel P, Hebbar M, Lai JL, Duhamel A, Preudhomme C, Wattel E *et al*. Cytogenetic analysis has strong independent prognostic value in *de novo* myelodysplastic syndromes and can be incorporated in a new scoring system: a report on 408 cases. *Leukemia* 1993; **7**: 1315–1323.
- 29 Toyama K, Ohyashiki K, Yoshida Y, Abe T, Asano S, Hirai H *et al*. Clinical implications of chromosomal abnormalities in 401 patients with myelodysplastic syndromes: a multicentric study in Japan. *Leukemia* 1993; **7**: 499–508.
- 30 Stewart B, Verdugo M, Guthrie KA, Appelbaum F, Deeg HJ. Outcome following haematopoietic cell transplantation in patients with myelodysplasia and del (5q) karyotypes. *Br J Haematol* 2003; **123**: 879–885.
- 31 Holtan SG, Santana-Davila R, Dewald GW, Khetterling RP, Knudson RA, Hoyer JD *et al*. Myelodysplastic syndromes associated with interstitial deletion of chromosome 5q: clinico-pathologic correlations and new insights from the pre-lenalidomide era. *Am J Hematol* 2008; **83**: 708–713.
- 32 Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, Della Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R *et al*. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 2007; **25**: 3503–3510.
- 33 Patnaik MM, Lasho TL, Finke CM, Gagat N, Caramazza D, Holtan SG *et al*. WHO-defined ‘myelodysplastic syndrome with isolated del(5q)’ in 88 consecutive patients: survival data, leukemic transformation rates and prevalence of JAK2, MPL and IDH mutations. *Leukemia* 2010; **24**: 1283–1289.
- 34 Pardanani A, Patnaik MM, Lasho TL, Mai M, Knudson RA, Finke C *et al*. Recurrent IDH mutations in high-risk myelodysplastic syndrome or acute myeloid leukemia with isolated del(5q). *Leukemia* 2010; **24**: 1370–1372.

Discussió

Aprèn de l'ahir, viu el present, espera pel demà.
L'important és no deixar de fer-se preguntes

Albert Einstein

Les SMD són per definició un conjunt de malalties clonals hematològiques heterogènies ja que inclou varis subgrups, bàsicament, morfològics. A més de la seva gran heterogeneïtat clínica i citològica, es caracteritzen per la seva diversitat genètica. Tot i que la deleció 5q és una de les alteracions més freqüents en les SMD, és una incògnita les diferències observades en la història natural de la malaltia així com en quant a resposta al tractament amb lenalidomida. Els tres treballs que componen aquesta tesi han permès profunditzar en el coneixement genètic i clínic de la deleció 5q en les SMD. Els treballs publicats fins el moment del seu inici eren escassos i basats en un baix nombre de pacients i, normalment, els estudis de CC^{25,26}, FISH⁹¹ o *microarrays* genòmics^{99,100} estaven inclosos en sèries més àmplies que inclouen SMD amb altres alteracions citogenètiques i, en el cas de les SMD amb deleció 5q no un grup homogeni tractat amb lenalidomida.

En el **treball I** es va estudiar la incidència de la deleció 5q en les SMD que *a priori* per CC no presentaven una deleció del braç llarg del cromosoma 5 clàssica¹¹⁵. En el **treball II** es va estudiar l'impacte que tenien les alteracions citogenètiques acompanyants a la deleció 5q en el pronòstic d'aquest subgrup de SMD, que suposen el 10-15% del total de SMD, i el seu paper enfront a factors clínics i morfològics clàssics¹¹⁶. En el **treball III** es va estudiar el paper d'alteracions críptiques, detectades amb tècniques d'estudi citogenètic d'alta resolució com són els *microarrays* genòmics i estudis de seqüenciació directa, i el seu impacte en la resposta al tractament amb lenalidomida.

1. Utilitat i impacte de les tècniques d'estudi citogenètic en la deleció 5q

Des dels anys 60 en que es va descobrir que el cromosoma Ph estava associat a la leucèmia mieloide crònica, la tècnica de CC ha estat i és la tècnica *gold standard* per a l'estudi citogenètic en les malalties hematològiques clonals i, per tant, també en les SMD¹¹⁷. Tot i això, amb el temps, altres tècniques s'han anat aplicant per a l'estudi de la presència i incidència d'alteracions citogenètiques tals com guanys, pèrdues o translocacions.

1.1. Importància de la tècnica de FISH

La tècnica de FISH és una tècnica amb major sensibilitat que la CC. En el primer estudi presentat en aquesta tesi es va demostrar com l'aplicació d'aquesta tècnica per

l'estudi de la deleció 5q és de gran utilitat¹¹⁵, especialment en aquells casos en que l'estudi de CC no ha mostrat metafases ($\approx 20\%$ de detecció) i, per tant, no es disposa de cap tipus d'informació citogenètica. A més, és altament recomanable aplicar-la en casos en que es té la sospita morfològica de tractar-se d'una "SMD amb deleció 5q aïllada" segons la classificació de la OMS 2001¹⁷ o 2008⁶. De tots els casos amb cariotip normal, el $\approx 6\%$ ha mostrat deleció 5q mitjançant FISH; aquests resultats estan dins dels límits presentats en la literatura (0-14%)^{91,92,94,95,118-120} però la nostra sèrie és quatre vegades més llarga que la publicada fins el moment de presentació d'aquesta tesi, la qual presentava resultats molts similars als nostres (4,95% de deleció 5q en SMD amb cariotip normal)⁹¹.

A més, l'aplicació de la tècnica de FISH permet la redefinició del cariotip en casos amb el cromosoma 5 implicat (per exemple, una translocació) o en casos en que la CC havia mostrat monosomia 5. És altament probable que la presència de cromosomes marcadors, en casos amb un cariotip complex amb monosomia 5, corresponguin a material d'aquest cromosoma, tal com s'ha demostrat per tècniques d'SKY (*Spectral Karyotyping*)¹²¹⁻¹²⁶ o mitjançant FISH¹²⁷.

A més del seu valor diagnòstic, la tècnica de FISH té un valor pronòstic tal com va demostrar Rigolin i cols. a l'any 2001. La FISH permet la detecció de clons interfàsics amb avantatge proliferativa que amb el temps determinen que el pacient evolucioni a LMA. D'altra banda, presenta una limitació important i és que només es disposa d'informació de la sonda que s'està estudiant⁹¹. L'estudi en el moment del diagnòstic permet avançar-se a una possible evolució de la malaltia. Amb aquesta mateixa idea s'han publicat treballs que han mostrat que la tècnica de FISH pot ser útil en el seguiment de pacients amb SMD que rebran tractament amb 5-azacitidina o lenalidomida per veure l'adquisició d'alteracions cromosòmiques. Göhring i cols. (2011)¹²⁸ va estudiar una cohort de 302 pacients tractats amb lenalidomida abans del tractament, als 6, 12 i 18 mesos mitjançant la tècnica de CC i FISH. L'estudi en paral·lel mitjançant les dues tècniques va permetre detectar no remissions citogenètiques, evolucions clonals i recaigudes. L'estudi mitjançant FISH està limitat a la sonda que s'utilitza, en aquest cas, per la regió 5q31; gràcies a la tècnica de FISH es van poder detectar casos de no remissió citogenètica i de recaiguda degut a la major sensibilitat de la tècnica respecte la CC. No obstant, la CC fa un anàlisi global del genoma, fet que

permet detectar l'adquisició o no d'alteracions addicionals a la deleció 5q (evolució clonal).

Amb un objectiu similar, un altre grup (Braulke i cols., 2010) va estudiar, mitjançant FISH, cèl·lules CD34 aïllades de SP abans de l'inici de cada cicle de tractament amb 5-azacitidina. L'estudi va mostrar que la tècnica de FISH permet obtenir resultats similars en terme de percentatge d'alteracions que la CC (també en la deleció 5q)¹²⁹. D'altra banda, tal i com mostren altres estudis i el treball I¹¹⁵, la tècnica de FISH no pot substituir a la CC ja que aquesta és una tècnica complementària de gran utilitat en el diagnòstic i seguiment de les SMD.

1.2. Importància de la tècnica de *microarrays* genòmics

En el Treball III (annex 1) es va estudiar l'aplicació de tècniques de major resolució com són els *microarrays* genòmics. Aquests han mostrat ser de gran utilitat en l'estudi de les SMD, des de dos punts de vista, per la detecció d'alteracions citogenètiques críptiques i pel seu impacte pronòstic. La tècnica de FISH mitjançant sondes creades a partir de BACs han permès la confirmació de les alteracions detectades per *microarrays* ja siguin d'HGC⁹⁹ o de SNP, com és el nostre cas.

Els *microarrays* de SNP permeten la detecció d'alteracions en el nombre de còpies com els *microarrays* d'HGC i una de les principals avantatges és la detecció de pèrdues d'heterozigositat. La detecció d'aquest tipus d'alteració ha permès aprofundir en l'estudi del càncer i la descoberta de possibles gens responsables de la fisiopatologia del càncer⁷⁴. Per aquest motiu, aquesta va ser la plataforma escollida per portar a terme el treball III.

En tots els casos la deleció de 5q, prèviament detectada per CC o FISH, es va confirmar mitjançant els *microarrays*. L'impacte pronòstic de les alteracions addicionals detectades mitjançant *microarrays* s'ha demostrat en sèries àmplies de SMD (250 casos) i d'altres malalties mieloides relacionades⁹⁸ i en sèries centrades en la deleció 5q en malalties hematològiques d'origen mieloide¹⁰¹. La presència i número de noves alteracions detectades mitjançant *microarrays* de SNP han mostrat impacte pronòstic independent sobre la SG i la supervivència lliure de progressió⁹⁸. L'estudi elaborat per Jerez i cols. (2012)¹⁰¹ va recollir dades de *microarrays* genòmics de SNP en 1155 pacients, 473 dels quals eren SMD, d'aquests, el 22% presentaven deleció 5q. En

comparació amb els nostres resultats (annex I), van detectar alteracions addicionals en casos amb deleció 5q com a única alteració per CC en un major nombre de casos (52,3% vs. 26,3%) tot i que la quantitat de casos en aquest subgrup no diferia massa del nostre (44 vs. 38). Aquestes diferències poden recaure en les característiques clíniques de la sèrie ja que la nostra inclou pacients tractats amb lenalidomida i, normalment, els pacients candidats a aquest tractament són de baix risc i amb un curs clínic no tan agressiu i, per tant, no és de sorprendre que la detecció d'alteracions citogenètiques críptiques inicials sigui menor. El treball de Jerez i cols. (2012)¹⁰¹ també va establir una categorització citogenètica amb impacte pronòstic en base als resultats obtinguts dels *microarrays*, en funció de la presència o no de la regió retinguda en la "Síndrome 5q-" i la presència o no d'una LOH a 17p. La nostra sèrie era més limitada i amb un seguiment més curt, a més, el principal objectiu era la determinació de l'impacte pronòstic en la resposta al tractament amb lenalidomida.

Tot i que els nostres resultats estan d'acord amb la literatura, quan es tracta de resultats de *microarrays* genòmics cal tenir en compte l'algorisme d'anàlisi que s'utilitza, ja sigui per determinar alteracions en el nombre de còpies com per detectar DUPs. Les principals diferències es mostren en termes de detecció de DUPs. L'any 2009 Heinrichs i cols. van publicar un treball en que mostraven la importància de l'anàlisi en paral·lel de mostra tumoral i mostra control del propi pacient per tal d'evitar falsos positius de DUPs⁹⁷. Per aquest motiu, sempre que ha estat possible s'han estudiat les alteracions adquirides, mitjançant els *microarrays* genòmics, en paral·lel amb mostra control del mateix pacient (limfòcits CD3+). No obstant, no sempre es pot portar a terme, ja sigui per limitacions econòmiques i/o disponibilitat de la mostra control. Per aquest motiu Maciejewski i cols. (2009)¹³¹ van desenvolupar un algorisme d'anàlisi (seguint criteris de mida i localització de la regió implicada) en base a la informació que disposaven de més de 1000 controls estudiats mitjançant la tècnica de *microarrays* de SNP. Basant-nos en aquest dos estudis, vam desenvolupar el nostre propi algorisme d'anàlisi (Figura 18).

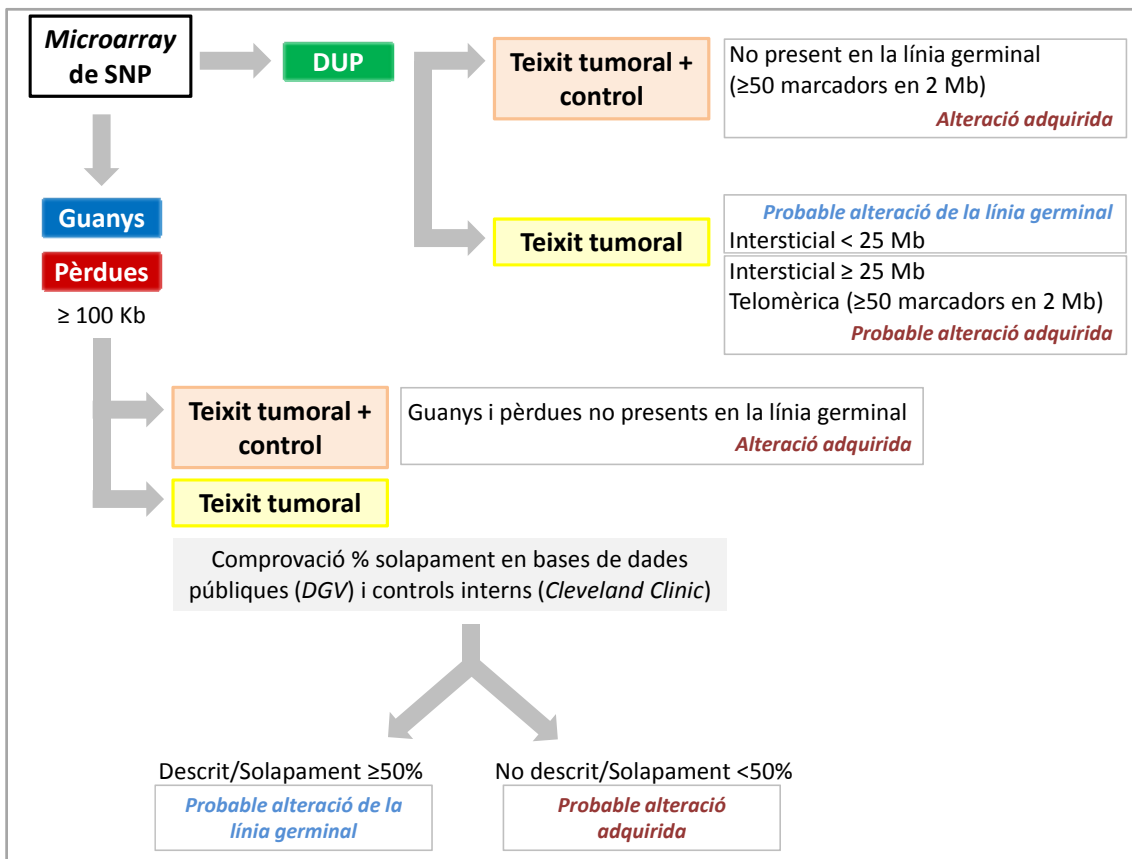


Figura 18. Algorisme d’anàlisi dels microarrays genòmics de SNP usat en el nostre laboratori

Abreviatures: DUP: disomia uniparental.

Un altre punt controvertit en aquest tipus d’estudi és el teixit control que s’utilitza, la majoria d’estudis en SMD utilitza limfòcits CD3+ aïllats de la SP del propi pacient⁹⁸ o mucosa bucal⁹⁷. La mucosa bucal té l’avantatge d’obtenir quantitat suficient d’ADN per portar a terme els estudis, però pot presentar contaminació bacteriana o infiltració de SP¹³¹. La idoneïtat dels limfòcits CD3+ recau en el fet que es tracta d’un tipus cel·lular fàcil d’obtenir (a partir de SP), tot i que d’un llinatge cel·lular diferent al mieloide. L’any 2011¹³² es va publicar un estudi que mostrava la no idoneïtat d’aquest tipus de teixit basant-se en estudis realitzats a partir de *microarrays* genòmics d’HGC, ja que les cèl·lules T tindrien un mateix origen que les cèl·lules mielodisplàstiques, aquestes mostraven les mateixes alteracions que les cèl·lules CD34+; tot i que no s’especificava la puresa de la població de cèl·lules CD3+ estudiada. La detecció d’alteracions en les cèl·lules T pot venir donada per infiltració per part de cèl·lules del llinatge mieloide. Per

aquest motiu, és molt important assegurar una puresa de limfòcits CD3+ superior al 85% (el límit de sensibilitat de la tècnica de *microarrays* és del 20%).

Els punts de trencament i determinació de la RCD ha estat un tema àmpliament estudiat en la deleció 5q. En el treball II, mitjançant CC (a partir de 383 fórmules citogenètiques) es va determinar que els punts de trencament més freqüents eren: q13q33, q13q31, altres punts inespecífics, seguit del q22q33. No obstant, no es van observar diferències en termes de freqüència en funció del diagnòstic de “Síndrome 5q-” o SMD no-“Síndrome 5q-”. La resolució de la tècnica de CC és de 10 Mb fet que impossibilita la correcta i precisa determinació dels punts de trencament de la deleció. L’anàlisi mitjançant tècniques de major resolució com els *microarrays* han permès fer anàlisis més exhaustius i acurats tant de la regió delecionada com de la regió conservada. Els punts de trencament són altament variables (tenint en compte la limitació de la sèrie estudiada, 52 pacients), en destaca que per CC la banda proximal de trencament és, normalment, q13 i per *microarrays* es confirma que en delecions intersticials és q14. També es va poder determinar la RCD de 14,6 Mb (5q22.3-q31.1) on la mediana de material delecionat era de 69,7 Mb. Com s’ha mencionat anteriorment, en la sèrie de pacients estudiats per CC no es van observar diferències en funció del diagnòstic segons la OMS 2001¹⁷. D'altra banda, per *microarrays* genòmics s’observen dos RCD diferenciades en funció de si es tracta d’una SMD “Síndrome 5q-” (5q22.3-q33.1) o no-“Síndrome 5q-” (5q22.1-q31.1). Aquestes diferències coincideixen amb les descrites en la literatura en que la implicació de les bandes q32 i q33 es relacionen amb SMD “Síndrome 5q-” i la banda 5q31 amb altres SMD i LMA²⁹.

Mitjançant estudis de *microarrays*, en els pacients diagnosticats de “Síndrome 5q-”, els nostres resultats coincideixen, amb límits més amples, amb un dels primers estudis publicats per Boulwood i cols. l’any 2002³⁰. És sorprenent veure com els pacients amb diagnòstic de “Síndrome 5q-”, una entitat de curs clínic favorable, la RCD és major que en la resta de SMD que presenten deleció de 5q, la RCD implica major pèrdua de material genètic. Douet-Guilbert i cols. (2012) i Jerez i cols. (2012), aposten per parar atenció en els gens retinguts en el cromosoma 5^{101,133}. Per aquest motiu, Jerez i cols. (2012) van estudiar les SMD i malalties mieloides relacionades en base a la presència o absència de la regió retinguda en la “Síndrome 5q-”, i la seva relació amb el subtipus

pronòstic (índex IPSS). Van determinar que els pacients que perdien la regió retinguda en la “Síndrome 5q-” tenien pitjor pronòstic¹⁰¹.

En la nostra sèrie de pacients estudiats per CC es va observar com els pacients amb el punt de trencament q22q33 (30 casos), que implica menor pèrdua de material genètic, sorprenentment, la mediana de SG era menor a la de la resta de la sèrie (24,0 mesos vs. 40,9 mesos), tot i que aquestes diferències no eren estadísticament significatives.

2. Factors pronòstics en les SMD amb deleció 5q

2.1. Les alteracions citogenètiques acompanyants determinen el pronòstic per davant del percentatge de blastes en MO

El treball II¹¹⁶ es centra en les alteracions addicionals a la deleció 5q detectades per CC. El cariotip va mostrar que les alteracions acompanyants per ordre de freqüència (com a única alteració) eren la deleció 12p, trisomia 21, trisomia 8 i deleció 20q. En formar part d'un cariotip complex, les alteracions més freqüents eren alteracions afectant al cromosoma 17, -18/18q-, trisomia 8, deleció 20q, monosomia 7 ó alteracions afectant al cromosoma 3. Mitjançant la tècnica de *microarrays* coincidint amb els estudis de CC, l'alteració addicional detectada més freqüent va ser la deleció de 12p. Aquesta troballa també coincideix amb d'altres estudis centrats en SMD amb deleció 5q tractats¹³⁰ o no¹⁰⁰ amb lenalidomida, així com el número d'alteracions en el nombre de còpies¹⁰⁰.

La deleció 5q és una alteració citogenètica associada a bon pronòstic, no obstant, pot anar acompanyada d'altres alteracions citogenètiques que podrien canviar aquest bon pronòstic. El principal resultat del nostre estudi en pacients amb SMD i deleció 5q va ser la determinació de que la presència d'una alteració citogenètica addicional no tenia un impacte significatiu en la SG del pacient. En la Taula 19 es mostren les principals sèries presentades fins el moment de presentació de la tesi. Fins el moment de realització del treball dues sèries s'havien centrat en l'estudi de SMD amb deleció 5q amb 76¹² i 130⁷⁸ pacients, eren sèries limitades en nombre de pacients i no s'havien centrat especialment en l'impacte de les alteracions citogenètiques acompanyants. Fins al moment, el principal predictor de resposta descrit era el percentatge de blastes en MO^{22,78}. La sèrie presentada per Holtan i cols. (2008) introduïa com a factor predictiu el cariotip, el percentatge de metafases portadores de la deleció 5q (3 grups: <50 %, 50-99 % i 100 %) i el recompte de limfòcits. Posterior a la publicació del nostre

treball, Germing i cols. (2012) van presentar l'anàlisi de 381 pacients amb deleció 5q de risc baix o intermedi-1⁸⁰. La principal avantatge d'aquesta nova sèrie és l'anàlisi de l'impacte pronòstic de la dependència transfusional, variable no recollida en el nostre anàlisi. La comparació amb els resultats publicats és difícil donada les diferències en la inclusió de pacients així com les variables recollides i analitzades.

Taula 19. Comparació de diferents sèries centrades en l'estudi de variables pronòstiques en les SMD amb deleció 5q amb el nostre treball

	Giagounidis i cols.²², 2004 n=76	Holtan i cols.⁷⁸, 2008 n=130	Mallo i cols.¹¹⁶, 2011 n=541	Germing i cols.⁸⁰, 2012 n=381
Seguiment*	67,0	15,8 (1,0-147,0)	17,2 (1,0-326,0)	49,8 (1,0-350,0)
SG* general	146,0	9,5	36,8	75,0
Factors predictors (anàlisi multivariant)		Cariotip		Cariotip complex
		Blastes en MO	Cariotip	Dependència transfusional
		Percentatge de metafases amb 5q-	Plaquetes ¹	Plaquetes ²
		Blastes en MO	Blastes en MO	Anèmia
		Recompte de limfòcits	Edat (≥60 anys)	Edat (≥65 anys)
SG	5q-	145,0 (n=66)	-	63,4 (n=275)
	5q- + 1	45,0 (n=10)	-	46,0 (n=89)
	5q- + ≥2	-	-	6,8 (n=148)

¹ Punt de tall tant a $150 \times 10^9/L$ com a $100 \times 10^9/L$. ² Punt de tall a $100 \times 10^9/L$.

*Seguiment i SG expressat en mediana de mesos.

Abreviatures: MO: medul·la òssia; SG: supervivència global.

En l'estudi de Germing i cols. (2012)⁸⁰ no es va fer ènfasi en la influència de la presència d'una única alteració addicional a la deleció 5q en termes de mediana de SG, però en l'anàlisi multivariant es mostra com el cariotip amb una única alteració addicional a la deleció 5q no implica major risc. En canvi, el cariotip amb 2 ó més alteracions acompanyants és una de les principals variables amb valor pronòstic independent, tot i això, el número de pacients d'aquest grup és limitat, donat que els pacients inclosos en aquesta sèrie són de risc baix o intermedi-1.

El bon pronòstic del subgrup de pacients amb una única alteració addicional s'ha vist reforçat amb la nova categorització citogenètica en la revisió de l'índex pronòstic IPSS, l'IPSS-R³⁹. En aquest nou índex revisat s'ha inclòs la deleció 5q i la deleció 5q amb una alteració acompanyant (excepte amb deleció 7q o monosomia 7) dins de la mateixa categoria pronòstica citogenètica, dins del grup de bon pronòstic. Aquesta inclusió es va fer en base a un estudi previ en que s'havien analitzat més de 2900 pacients amb SMD²⁸, alguns d'ells inclosos en el treball II ja que es tracta d'un treball multicèntric.

En les diferents sèries presentades en la Taula 19, un dels factors pronòstics comuns és el percentatge de blastes en MO, tot i això, Germing i cols.⁸⁰ no el mostren com un factor pronòstic en la SG (anàlisi multivariant). Aquest fet pot venir donat pel baix nombre de pacients amb percentatge de blastes superior al 5% (12% vs. 38% en la nostra sèrie), en canvi, sí que en destaca la dependència transfusional. El percentatge de blastes en MO té un gran paper pronòstic, sobretot en termes d'evolució a LMA (se'n discutirà més endavant), però fins fa poc s'havia sobreestimat el seu impacte per sobre del cariotip. Schanz i cols. (2011) van mostrar com els casos amb cariotip complex amb el cromosoma 5 ó 7 implicat tenien pitjor pronòstic que els pacients amb un percentatge de blastes elevat (21-30%)³⁷. El poder pronòstic del cariotip també es manté en les SMD amb deleció 5q ja sigui amb un recompte de blastes a MO inferior al 5% o al 10%. En el nostre estudi es va observar com el bon pronòstic de la categoria 5q- + 1 es mantenia en els dos subgrups de pacients, fet que porta a pensar que es podria establir el 10% com a punt de tall pels SMD de risc intermedi si més no en les SMD amb deleció 5q aïllada o amb una alteració acompanyant.

Com s'ha mencionat anteriorment la comparativa amb la sèrie de Germing i cols.⁸⁰ és difícil donades les diferents característiques clíniques dels pacients inclosos. En la nostra sèrie es va fer un sub-anàlisi (n=107) restringit als pacients amb IPSS baix i intermedi-1 (criteris d'inclusió de la sèrie de Germing i cols.). Els resultats observats estaven en la mateixa línia que els observats en la SG de la sèrie total, l'impacte pronòstic dels subgrups citogenètics, l'edat i les plaquetes es mantenien. Si es comparen les dades de Germing i cols. (n=381) amb les nostres, s'observa una menor mediana de SG en el nostre grup (75 mesos vs. 50,9 mesos), aquestes diferències poden recaure en el fet que la sèrie alemana era més àmplia i presentava un major nombre de pacients amb deleció 5q com a únic canvi.

2.2. L'evolució a LMA en les SMD amb deleció 5q

L'evolució a LMA en les SMD amb deleció 5q ha estat un tema de debat, especialment, per l'aprovació de la lenalidomida. La *Food and Drug Administration* va aprovar-ne Estats Units en pacients amb SMD i deleció 5q de risc baix/intermedi-1 amb dependència transfusional, en canvi, per part de l'Agència Europea del Medicament es va rebutjar la seva aprovació a Europa perquè no es disposaven de dades sobre l'impacte en la SG i l'evolució a LMA.

En el treball II es van aportar dades que han ajudat a un millor coneixement de la història natural de les SMD amb deleció 5q i, en concret, de l'evolució a LMA. Aquest anàlisi es va portar a terme en 299 pacients, que no havien rebut tractament, i es va determinar que la probabilitat actuarial d'evolució a LMA als cinc anys era del 38,8%. En les SMD de risc baix i intermedi-1 (amb deleció 5q) era de 21,2% i 25,6% respectivament. L'altra gran sèrie que ha estudiat l'evolució a LMA en profunditat i en un llarg nombre de pacients és la de Germing i cols.⁸⁰. La Taula 20 mostra la comparativa entre les dues sèries.

Taula 20. Evolució a LMA, comparació de la nostra sèrie amb la de Germing i cols.

	Mallo i cols. ¹¹⁶ , 2011 n=299	Germing i cols. ⁸⁰ , 2012 n=381
LMA*	38,8 %	14,7%
Factors predictors (anàlisi multivariant)	Cariotip Plaquetes ¹ Blastes en MO ²	Blastes en MO Dependència transfusional
LMA*	5q- 21,1% (n=160)	15,2% (n=311)
	5q- + 1 57,6% (n=43)	9,1% (n=54)
	5q- + ≥2 84,0% (n=96)	22,2% (n=16)

¹ Punt de tall tant a $150 \times 10^9/L$ com a $100 \times 10^9/L$. ² Blastos en MO, 3 grups: <5, 5-10 i >10%.

* Probabilitat actuarial d'evolució a LMA als 5 anys.

Abreviatures: LMA: leucèmia mieloide aguda; MO: medul·la òssia.

La probabilitat d'evolució als 5 anys difereix entre les dues sèries, en la sèrie de Germing i cols. (2012) és bastant inferior (14,7%), això pot ser degut al fet que s'estudien pacients de risc baix i intermedi-1⁸⁰. En centrar-nos amb el subanàlisi en

pacients de risc baix/intermedi-1, aquesta diferència s'escurça (14,7% vs. 23,5%). Un altre dels fets diferenciadors són els factors predictius, en el nostre treball es va descriure com el cariotip tenia impacte pronòstic però diferenciant tres grups citogenètics (5q-, 5q- + 1 i 5q- + ≥2); en termes d'evolució a LMA, la presència d'una alteració addicional a la deleció 5q sí que confereix pitjor pronòstic. La segona variable amb impacte era el baix recompte de plaquetes i, la última variable, era el percentatge de blastes a MO. No obstant, en el treball de Germing i cols. (2012), aquesta última és la variable amb més pes pronòstic seguit de la dependència transfusional⁸⁰.

3. Determinadors clínics i moleculars en la resposta al tractament amb lenalidomida

3.1. Impacte pronòstic de les alteracions detectades per *microarrays* de SNP i mutacions

En el Treball III (annex 1) es va portar a terme l'anàlisi mitjançant *microarrays* de SNP i l'estudi molecular de sis gens: *CBL*, *TET2*, *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2* i *TP53*. Malauradament, la presència o no d'alteracions citogenètiques addicionals detectades per *microarrays* de SNP no ha semblat ser un tret diferenciador entre els pacients que responen i els que no responen al tractament amb lenalidomida. Respecte l'anàlisi mutacional, en els estudis presentats fins el moment en sèries de SMD amb deleció 5q s'havia mostrat que la mutació en els gens *IDH1* i *IDH2* es relacionava amb SMD avançats¹¹⁴, fet que concorda amb el que observem a la nostra sèrie en que hi havia un únic cas amb mutació d'*IDH2*, amb un IPSS intermedi-1 i alteracions addicionals a la deleció 5q. En la literatura no hi ha estudis moleculars centrats en les SMD amb deleció 5q i la seva distribució en funció del cariotip, encara que una comunicació personal del grup d'Ebert i col·laboradors (Figura 19) mostra mutacions en diferents gens en funció de la presència o absència d'alteracions acompanyants a la deleció 5q. És de destacar com els pacients amb deleció 5q aïllada presenten més mutacions en gens associats a bon pronòstic o pronòstic incert com són *SF3B1* i *TET2*, respectivament. En canvi, els pacients amb cariotip complex (i deleció 5q) presenten menor freqüència de mutacions en el gen *SF3B1* (18,18% vs. 3,33%) i major en el gen *TP53* (4,54% vs. 46,67%)¹¹¹.

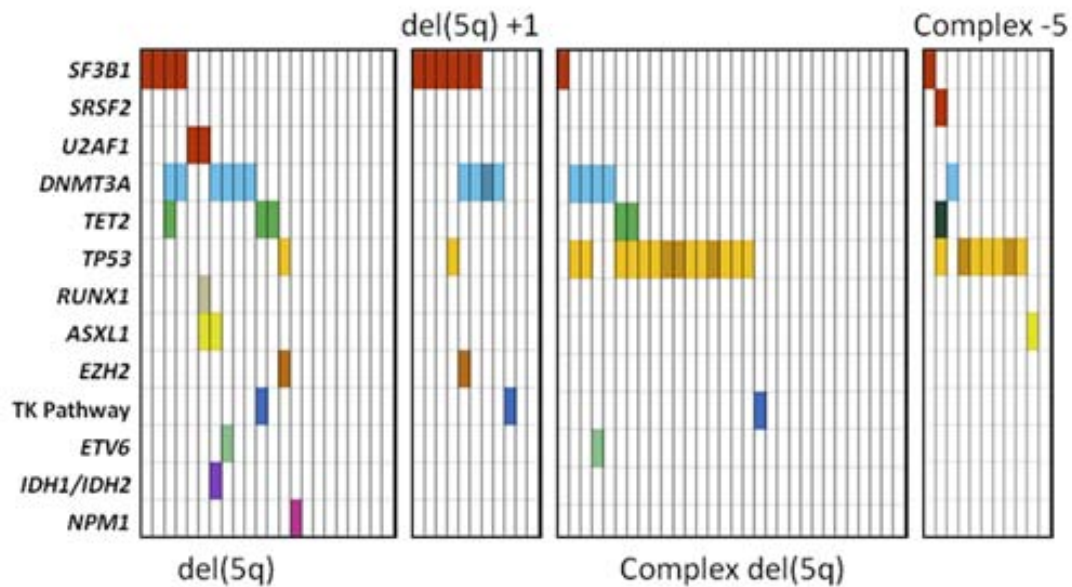


Figura 19. Distribució de mutacions en funció de la presència o absència d'alteracions acompanyants a la delecio 5q¹¹¹

En la nostra sèrie (limitada a l'estudi mutacional en un mínim de 43 pacients), les mutacions més freqüents afectaven als gens *TET2* i *TP53*, d'acord amb el comunicat per Bejar i Ebert¹¹¹. Tot i això, el gen amb més impacte descrit fins el moment tant en termes d'impacte pronòstic^{112,134} com impacte en la resposta al tractament amb lenalidomida¹⁰⁹ és *TP53*. En la nostra sèrie es va observar mutat aquest gen en 5 de 45 casos i va mostrar certa tendència a predir no resposta hematològica, a més cap cas mutat va assolir remissió citogenètica completa. Aquestes dades coincideixen amb el descrit per Jädersten i cols. (2011)¹⁰⁹, que van determinar com la presència de mutacions a *TP53* estava relacionada amb l'evolució a LMA en pacients tractats amb lenalidomida¹⁰⁹. En el nostre cas, aquest paràmetre no es va poder establir correctament degut al baix nombre de casos que evolucionaven a LMA (un únic cas amb mutació de *TP53* va evolucionar) i el curt seguiment de la sèrie.

TP53 és un gen supressor de tumors que juga un paper important en el control del cicle cel·lular i l'apoptosi. Estudis en SMD han mostrat la relació d'aquest gen amb la delecio 5q i el tractament amb lenalidomida, tal i com es mostra en la Figura 20.

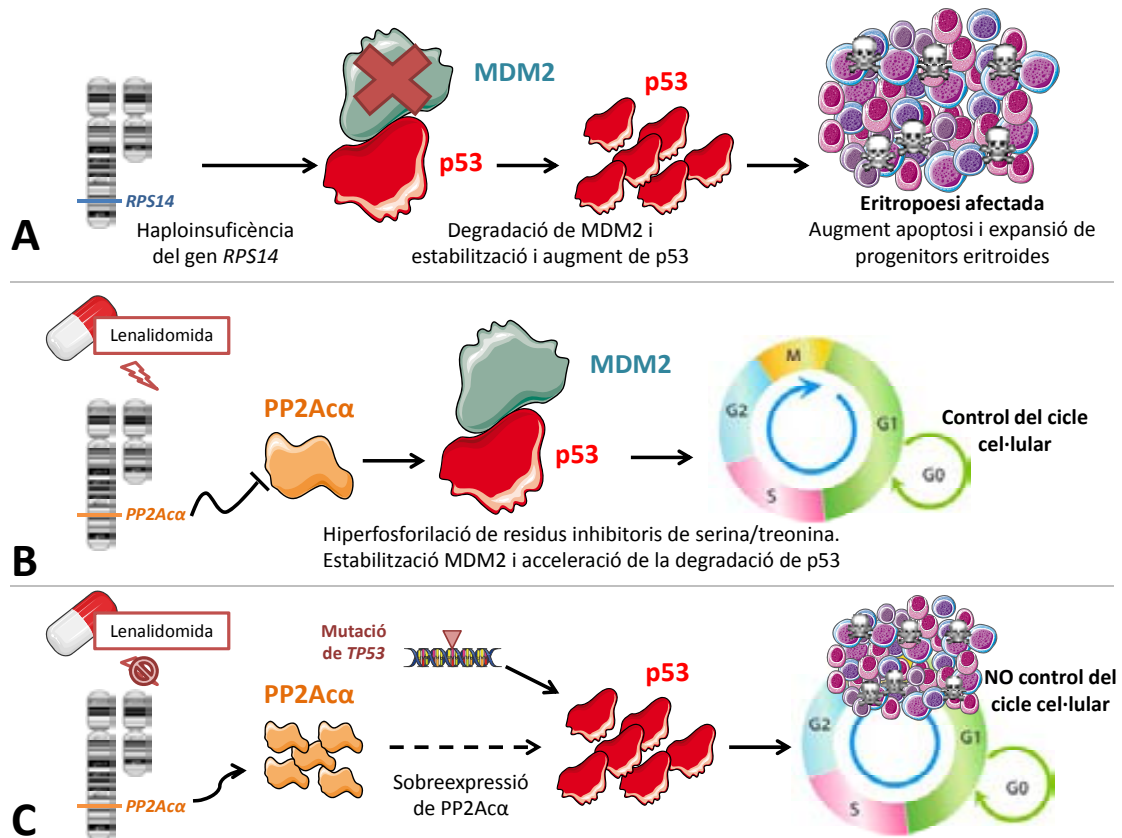


Figura 20. Paper del gen *TP53* i la seva proteïna (p53) en les SMD amb deleció 5q (Resum adaptat de Komrokji i cols.,¹³⁵ i Wei i cols.,¹³⁶).

A. SMD amb deleció 5q: L'alliberament nuclear de proteïnes ribosomals lliures conseqüència de biogènesi ribosomal alterada (haploinsuficiència de *RPS14*) condueix a promoure la degradació de la proteïna MDM2, estabilitzant p53, que condueix a una afectació de l'apoptosi. **B. SMD amb deleció 5q tractat amb lenalidomida.** La lenalidomida inhibeix la proteïna PP2Aα. La hiperfosforilació dels residus inhibitoris de serina/treonina de la proteïna MDM2 suprimeix la seva ubiquitinació i accelera la degradació proteasomal de p53. **C. SMD amb deleció 5q resistent al tractament amb lenalidomida.** En pacients resistents s'observa sobreexpressió de PP2Aα i/o mutacions dels gen *TP53*. En conseqüència, es produeix acumulació de la proteïna p53 que condueix a un no control del cicle cel·lular.

Els estudis portats a terme per Jädersten i cols. (2011)¹⁰⁹ i Wei i cols. (2012)¹³⁶ mostren una relació entre la resposta al tractament i l'estatus del gen *TP53*, ja sigui a nivell de gen (les mutacions condueixen a una sobreexpressió de la proteïna) com a nivell proteic en que conseqüència d'alteracions en altres gens es produeix acumulació de p53. Mutacions del gen *TP53* ha mostrat tenir un fort impacte pronòstic advers en les SMD en general (9 mesos [*TP53* mutat] vs. 66 mesos [*TP53* no mutat]) i en les SMD

amb deleció 5q (23 mesos [*TP53* mutat] vs. 66 mesos [*TP53* no mutat])¹¹². Per aquest motiu, seria altament recomanable realitzar l'estudi mutacional del gen *TP53*, especialment en pacients candidats a rebre tractament amb lenalidomida¹⁰⁹ i/o estudis d'immunohistoquímica de p53¹³⁶ i, d'aquesta forma disposar de dades pronòstiques en termes de SG i de resposta al tractament.

3.2. Impacte pronòstic de les característiques clínico biològiques

A banda d'estudis moleculars, que no sempre es poden portar a terme en tots els laboratoris de diagnòstic hematològic, el tercer treball va determinar dos predictors per la no resposta al tractament amb lenalidomida, les alteracions citogenètiques acompanyants a la deleció 5q i el recompte de plaquetes basal (punt de tall de $280 \times 10^9/L$ per resposta hematològica i de $240 \times 10^9/L$ per l'adquisició d'independència transfusional).

La presència d'una alteració citogenètica addicional (detectada per CC) es relaciona amb la no adquisició d'independència transfusional i la no resposta hematològica en els pacients tractats amb lenalidomida. A diferència del seu bon pronòstic en termes de SG¹¹⁶, l'alteració citogenètica addicional té efectes pronòstics en el tractament, en concordança amb l'observat en assajos clínics que havien mostrat com la presència d'alteracions addicionals estava relacionada amb una menor taxa de resposta hematològica i citogenètica¹³⁵.

Les plaquetes era l'altre factor pronòstic, ja descrit prèviament en assajos clínics. El recompte elevat de plaquetes s'ha associat a l'adquisició de resposta hematològica i independència transfusional^{45,139,140}.

3.3. L'evolució a leucèmia mieloide aguda en el pacients amb SMD i deleció 5q tractats amb lenalidomida

Dades basades en assajos clínics en pacients tractats amb lenalidomida mostren com el risc d'evolució a LMA és similar entre els pacients 5q- i els 5q- + 1 però que augmenta en tractar-se de cariotips complexes¹³⁷. Aquest resultat es contradiu amb el descrit posteriorment en sèries de SMD i deleció 5q no tractades, tant per la nostra sèrie¹¹⁶ (Treball II) com per la de Germing i cols.⁸⁰. Com s'ha mencionat anteriorment, el punt crític per l'aprovació de la lenalidomida a Europa va ser el seu impacte en la progressió

a LMA. No obstant, estudis posteriors han mostrat com el tractament amb lenalidomida no augmenta la probabilitat d'evolució a LMA⁴⁶, i les dades no difereixen massa de les presentades en la nostra sèrie¹¹⁶ i en la de Germing i cols.⁸⁰. Però cal tenir en consideració que les nostres dades es basen en probabilitat d'evolució a LMA als 5 anys, mentre que en assajos clínics de pacients tractats amb lenalidomida són dades als 2 anys.

La resposta o resistència al tractament també juga un paper important en la progressió de la malaltia, els pacients no responedors presenten major risc d'evolució clonal i de progressió a LMA^{135,138}. En el Treball III en fem una aproximació tot i que la sèrie és limitada en nombre de pacients. En l'anàlisi de riscos competitius en que es compara la probabilitat de transformació a LMA enfront a la probabilitat de mort sense transformació, es va observar com els pacients que no adquireixen independència transfusional, la probabilitat d'evolució a LMA és major (50% vs. 8%, $P=0,003$).

4. “Síndrome 5q-”: relació amb la supervivència global, l'evolució a leucèmia mieloide aguda i la resposta al tractament amb lenalidomida

Els tres treballs presentats en la tesi utilitzen la classificació de la OMS 2001¹⁷ per les SMD. Donat que els diagnòstics dels pacients inclosos en cadascun dels treballs es van portar a terme quan l'esmentada classificació estava vigent es farà referència a la “Síndrome 5q-” per parlar de l'entitat establerta per la OMS 2001.

Aquest subgrup diagnòstic ha estat sempre considerat de bon pronòstic, en el Treball II es recollia un total de 140 pacients amb el diagnòstic de “Síndrome 5q-” en que la mediana de SG era de 65,9 mesos, aquestes dades coincideixen amb la sèrie presentada per Patnaik i cols. l'any 2010 en que determinaven una mediana de SG de 66 mesos⁷⁹. En aquest treball s'hi van estudiar 88 pacients amb el diagnòstic de “SMD amb deleció 5q aïllada” segons la OMS 2008, equiparable a la “Síndrome 5q-” definida per la OMS 2001. L'anàlisi multivariant va determinar que els factors pronòstics adversos eren el recompte de plaquetes igual o inferior a $150 \times 10^9/L$ i l'edat superior a 60 anys. L'estudi de Patnaik i cols. va establir com a factors adversos: l'edat superior a 70 anys, la presència de disgranulopoesi i les necessitats transfusionals⁷⁹; aquests dos últims paràmetres corresponents a variables no recollides i analitzades en la nostra sèrie.

Disset pacients van evolucionar a LMA, el que suposa un 12,1% dels pacients dels quals es disposava informació (n=140). La probabilitat actuarial d'evolució a LMA en aquest subgrup de pacients és inferior respecte a les SMD no-"Síndrome 5q-": 18,2% vs. 49,2%. Malauradament no es van poder determinar factors pronòstics en l'evolució a LMA donada la baixa incidència de casos. Patnaik i cols. tampoc en descriu, només 5 pacients (5,7%) havien evolucionat a LMA⁷⁹.

També s'ha mostrat que els pacients amb diagnòstic de "Síndrome 5q-" (n=30), s'associa a la resposta al tractament amb lenalidomida, fet que corrobora el bon pronòstic d'aquest subgrup de pacients. Com s'ha mencionat, la presència d'alteracions citogenètiques addicionals està estretament relacionada amb la progressió de la malaltia. Per definició, la "Síndrome 5q-" no presenta alteracions addicionals per CC (excepte la pèrdua del cromosoma Y^s). No obstant, l'estudi mitjançant *microarrays* va poder determinar que la presència d'alteracions críptiques addicionals era inferior a la cohort de SMD no-"Síndrome 5q-" (31,0% [n=30] vs. 47,8% [n=22]), tot i això cal sèries més llargues per determinar l'impacte pronòstic de les alteracions críptiques detectades per *microarrays* en aquest subgrup de pacients.

^sLa classificació OMS del 2008 inclou l'excepció de la pèrdua del cromosoma Y per la definició d'aquesta entitat tot i no estar basat en estudis previs publicats.

Conclusions

No hi ha fets, només interpretacions

Friedrich Nietzsche

1. L'estudi de FISH al moment del diagnòstic en pacients amb SMD mostra que:
 - 1.1. La incidència de la deleció 5q en SMD que per CC no mostraven l'esmentada deleció és del 5,96%. Tenint en compte aquests resultats, en aquells casos que no es detecta 5q- per CC, caldria aplicar la tècnica de FISH per 5q31 al moment del diagnòstic en: casos amb SMD sense divisions, en casos amb cariotip alterat i cromosoma 5 implicat i en sospita citològica de "Síndrome 5q-".
 - 1.2. La detecció per FISH de la deleció 5q en el subgrup de pacients amb cariotip amb 5q- per CC va ser del 100%.

2. En les SMD amb deleció 5q:
 - 1.1. Les alteracions citogenètiques més freqüents són, per ordre de freqüència: deleció 12p, trisomia 21, trisomia 8 i deleció 20q (com a única alteració), i alteracions afectant al cromosoma 17, -18/18q-, trisomia 8, deleció 20q, monosomia 7 ó alteracions afectant al cromosoma 3 (dins d'un cariotip complex). La detecció d'una alteració acompanyant al 5q- (5q- + 1) és menys freqüent (17,4%) que la incidència de cariotips complexos (5q- + \geq 2), 28,9%.
 - 1.2. Les alteracions citogenètiques acompanyants tenen un valor pronòstic per davant del percentatge de blastes en MO. La presència d'una única alteració addicional no implica pitjor SG. En pacients amb deleció 5q o una única alteració acompanyant (5q- + 1) el pitjor pronòstic ve marcat per un recompte de blastes a MO superior al 10%.
 - 1.3. La presència d'una alteració citogenètica addicional suposa major probabilitat d'evolució a LMA. Els altres predictors pronòstics són: el recompte de plaquetes i el percentatge de blastes en MO.

3. L'estudi genètic mitjançant *microarrays* de SNP i anàlisi mutacional en pacients amb SMD i deleció 5q tractats amb lenalidomida:
 - 3.1. Els *microarrays* genòmics de SNP van detectar alteracions addicionals no prèviament detectades per CC en un 23,1% dels casos:

- Tres d'aquestes regions eren recurrents: 12p13.2-p13.1 (deleció), 15q26.1 (dos deleccions i una DUP), i 3q25.3-q26.1 (una deleció i una DUP).
 - Un 26,3% dels casos amb 5q- com a única alteració per CC presentaven alteracions per *microarrays*.
 - La RCD de les "Síndrome 5q-" és de mida més gran que la resta de SMDs amb deleció 5q, tot i que el valor de la mediana és similar.
- 3.2. El gens mutats per ordre de freqüència són: *TET2* (8 casos, 18,2%), *TP53* (5 casos, 11,1%), *CBL* (un cas) i *IDH2* (un cas). Un 15,9% dels pacients presentaven el polimorfisme rs11554137 del gen *IDH1*, associat a mal pronòstic en la LMA.
- 3.3. Respecte els factors pronòstics en el tractament amb lenalidomida:
- Les alteracions citogenètiques addicionals detectades per *microarrays* genòmics de SNP no permeten diferenciar entre respondors i no respondors al tractament amb lenalidomida.
 - La presència de mutacions en el gen *TP53* té tendència a predir fallada en la resposta hematològica, tot i no estar relacionat amb la independència transfusional.
 - La presència d'una única alteració citogenètica addicional detectada per CC i plaquetes baixes es relaciona amb la no adquisició d'independència transfusional i la fallada en la resposta hematològica.

Bibliografia

*No et quedis en el passat, no somiïs en el futur,
concentra la ment en el moment present*

Buddha

1. Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*. 1993;81(11):2844-2853.
2. Ploemacher RE. Characterisation and biology of normal human haematopoietic stem cells. European Hematology Association. *Haematologica*. 1999;84 Suppl EHA-4:4-7.
3. Woessner S i Florensa L. La citología óptica en el diagnóstico hematológico. Madrid: Acción Médica; 2006.
4. Eghbali-Fatourehchi GZ, Lamsam J, Fraser D, i cols. Circulating osteoblast-lineage cells in humans. *N Engl J Med*. 2005;352(19):1959-1966.
5. Kacena MA, Gundberg CM, Horowitz MC. A reciprocal regulatory interaction between megakaryocytes, bone cells, and hematopoietic stem cells. *Bone*. 2006;39(5):978-984.
6. Swerdlow H, Campo E, Harris NL, i cols. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC; 2008.
7. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, i cols. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 1982;51(2):189-199.
8. Verburgh E, Achten R, Louw VJ, i cols. A new disease categorization of low-grade myelodysplastic syndromes based on the expression of cytopenia and dysplasia in one versus more than one lineage improves on the WHO classification. *Leukemia*. 2007;21(4):668-677.
9. Malcovati L, Porta MG, Pascutto C, i cols. Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision making. *J Clin Oncol*. 2005;23(30):7594-7603.
10. Germing U, Strupp C, Kuendgen A, i cols. Prospective validation of the WHO proposals for the classification of myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2006;91(12):1596-1604.
11. Raza A i Galili N. The genetic basis of phenotypic heterogeneity in myelodysplastic syndromes. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(12):849-859.
12. Germing U, Strupp C, Kundgen A, i cols. No increase in age-specific incidence of myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2004;89(8):905-910.
13. Visser O, Trama A, Maynadie M, i cols. Incidence, survival and prevalence of myeloid malignancies in Europe. *Eur J Cancer*. 2012;48(17):3257-3266.

14. Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos (GESMD) y Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH). Guías españolas de diagnóstico y tratamiento de los síndromes mielodisplásicos y la leucemia mielomonocítica crónica. *Haematologica*. 2012;97(Supl. 5):58.
15. Balduini CL, Guarnone R, Pecci A, i cols. Multilineage dysplasia without increased blasts identifies a poor prognosis subset of myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 1998;12(10):1655-1656.
16. Germing U, Gattermann N, Strupp C, i cols. Validation of the WHO proposals for a new classification of primary myelodysplastic syndromes: a retrospective analysis of 1600 patients. *Leuk Res*. 2000;24(12):983-992.
17. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, i cols. *Pathology and Genetics. Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon: IARC Press; 2001.
18. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, i cols. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-951.
19. Maassen A, Strupp C, Giagounidis A, i cols. Validation and proposals for a refinement of the WHO 2008 classification of myelodysplastic syndromes without excess of blasts. *Leuk Res*. 2013;37(1):64-70.
20. Germing U, Strupp C, Kuendgen A, i cols. Refractory anaemia with excess of blasts (RAEB): analysis of reclassification according to the WHO proposals. *Br J Haematol*. 2006;132(2):162-167.
21. Van den BH, Cassiman JJ, David G, i cols. Distinct haematological disorder with deletion of long arm of no. 5 chromosome. *Nature*. 1974;251(5474):437-438.
22. Giagounidis AA, Germing U, Haase S, i cols. Clinical, morphological, cytogenetic, and prognostic features of patients with myelodysplastic syndromes and del(5q) including band q31. *Leukemia*. 2004;18(1):113-119.
23. Haase D. Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol*. 2008;87(7):515-526.
24. Pedersen-Bjergaard J, Andersen MK, Andersen MT, i cols DH. Genetics of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2008;22(2):240-248.

25. Solé F, Luño E, Sanzo C, i cols. Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2005;90(9):1168-1178.
26. Haase D, Germing U, Schanz J, i cols. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood*. 2007;110(13):4385-4395.
27. Ganster C, Bräulke F, Shirneshan K, i cols. FISH analyses in patients with myelodysplastic syndromes (MDS) and healthy controls suggest that the loss of a Y chromosome results from a combination of age-and disease-related factors. *Haematologica*. 2012;97(s1):37. Abstract no. 0343.
28. Schanz J, Tuchler H, Solé F, i cols. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol*. 2012;30(8):820-829.
29. Ebert BL. Molecular dissection of the 5q deletion in myelodysplastic syndrome. *Semin Oncol*. 2011;38(5):621-626.
30. Boultonwood J, Fidler C, Strickson AJ, i cols. Narrowing and genomic annotation of the commonly deleted region of the 5q- syndrome. *Blood*. 2002;99(12):4638-4641.
31. Ebert BL, Pretz J, Bosco J, i cols. Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature*. 2008;451(7176):335-339.
32. Dutt S, Narla A, Lin K, i cols. Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. *Blood*. 2011;117(9):2567-2576.
33. Starczynowski DT, Kuchenbauer F, Argiropoulos B, i cols. Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q- syndrome phenotype. *Nat Med*. 2010;16(1):49-58.
34. Grisendi S, Bernardi R, Rossi M, i cols. Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. *Nature*. 2005;437(7055):147-153.
35. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, i cols. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997;89(6):2079-2088.
36. ERRATUM. *Blood*. 1998;91(3):1100.

37. Schanz J, Steidl C, Fonatsch C, i cols. Coalesced multicentric analysis of 2,351 patients with myelodysplastic syndromes indicates an underestimation of poor-risk cytogenetics of myelodysplastic syndromes in the international prognostic scoring system. *J Clin Oncol*. 2011;29(15):1963-1970.
38. Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, i cols. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2007;25(23):3503-3510.
39. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, i cols. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012;120(12):2454-2465.
40. Taher A, Cappellini MD, Vichinsky E, i cols. Efficacy and safety of deferasirox doses of >30 mg/kg per d in patients with transfusion-dependent anaemia and iron overload. *Br J Haematol*. 2009;147(5):752-759.
41. Kantarjian H, Fenaux P, Sekeres MA, i cols. Safety and efficacy of romiplostim in patients with lower-risk myelodysplastic syndrome and thrombocytopenia. *J Clin Oncol*. 2010;28(3):437-444.
42. List A, Kurtin S, Roe DJ, i cols. Efficacy of lenalidomide in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*. 2005;352(15):33-44; 6):549-557.
43. List A, Dewald G, Bennett J, i cols. Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *N Engl J Med*. 2006;355(14):1456-1465.
44. Raza A, Reeves JA, Feldman EJ, i cols. Phase 2 study of lenalidomide in transfusion-dependent, low-risk, and intermediate-1 risk myelodysplastic syndromes with karyotypes other than deletion 5q. *Blood*. 2008;111(1):86-93.
45. Fenaux P, Giagounidis A, Selleslag D, i cols. A randomized phase 3 study of lenalidomide versus placebo in RBC transfusion-dependent patients with Low-/Intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes with del5q. *Blood*. 2011;118(14):3765-3776.
46. Kuendgen A, Lauseker M, List AF, i cols. Lenalidomide does not increase AML progression risk in RBC transfusion-dependent patients with Low- or Intermediate-1-risk MDS with del(5q): a comparative analysis. *Leukemia*. 2012 (en premsa).
47. 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):2505-2511.

-
48. Estey EH, Thall PF, Cortes JE, i cols. Comparison of idarubicin + ara-C-, fludarabine + ara-C-, and topotecan + ara-C-based regimens in treatment of newly diagnosed acute myeloid leukemia, refractory anemia with excess blasts in transformation, or refractory anemia with excess blasts. *Blood*. 2001;98(13):3575-3583.
49. Beran M, Shen Y, Kantarjian H, i cols. High-dose chemotherapy in high-risk myelodysplastic syndrome: covariate-adjusted comparison of five regimens. *Cancer*. 2001;92(8):1999-2015.
50. Kantarjian H, Beran M, Cortes J, i cols. Long-term follow-up results of the combination of topotecan and cytarabine and other intensive chemotherapy regimens in myelodysplastic syndrome. *Cancer*. 2006;106(5):1099-1109.
51. Alessandrino EP, Della Porta MG, Bacigalupo A, i cols. Prognostic impact of pre-transplantation transfusion history and secondary iron overload in patients with myelodysplastic syndrome undergoing allogeneic stem cell transplantation: a GITMO study. *Haematologica*. 2010;95(3):476-484.
52. Anderson JE, Appelbaum FR, Schoch G, i cols. Allogeneic marrow transplantation for refractory anemia: a comparison of two preparative regimens and analysis of prognostic factors. *Blood*. 1996;87(1):51-58.
53. Appelbaum FR, Barrall J, Storb R, i cols. Bone marrow transplantation for patients with myelodysplasia. Pretreatment variables and outcome. *Ann Intern Med*. 1990;112(8):590-597.
54. Nevill TJ, Fung HC, Shepherd JD, i cols. Cytogenetic abnormalities in primary myelodysplastic syndrome are highly predictive of outcome after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 1998;92(6):1910-1917.
55. Sierra J, Perez WS, Rozman C, i cols. Bone marrow transplantation from HLA-identical siblings as treatment for myelodysplasia. *Blood*. 2002;100(6):1997-2004.
56. Sutton L, Chastang C, Ribaud P, i cols. Factors influencing outcome in de novo myelodysplastic syndromes treated by allogeneic bone marrow transplantation: a long-term study of 71 patients Societe Francaise de Greffe de Moelle. *Blood*. 1996;88(1):358-365.
57. Pardue ML i Gall JG. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1969;64(2):600-604.

58. Jones KW. Chromosomal and nuclear location of mouse satellite DNA in individual cells. *Nature*. 1970;225(5236):912-915.
59. Gerhard DS, Kawasaki ES, Bancroft FC, Szabo P. Localization of a unique gene by direct hybridization in situ. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78(6):3755-3759.
60. Harper ME i Saunders GF. Localization of single copy DNA sequences of G-banded human chromosomes by in situ hybridization. *Chromosoma*. 1981;83(3):431-439.
61. Speicher MR i Carter NP. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet*. 2005;6(10):782-792.
62. McNeil N i Ried T. Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements: technology and applications in molecular medicine. *Expert Rev Mol Med*. 2000;2000:1-14.
63. von Deimling F, Scharf JM, Liehr T, i cols. Human and mouse RAD17 genes: identification, localization, genomic structure and histological expression pattern in normal testis and seminoma. *Hum Genet*. 1999;105(1-2):17-27.
64. Tsuchiya D, Matsumoto A, Covert SF, i cols. Physical mapping of plasmid and cosmid clones in filamentous fungi by fiber-FISH. *Fungal Genet Biol*. 2002;37(1):22-28.
65. Mark HF, Wyandt H, Huang XL, i cols. Delineation of a supernumerary marker chromosome utilizing a multimodal approach of G-banding, fluorescent in situ hybridization, confirmatory P1 artificial chromosome fluorescent in situ hybridization, and high-resolution comparative genomic hybridization. *Clin Genet*. 2005;68(2):146-151.
66. Birren BW, Tachi-iri Y, Kim UJ, i cols. A human chromosome 22 fosmid resource: mapping and analysis of 96 clones. *Genomics*. 1996;34(1):97-106.
67. Liehr T, Weise A, Heller A, i cols. Multicolor chromosome banding (MCB) with YAC/BAC-based probes and region-specific microdissection DNA libraries. *Cytogenet Genome Res*. 2002;97(1-2):43-50.
68. Rigby PW, Dieckmann M, Rhodes C, i cols. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol*. 1977;113(1):237-251.
69. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, i cols. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 1992;258(5083):818-821.

-
70. Pinkel D, Se Graves R, Sudar D, i cols. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet.* 1998;20(2):207-211.
71. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, i cols. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer.* 1997;20(4):399-407.
72. Mei R, Galipeau PC, Prass C, i cols. Genome-wide detection of allelic imbalance using human SNPs and high-density DNA arrays. *Genome Res.* 2000;10(8):1126-1137.
73. Gresham D, Dunham MJ, Botstein D. Comparing whole genomes using DNA microarrays. *Nat Rev Genet.* 2008;9(4):291-302.
74. Makishima H i Maciejewski JP. Pathogenesis and consequences of uniparental disomy in cancer. *Clin Cancer Res.* 2011;17(12):3913-3923.
75. Sanger F i Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 1975;94(3):441-448.
76. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977;74(12):5463-5467.
77. Purves WK. *Life, the science of biology.* Sunderland, Mass.: Sinauer Associates; 2003.
78. Holtan SG, Santana-Davila R, Dewald GW, i cols. Myelodysplastic syndromes associated with interstitial deletion of chromosome 5q: clinicopathologic correlations and new insights from the pre-lenalidomide era. *Am J Hematol.* 2008;83(9):708-713.
79. Patnaik MM, Lasho TL, Finke CM, i cols. WHO-defined 'myelodysplastic syndrome with isolated del(5q)' in 88 consecutive patients: survival data, leukemic transformation rates and prevalence of JAK2, MPL and IDH mutations. *Leukemia.* 2010;24(7):1283-1289.
80. Germing U, Lauseker M, Hildebrandt B, i cols. Survival, prognostic factors and rates of leukemic transformation in 381 untreated patients with MDS and del(5q): a multicenter study. *Leukemia.* 2012;26(6):1286-1292.
81. Knapp RH, Dewald GW, Pierre RV. Cytogenetic studies in 174 consecutive patients with preleukemic or myelodysplastic syndromes. *Mayo Clin Proc.* 1985;60(8):507-516.
82. Nowell PC i Besa EC. Prognostic significance of single chromosome abnormalities in preleukemic states. *Cancer Genet Cytogenet.* 1989;42(1):1-7.

83. Nowell PC, Besa EC, Stelmach T, i cols. Chromosome studies in preleukemic states. V. Prognostic significance of single versus multiple abnormalities. *Cancer*. 1986;58(12):2571-2575.
84. Billstrom R, Thiede T, Hansen S, i cols. Bone marrow karyotype and prognosis in primary myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol*. 1988;41(4):341-346.
85. Pierre RV, Catovsky D, Mufti GJ, i cols. Clinical-cytogenetic correlations in myelodysplasia (preleukemia). *Cancer Genet Cytogenet*. 1989;40(2):149-161.
86. Morel P, Hebbar M, Lai JL, i cols. Cytogenetic analysis has strong independent prognostic value in de novo myelodysplastic syndromes and can be incorporated in a new scoring system: a report on 408 cases. *Leukemia*. 1993;7(9):1315-1323.
87. Toyama K, Ohyashiki K, Yoshida Y, i cols. Clinical implications of chromosomal abnormalities in 401 patients with myelodysplastic syndromes: a multicentric study in Japan. *Leukemia*. 1993;7(4):499-508.
88. White AD, Hoy TG, Jacobs A. Extended cytogenetic follow-up and clinical progress in patients with myelodysplastic syndromes (MDS). *Leuk Lymphoma*. 1994;12(5-6):401-412.
89. Bernasconi P, Klersy C, Boni M, i cols. World Health Organization classification in combination with cytogenetic markers improves the prognostic stratification of patients with de novo primary myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 2007;137(3):193-205.
90. Pozdnyakova O, Miron PM, Tang G, i cols. Cytogenetic abnormalities in a series of 1029 patients with primary myelodysplastic syndromes: a report from the US with a focus on some undefined single chromosomal abnormalities. *Cancer*. 2008;113(12):3331-3340.
91. Rigolin GM, Bigoni R, Milani R, i cols. Clinical importance of interphase cytogenetics detecting occult chromosome lesions in myelodysplastic syndromes with normal karyotype. *Leukemia*. 2001;15(12):1841-1847.
92. Shen Y, Xue Y, Li J. Detection of -5/5q- chromosome abnormality in myelodysplastic syndromes by interphase fluorescence in situ hybridization. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 2001;22(10):517-519.
93. Romeo M, Chauffaille M de L, Silva MR, i cols. Comparison of cytogenetics with FISH in 40 myelodysplastic syndrome patients. *Leuk Res*. 2002;26(11):993-996.

94. Bernasconi P, Cavigliano PM, Boni M, i cols. Is FISH a relevant prognostic tool in myelodysplastic syndromes with a normal chromosome pattern on conventional cytogenetics? A study on 57 patients. *Leukemia*. 2003;17(11):2107-2112.
95. Yilmaz Z, Sahin FI, Kizilkilic E, i cols. Conventional and molecular cytogenetic findings of myelodysplastic syndrome patients. *Clin Exp Med*. 2005;5(2):55-59.
96. Mohamedali A, Gaken J, Twine NA, i cols. Prevalence and prognostic significance of allelic imbalance by single-nucleotide polymorphism analysis in low-risk myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2007;110(9):3365-3373.
97. Heinrichs S, Kulkarni RV, Bueso-Ramos CE, i cols. Accurate detection of uniparental disomy and microdeletions by SNP array analysis in myelodysplastic syndromes with normal cytogenetics. *Leukemia*. 2009;23(9):1605-1613.
98. Tiu RV, Gondek LP, O'Keefe CL, i cols. Prognostic impact of SNP array karyotyping in myelodysplastic syndromes and related myeloid malignancies. *Blood*. 2011;117(17):4552-4560.
99. Evers C, Beier M, Poelitz A, i cols. Molecular definition of chromosome arm 5q deletion end points and detection of hidden aberrations in patients with myelodysplastic syndromes and isolated del(5q) using oligonucleotide array CGH. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007;46(12):1119-1128.
100. Wang L, Fidler C, Nadig N, i cols. Genome-wide analysis of copy number changes and loss of heterozygosity in myelodysplastic syndrome with del(5q) using high-density single nucleotide polymorphism arrays. *Haematologica*. 2008;93(7):994-1000.
101. Jerez A, Gondek LP, Jankowska AM, i cols. Topography, clinical, and genomic correlates of 5q myeloid malignancies revisited. *J Clin Oncol*. 2012;30(12):1343-1349.
102. Krönke J i Ebert B. Biology of myelodysplastic syndrome. *Hematology Education*. 2012:237-244.
103. Malcovati L. Integration of somatic mutations in diagnosis and risk assessment in myelodysplastic syndromes. *Hematology Education*. 2012:245-252.
104. Papaemmanuil E, Cazzola M, Boulton J, i cols. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N Engl J Med*. 2011;365(15):1384-1395.
105. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, i cols. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 2011;478(7367):64-69.

106. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, i cols. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*. 2011;364(26):2496-2506.
107. Bejar R, Stevenson KE, Caughey BA, i cols. Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2012;30(27):3376-3382.
108. Fidler C, Watkins F, Bowen DT, i cols. NRAS, FLT3 and TP53 mutations in patients with myelodysplastic syndrome and a del(5q). *Haematologica*. 2004;89(7):865-866.
109. Jadersten M, Saft L, Smith A, i cols. TP53 mutations in low-risk myelodysplastic syndromes with del(5q) predict disease progression. *J Clin Oncol*. 2011;29(15):1971-1979.
110. Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J. Mutations with loss of heterozygosity of p53 are common in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia after exposure to alkylating agents and significantly associated with deletion or loss of 5q, a complex karyotype, and a poor prognosis. *J Clin Oncol*. 2001;19(5):1405-1413.
111. Bejar R i Ebert BL. Alteracions moleculars de les síndromes mielodisplàstiques amb deleció 5q. Comunicació personal. 2012.
112. Kulasekararaj AG, Smith AE, Mian SA, i cols. TP53 mutations in myelodysplastic syndrome are strongly correlated with aberrations of chromosome 5, and correlate with adverse prognosis. *Br J Haematol*. 2013;160(5):660-672.
113. Patnaik MM, Lasho TL, Finke CM, i cols. Isolated del(5q) in myeloid malignancies: clinicopathologic and molecular features in 143 consecutive patients. *Am J Hematol*. 2011;86(5):393-398.
114. Pardanani A, Patnaik MM, Lasho TL, i cols. Recurrent IDH mutations in high-risk myelodysplastic syndrome or acute myeloid leukemia with isolated del(5q). *Leukemia*. 2010;24(7):1370-1372.
115. Mallo M, Arenillas L, Espinet B, i cols. Fluorescence in situ hybridization improves the detection of 5q31 deletion in myelodysplastic syndromes without cytogenetic evidence of 5q-. *Haematologica*. 2008;93(7):1001-1008.
116. Mallo M, Cervera J, Schanz J, i cols. Impact of adjunct cytogenetic abnormalities for prognostic stratification in patients with myelodysplastic syndrome and deletion 5q. *Leukemia*. 2011;25(1):110-120.

117. Hernandez JM, Granada I, Sole F, en representacion del Grupo Cooperativo Espanol de Citogenetica Hematologica. From conventional cytogenetics to microarrays. Fifty years of Philadelphia chromosome. *Med Clin (Barc)*. 2011;137(5):221-229.
118. Ketterling RP, Wyatt WA, VanWier SA, i cols. Primary myelodysplastic syndrome with normal cytogenetics: utility of 'FISH panel testing' and M-FISH. *Leuk Res*. 2002;26(3):235-240.
119. Cherry AM, Brockman SR, Paternoster SF, i cols. Comparison of interphase FISH and metaphase cytogenetics to study myelodysplastic syndrome: an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) study. *Leuk Res*. 2003;27(12):1085-1090.
120. Beyer V, Castagne C, Muhlematter D, i cols. Systematic screening at diagnosis of -5/del(5)(q31), -7, or chromosome 8 aneuploidy by interphase fluorescence in situ hybridization in 110 acute myelocytic leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome patients: concordances and discrepancies with conventional cytogenetics. *Cancer Genet Cytogenet*. 2004;152(1):29-41.
121. Kakazu N, Taniwaki M, Horiike S, i cols. Combined spectral karyotyping and DAPI banding analysis of chromosome abnormalities in myelodysplastic syndrome. *Genes Chromosomes Cancer*. 1999;26(4):336-345.
122. Lindvall C, Nordenskjold M, Porwit A, i cols. Molecular cytogenetic characterization of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes with multiple chromosome rearrangements. *Haematologica*. 2001;86(11):1158-1164.
123. Bram S, Swolin B, Rodjer S, i cols. Is monosomy 5 an uncommon aberration? Fluorescence in situ hybridization reveals translocations and deletions in myelodysplastic syndromes or acute myelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2003;142(2):107-114.
124. Van Limbergen H, Poppe B, Michaux L, i cols. Identification of cytogenetic subclasses and recurring chromosomal aberrations in AML and MDS with complex karyotypes using M-FISH. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002;33(1):60-72.
125. Trost D, Hildebrandt B, Beier M, i cols. Molecular cytogenetic profiling of complex karyotypes in primary myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2006;165(1):51-63.
126. Herry A, Douet-Guilbert N, Morel F, i cols. Redefining monosomy 5 by molecular cytogenetics in 23 patients with MDS/AML. *Eur J Haematol*. 2007;78(6):457-467.

127. Galvan AB, Mallo M, Arenillas L, i cols. Does monosomy 5 really exist in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia? *Leuk Res.* 2010;34(9):1242-1245.
128. Gohring G, Giagounidis A, Busche G, i cols. Cytogenetic follow-up by karyotyping and fluorescence in situ hybridization: implications for monitoring patients with myelodysplastic syndrome and deletion 5q treated with lenalidomide. *Haematologica.* 2011;96(2):319-322.
129. Bräulke F, Schanz J, Jung K, i cols. FISH analysis of circulating CD34+ cells as a new tool for genetic monitoring in MDS: verification of the method and application to 27 MDS patients. *Leuk Res.* 2010;34(10):1296-1301.
130. Gohring G, Lange K, Hofmann W, i cols. Telomere shortening, clonal evolution and disease progression in myelodysplastic syndrome patients with 5q deletion treated with lenalidomide. *Leukemia.* 2012;26(2):356-358.
131. Maciejewski JP, Tiu RV, O'Keefe C. Application of array-based whole genome scanning technologies as a cytogenetic tool in haematological malignancies. *Br J Haematol.* 2009;146(5):479-488.
132. Vercauteren SM, Starczynowski DT, Sung S, i cols. T cells of patients with myelodysplastic syndrome are frequently derived from the malignant clone. *Br J Haematol.* 2012;156(3):409-412.
133. Douet-Guilbert N, De Braekeleer E, Basinko A, i cols. Molecular characterization of deletions of the long arm of chromosome 5 (del(5q)) in 94 MDS/AML patients. *Leukemia.* 2012;26(7):1695-1697.
134. Sebaa A, Ades L, Baran-Marzack F, i cols. Incidence of 17p deletions and TP53 mutation in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with 5q deletion. *Genes Chromosomes Cancer.* 2012;51(12):1086-1092.
135. Komrokji RS i List AF. Role of lenalidomide in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Semin Oncol.* 2011;38(5):648-657.
136. Wei S, Chen X, McGraw K, i cols. Lenalidomide promotes p53 degradation by inhibiting MDM2 auto-ubiquitination in myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *Oncogene.* 2013;32(9):1110-1120.
137. Giagounidis A, Hellstrom-Lindberg E, Fenaux P., Backstrom J, Fu T, List A. Interaction of karyotype complexity and response on overall survival and AML

progression in lenalidomide-treated Low/Int-1 risk del(5q) MDS patients. *Leuk Res* 2011;35:S21. Abstract no. 21.

138. Gohring G, Giagounidis A, Busche G, i cols. Patients with del(5q) MDS who fail to achieve sustained erythroid or cytogenetic remission after treatment with lenalidomide have an increased risk for clonal evolution and AML progression. *Ann Hematol.* 2010;89(4):365-374.

139. Le Bras F, Sebert M, Kelaidi C, i cols. Treatment by Lenalidomide in lower risk myelodysplastic syndrome with 5q deletion--the GFM experience. *Leuk Res.* 2011;35(11):1444-1448.

140. Sekeres MA, Maciejewski JP, Giagounidis AA, i cols. Relationship of treatment-related cytopenias and response to lenalidomide in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol.* 2008;26(36):5943-5949.

141. Valent P, Horny HP, Bennett JM, i cols. 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):727-736.

142. Feys T, Poppe B, De Preter K, i cols. A detailed inventory of DNA copy number alterations in four commonly used Hodgkin's lymphoma cell lines. *Haematologica.* 2007;92(7):913-920.

143. Wagner K, Damm F, Gohring G, i cols. Impact of IDH1 R132 mutations and an IDH1 single nucleotide polymorphism in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: SNP rs11554137 is an adverse prognostic factor. *J Clin Oncol.* 2010;28(14):2356-2364.

Annexes

Sigues tan bo que no et puguin ignorar

Steve Martin

1. Annex 1: Treball III: Resposta a la lenalidomida en les síndromes mielodisplàstiques amb deleció 5q: influència de la citogenètica i les mutacions

Al voltant del 25% de SMD amb deleció 5q no responen al tractament amb lenalidomida. Actualment, no hi ha biomarcadors aplicables a la rutina clínica. L'objectiu d'aquest estudi era caracteritzar molecularment els pacients amb SMD i deleció 5q que han rebut tractament amb lenalidomida, a través de *microarrays* genòmics de SNP i seqüenciació, per tal d'identificar possibles marcadors responsables de la resposta al tractament amb lenalidomida.

Es van estudiar **52** pacients amb diagnòstic de SMD i deleció 5q (per CC o FISH) abans de rebre tractament amb lenalidomida. Trenta-vuit pacients presentaven la deleció 5q aïllada, 6 acompanyats d'una alteració citogenètica, 4 dins d'un cariotip complex; i en 4 pacients la deleció s'havia detectat mitjançant la tècnica de FISH.

La mostra d'estudi va ser ADN extret de MO total en 49 casos i SP total en 3 casos. En 30 pacients es va usar ADN de teixit control (limfòcits CD3 aïllats de SP) del mateix pacient per l'anàlisi de *microarrays*.

Microarrays genòmics de SNP

Es van aplicar els *microarrays* de SNP (250K i 6.0) d'Affymetrix®. La pèrdua de 5q es va observar en tots els casos amb punts de trencament diferents als observats per CC. Totes les delecions excepte una eren intersticials. En la sèrie global, la RCD era de 14,6 Mb (5q22.3-q31.1), la mediana del segment delecionat era de 69.7 Mb.

En total es van observar 48 alteracions (32 pèrdues, 11 guanys i 5 pèrdues d'heterozigositat). Es van observar tres regions recurrents alterades: **deleció 12p** (12p13.2-p13.1) amb una RCD d'1,2 Mb; **15q26.1**, dos casos delecionats i un amb pèrdua d'heterozigositat, inclou el gen *CHD2*[†]; i **3q25.3q26.1**, un cas amb deleció i un altre amb pèrdua d'heterozigositat, inclou el gen *THPO*[‡]. Les pèrdues es van confirmar mitjançant la tècnica de FISH amb sondes comercials o de BACs.

[†]La deleció de *CHD2* s'ha descrit en línies cel·lulars de limfoma de Hodgkin i s'ha postulat com a possible gen supressor de tumors¹⁴².

[‡]*THPO (trombopoetina)*: la proteïna codificada per aquest gen és un factor de creixement necessari per la proliferació i maduració megacariocítica, així com la trombopoesi.

Centrant-nos en els 38 casos amb deleció 5q com a única alteració, en el 26,3% dels casos, els *microarrays* van detectar alteracions addicionals, cap d'elles recurrent.

Estudi mutacional mitjançant seqüenciació

L'anàlisi es va portar a terme en un mínim de 43 casos a partir d'ADN genòmic prèviament amplificat. Es van analitzar els següents gens: *CBL* (un cas mutat), *TET2* (8 casos mutats), *ASXL1* (cap cas mutat), *IDH1* (set casos presentaven el polimorfisme rs11554137^y), *IDH2* (un cas mutat) i *TP53* (5 casos mutats). Dos casos presentaven dues mutacions, *TP53-IDH2* i *TP53-TET2*.

Resposta al tractament amb lenalidomida

La resposta al tractament es va avaluar als 4 mesos, sempre i quan haguessin rebut com a mínim 2 cicles. Es van determinar dos grups respecte la **resposta hematològica** (n=48, 92,3%): *responedors* (resposta completa o parcial, n=37) i *no responedors* (malaltia estable, no resposta o progressió, n=11). La **independència transfusional** es va determinar en 37 pacients, 29 d'ells la van assolir. La mediana de temps en assolir-la va ser d'1,8 mesos amb 30,4 mesos de mediana de duració. La **resposta citogenètica** es va poder determinar en 39 pacients, 12 van assolir remissió citogenètica completa. Set casos (de 50) van evolucionar a LMA (4 eren responedors i 3 no responedors), cap adquiria remissió citogenètica completa.

Les alteracions addicionals a la deleció 5q detectades per CC es relacionen amb la no adquisició d'independència transfusional i no resposta hematològica, no obstant no es relaciona amb evolució a LMA. Les alteracions addicionals detectades pels *microarrays* de SNP no es van relacionar amb resposta a tractament.

Les mutacions en el gen *TP53* mostren certa tendència a predir la no resposta hematològica ($P=0,061$). No obstant, no està relacionat amb l'adquisició d'independència transfusional ni amb la complexitat citogenètica. Cap cas mutat va assolir resposta citogenètica completa.

Les plaquetes van mostrar ser factor diferenciador de responedors i no responedors i es va establir el punt de tall de $280 \times 10^9/L$. Tot i el baix nombre de casos semblava estar relacionat amb l'evolució a LMA.

El diagnòstic morfològic de "Síndrome 5q-" és més freqüent en el grup de responedors, mentre que el diagnòstic de CRDM en el de no responedors (6 d'11 casos). Els pacients

^yEl polimorfisme **rs11554137** s'ha associat a mal pronòstic en la LMA¹⁴³.

amb "Síndrome 5q-" (n=30) presentaven alteracions addicionals en el 31% dels casos. La RCD era 5q22.3-q33.1 (31,7 Mb) vs. 5q22.1-q31.1 (24,4 Mb) en el grup no-"Síndrome 5q-". El diagnòstic morfològic no es va relacionar amb la resposta al tractament, assoliment d'independència transfusional ni diferències en la taxa de mutacions.

L'anàlisi multivariant va mostrar que el principal factor predictor de no resposta era el recompte de plaquetes baixes, seguit de les alteracions addicionals a la deleció 5q detectades mitjançant CC. Ambdues variables es poden obtenir a partir de tècniques diagnòstiques de rutina i s'haurien de considerar en el moment de l'elecció del tractament amb lenalidomida.

Response to lenalidomide in myelodysplastic syndromes with del(5q): influence of cytogenetics and mutations

Mar Mallo,^{1,2,3} Mónica del Rey,⁴
 Mariam Ibáñez,⁵ M^a José Calasanz,⁶
 Leonor Arenillas,¹ M^a José Larráyo,⁶
 Carmen Pedro,⁷ Andrés Jerez,⁸ Jaroslaw
 Maciejewski,⁸ Dolores Costa,⁹ Meritxell
 Nomdedeu,¹⁰ María Díez-Campelo,⁴
 Eva Lumbreras,⁴ Teresa González-
 Martínez,¹¹ Isabel Marugán,¹²
 Esperanza Such,⁵ José Cervera,⁵ Juan C.
 Cigudosa,¹³ Sara Álvarez,¹³ Lourdes
 Florensa,¹ Jesús M^a Hernández^{4*} and
 Francesc Solé^{1,2*}

¹Laboratori de Citogenètica Molecular, Laboratori de Citologia Hematològica, Servei de Patologia, Hospital del Mar, GRETNHE, IMIM (Hospital del Mar Research Institute), Barcelona, ²Grup de Recerca en SMD, Institut de Recerca Contra la Leucèmia Josep Carreras (IJC), Badalona, ³Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, ⁴Servicio de Hematología, Centro de Investigación del Cáncer, IBSAL (Instituto de Biomedicina de Salamanca) y IBMCC, Universidad de Salamanca, Salamanca, ⁵Servicio de Hematología, Hospital Universitario La Fe, Valencia, ⁶Departamento de Genética, Universidad de Navarra, Pamplona, ⁷Servei d'Hematologia Clínica, Hospital del Mar, GRETNHE, IMIM (Hospital del Mar Research Institute), Barcelona, Spain, ⁸Department of Translational Hematology and Oncology Research, Taussig Cancer Institute, Cleveland Clinic, Cleveland, OH, USA, ⁹Servei d'Hematopatologia, Hospital Clínic, ¹⁰Servei d'Hematologia Clínica, Hospital Clínic, Barcelona, ¹¹Citoxenètica-oncohematològica, Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica Hospital Clínico Universitario, Santiago de Compostela, ¹²Servicio de Hematología y Oncología Médica, Hospital Clínico Universitario de Valencia, Valencia and ¹³Grupo de Citogenética Molecular, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid, Spain

Summary

Lenalidomide is an effective drug in low-risk myelodysplastic syndromes (MDS) with isolated del(5q), although not all patients respond. Studies have suggested a role for *TP53* mutations and karyotype complexity in disease progression and outcome. In order to assess the impact of complex karyotypes on treatment response and disease progression in 52 lenalidomide-treated patients with del(5q) MDS, conventional G-banding cytogenetics (CC), single nucleotide polymorphism array (SNP-A), and genomic sequencing methods were used. SNP-A analysis (with control sample, lymphocytes CD3+, in 30 cases) revealed 5q losses in all cases. Other recurrent abnormalities were infrequent and were not associated with lenalidomide responsiveness. Low karyotype complexity (by CC) and a high baseline platelet count ($>280 \times 10^9/l$) were associated with the achievement of haematological response ($P = 0.020$, $P = 0.013$ respectively). Unmutated *TP53* status showed a tendency for haematological response ($P = 0.061$). Complete cytogenetic response was not observed in any of the mutated *TP53* cases. By multivariate analysis, the most important predictor for lenalidomide treatment failure was a platelet count $<280 \times 10^9/l$ (Odds Ratio = 6.17, $P = 0.040$). This study reveals the importance of a low baseline platelet count, karyotypic complexity and *TP53* mutational status for response to lenalidomide treatment. It supports the molecular study of *TP53* in MDS patients treated with lenalidomide.

Keywords: myelodysplastic syndrome, deletion 5q, lenalidomide, *TP53*, single nucleotide polymorphism array.

Received 5 December 2012; accepted for publication 12 March 2013

Correspondence: Dr. Francesc Solé, Institut de Recerca Contra la Leucèmia Josep Carreras, Crta. de Can Ruti, Camí de les Escoles s/n, Edifici IMPPC, 08916 Badalona (Barcelona), Spain.

E-mail: fsole@carrerasresearch.org

JMH and FS contributed equally to this manuscript.

The myelodysplastic syndromes (MDS) are a group of heterogeneous haematological malignancies characterized by ineffective haematopoiesis in one or more bone marrow cell lineages. As a result, patients exhibit severe cytopenia(s) with inevitable progression to acute myeloid leukaemia (AML) (Corey *et al*, 2007). Half of all primary MDS patients present with karyotypic aberrations at diagnosis. Deletion 5q [del(5q)] occurs in 15–30% of karyotypically abnormal MDS (Sole *et al*, 2005; Haase *et al*, 2007; Haase, 2008) cases and, when occurring as either a sole anomaly or in addition to 1 or more cytogenetic aberrations, is generally associated with prolonged survival and/or good survival prognosis (Mallo *et al*, 2011).

Lenalidomide is a thalidomide analogue that shows immunomodulatory, anti-inflammatory, and antiangiogenic properties (Bartlett *et al*, 2005). Approximately 25% of del(5q) MDS patients fail to respond to lenalidomide (List *et al*, 2006) and the importance of del(5q) is still largely unknown.

Currently, no routine biomarkers predicting lenalidomide responsiveness have been identified. However, several studies have been conducted to evaluate possible markers of lenalidomide resistance. Gene expression profiling studies have identified a molecular response signature in non-del(5q) MDS patients responding to lenalidomide, consisting of decreased expression of genes involved in erythroid differentiation (Ebert *et al*, 2008a). Increased expression of MIR143, MIR145 (Venner *et al*, 2012) and MIR146 in del(5q) MDS were observed during lenalidomide treatment. Other apoptosis and immunological pathways were regulated during treatment (Oliva *et al*, 2012). In studies of del(5q) MDS patient sera, the proteins platelet factor 4 and m/z 8559 have been identified as predictors of lenalidomide-responsiveness (Chen *et al*, 2010). Higher transfusion burden and presence of additional chromosomal abnormalities (≥ 1) have been associated with increased relative risk of AML transformation in del(5q) MDS (Sekeres *et al*, 2011). Studies in small patient cohorts have demonstrated that telomere shortening (Göhring *et al*, 2012) and *TP53* mutations were predictive of leukaemic evolution in low-risk del(5q) MDS (Jädersten *et al*, 2009, 2011). Furthermore, *TP53* mutations were associated with reduced probability of complete cytogenetic

response in del(5q) patients receiving lenalidomide (Jädersten *et al*, 2011).

Unlike older genomic techniques that allowed for detection of chromosomal defects, such as copy number alterations (CNAs), single nucleotide polymorphism array (SNP-A) is a high-resolution technique that enables the detection of copy number neutral loss of heterozygosity (CNN-LOH). Additionally, sequencing techniques allow for mutational screening of specific genes that have been implicated in myeloid malignancies. These techniques have important applicability in the study of MDS (Mohamedali *et al*, 2007; Maciejewski *et al*, 2009; Bejar *et al*, 2011).

Besides *TP53* mutation, no other genetic predictors of response to lenalidomide have been studied in del(5q) MDS patients to date. Herein, we utilized conventional G-banding cytogenetics (CC), SNP-A and gene sequencing to molecularly characterize 52 patients with del(5q) MDS that received lenalidomide treatment. We hypothesized that the application of these techniques may enable better identification of specific cryptic aberrations that may define lenalidomide-responsive del(5q) MDS patients.

Materials and methods

Patient cohort

A total of 52 patients with primary MDS carrying the 5q deletion by CC or fluorescence *in situ* hybridization (FISH) were included. Patients were retrospectively and prospectively recruited prior to initiation of lenalidomide treatment. Patients were diagnosed between January 2002 and September 2010 at centres from the Spanish MDS Group ($n = 46$) and the Cleveland Clinic (USA; $n = 6$). MDS diagnoses were made according to the French-American-British (FAB) (Bennett *et al*, 1982) and 2001 World Health Organization (WHO) classifications (Brunner *et al*, 2001). The study design was approved by the institutional review boards before its initiation. Informed consent was obtained from all patients enrolled in the study in accordance with the Declaration of Helsinki. Patient characteristics are shown in Table I.

Table I. Clinical data for the global series, lenalidomide responders and non-responders patients.

Characteristic	Global series (<i>n</i> = 52)	Responders (<i>n</i> = 37)	Non-responders (<i>n</i> = 11)	<i>P</i> value
Age, median, Q1–Q3 (years)	75.5 (60.0–80.0)	75.0 (62.5–80.0)	60.0 (47.0–80.0)	0.424
Sex, male/female	13/39	9/28	3/8	1.000
FAB subtype				
RA	43	30	11	0.442
RARS	2	2	0	
RAEB	7	5	0	
WHO subtype (2001)				
RA and '5q- Syndrome'	35	27	5	0.144
RCMD/RCMD-RS/RAEB-1	17	10	6	
Haemoglobin, median, Q1–Q3 (g/l)	93 (79–103)	95 (81–102)	91 (80–108)	0.659
Absolute neutrophil count, median, Q1–Q3 ($\times 10^9/l$)	1.9 (1.3–2.6)	2.0 (1.4–2.6)	1.1 (0.9–2.9)	0.167
Platelet count, median, Q1–Q3 ($\times 10^9/l$)	295.5 (181.8–361.8)	314.0 (205.5–438.5)	240.0 (120.0–274.0)	0.023
Bone marrow blast count, median, Q1–Q3 (%)	2.0 (1.0–4.0)	2 (1–4)	2 (0–4)	0.693
IPSS risk group				
Low/Int-1	48	33	11	1.000
Int-2/High	1	1	0	
Duration of MDS before treatment, median, Q1–Q3 (months)	5.5 (1.8–19.1)	5.7 (1.8–19.9)	5.0 (1.5–10.7)	0.540
Number of aberrations by CC				
Normal/NM/5q-	42	33	6	0.020
5q- + ≥ 1	10	4	5	
Aberrant metaphases, median, Q1–Q3 (%)	78.6 (42.1–93.0)	74.7 (45.3–91.7)	80.0 (42.1–88.0)	0.953
Number of aberrations by SNP-A				
5q-	32	25	5	0.288
5q- + ≥ 1	20	12	6	
TET2 status				
Mutated	8	6	1	1.000
Unmutated	36	26	7	
TP53 status				
Mutated	5	2	3	0.061
Unmutated	40	30	6	
5q deletion size, median, Q1–Q3 (Mb)	69.7 (62.3–73.7)	69.8 (63.6–76.0)	70.6 (58.9–71.0)	0.854

FAB, French-American-British; RA, refractory anaemia; RARS, RA with ring sideroblasts; RAEB, RA with excess of blasts; RCMD, refractory cytopenia with multilineage dysplasia; RCMD-RS, RCMD with ring sideroblasts; IPSS, International Prognostic Scoring System, NM, no metaphases, SNP-A, single nucleotide polymorphism array; Q1, percentile 25; Q3, percentile 75. *P* values in bold indicate significant differences ($P < 0.05$).

Conventional G-banding cytogenetics and FISH 5q study

Conventional G-banding cytogenetics studies were performed from bone marrow at the individual centres following standard procedures. Karyotypes were described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (Shaffer *et al*, 2009). FISH studies of the 5q region were performed using the LSI5q31 (EGR1)/D5S23, D5S21 probe (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, USA) to detect the deletion in cases with a normal karyotype or with unsuccessful CC study.

DNA preparation

Whole bone marrow ($n = 49$) or peripheral blood ($n = 3$) samples were collected and processed at the individual centres (some of the samples were obtained from Parc de Salut MAR Biobank, MARBiobanc). In addition, DNA was also extracted from isolated peripheral blood CD3+ T cells from 30 patients

[magnetic-activated cell sorting (MACS), Miltenyi Biotec GmbH, Germany] at the individual centres.

The purity and concentration of genomic DNA was evaluated using the ND-1000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Wilmington, DE, USA). The integrity was checked by a 2% agarose gel. Only DNA that fulfilled quality controls required by Affymetrix® (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) was submitted for array procedure.

Single nucleotide polymorphism array (SNP-A)

DNA samples from all cases were hybridized with Human SNP-A from Affymetrix®: 47 with Genome-Wide Human SNP Array 6.0 and 5 with GeneChip Human Mapping 250K Nsp Array. Assays were performed according to the protocols supplied by Affymetrix®. After washing and staining in a Fluidics Station, arrays were scanned. All SNP-A data are available at the Gene Expression Omnibus (GEO) database under accession number GSE35656.

SNP-A data analysis

Data were analysed using GeneChip Genotyping Console Software Version 4.0, Chromosome Analysis Suite Version 1.0.1 (Affymetrix®) and CNAG software version 3.3.0.1 (Beta), using annotations of genome version NCBIv30 (hg18). In addition to software-reported CNAs of 100 Kb that carried a minimum of 10 aberrant probes, a visual analysis was performed.

Paired sample analysis with T cell-derived DNA ($n = 30$) was used to rule out germ-line lesions. For non-paired analysis, segments with $\geq 50\%$ of overlap with reported CNAs from an internal control series ($n = 1003$) provided by Cleveland Clinic and/or in the Database of Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/variation/>) were excluded.

For CNN-LOH, we applied the following threshold: ≥ 50 altered probe sets (SNPs) at least 2 Mb in size (Heinrichs *et al*, 2009) for paired sample analysis. Size- and location-based exclusion criteria (interstitial ≥ 25 Mb (Maciejewski *et al*, 2009) and telomeric ≥ 50 probes in ≥ 2 Mb) was applied for non-paired analysis.

Genomic sequencing for mutational analyses

The genomic DNA was amplified using the REPLI-g Midi Kit (Qiagen Inc, Valencia, CA, USA). All samples were diluted with tris-borate- EDTA (TBE) buffer to a final concentration of 25 $\mu\text{g/ml}$.

The mutational status of MDS-relevant genes *CBL*, *TET2*, *ASXL1*, *IDH* family and *TP53* genes (Bejar *et al*, 2011) were analysed. For *CBL* (exons 8 and 9; 43 cases), *TET2* (exons 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 and 11; 44 cases), *ASXL1* (exon 12; 43 cases), *IDH1* (exon 4; 44 cases), *IDH2* (exon 4; 43 cases) and *TP53* [exons 5, 6, 7 and 8; with some minor modifications (Krypyu *et al*, 2007); 45 cases], direct genomic sequencing was performed as previously described (Delhommeau *et al*, 2009; Makishima *et al*, 2009; Carbuccia *et al*, 2010; Paschka *et al*, 2010). Bidirectional sequencing was performed by standard techniques using an ABIPRISM 310 DNA Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequence traces were analysed using Applied Biosystems software and reviewed manually. Abnormal sequencing results were confirmed by at least two repeated analyses.

FISH analyses for validation of SNP-A results

Array results were verified by FISH with fixed Carnoy cells. For cases with 12p loss, a LSI ETV6/RUNX1 Dual Color Translocation Probe Set (Abbott Molecular Inc.) was used following the manufacturer's protocol. For the remaining alterations, FISH studies that used labelled bacterial artificial chromosomes (BAC) selected from the 32K library (<http://bacpac.chori.org/>) were carried out. DNA isolation, labelling and FISH technique were performed by standard procedures (Villa *et al*, 2007).

The following BAC clones were selected: RP11-117O4 (2p23.3), RP11-642H5 (2q12.2), RP11-121J02 (2q36.3), RP11-392C05 (3q26.1), RP11-565K22 (4p16.2), RP11-435P12 (4p16.1), RP11-12L14 (3q27.1), RP11-263F18 (12q13.13), RP11-682L10 (12q13.11), RP11-403N24 (12q24.31), RP11-598D17 (13q22.3), RP11-642H22 (14q11.2), RP11-354K23 (16q22.3), CTD-2542L18 (16q24.1), RP11-38L17 (22q12.1). In one case (Patient 19), whole chromosome 12 painting (Metasystems GmbH, Altlußheim, Germany) was performed. We also assessed the copy number status of *TP53* gene by FISH with LSI TP53/CEP17 FISH Probe Kit (Abbott Molecular Inc.) in all cases.

A minimum of 200 nuclei was analysed. Metaphases were assessed in case of discrepancy with the karyotype. Images were captured using the Cytovision software (Applied Imaging Corp., Santa Clara, CA, USA).

Response criteria to lenalidomide and evolution to AML

All patients received at least two cycles of lenalidomide and response was evaluated after four cycles of therapy. Clinical response was assessed according to the International Working Group response criteria for MDS (Cheson *et al*, 2006).

Haematological response was defined as the improvement of haemoglobin, granulocytes and/or platelet count. In case of total recovery, a complete haematological response was considered. Additionally, the transfusion independence (TI) and the duration were also assessed. TI duration was defined as the time from TI to the acquisition of transfusion requirements, last follow-up or death. Cytogenetic response was evaluated by CC or FISH. A complete cytogenetic response was defined as disappearance of a cytogenetic abnormality. Reduction of $\geq 50\%$ of 5q- cells was considered as partial response. The remaining cases were considered as either patients with disease progression (acquisition of additional abnormalities) or as non-responders.

All statistical analyses were made considering two groups based on the haematological response: responders (complete or partial remission) and non-responders (stable disease, failure or progression), and the TI achievement. Response information was available for 48 patients (92.3%). Thirty-seven (77.1%) patients responded to the treatment and eleven (22.9%) were refractory to lenalidomide. Twenty-nine patients (of 37 with available information) achieved TI, the median time to TI was 1.8 months while the median duration time was 30.4 months. Twelve patients (30.8%) achieved complete cytogenetic response. Transformation to AML data was available in 50 cases. Seven patients evolved (14%): four were responders and three were non-responders. None of these patients achieved complete cytogenetic response (Table SI).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using *SPSS* version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Main endpoints were haematological response as well as TI. Secondary endpoints studied were:

acquisition of complete cytogenetic response and overall survival (OS). OS was defined as time from diagnosis to the last available follow-up or death.

For comparison of categorical variables, we applied Chi-square or Fisher's exact test, if necessary. For continuous variables we used Mann-Whitney *U*-test. ROC curve was used to determine the best cut-off point for platelet count. The logistic regression model had as candidate variables those significant and others reported in previous studies [*TP53* gene mutational status and International Prognostic Scoring System (IPSS) status: low vs. int-1] (Fenaux *et al*, 2011; Jädersten *et al*, 2011), giving odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (95% CI). The Kaplan–Meier product limit method was applied to estimate OS. Statistical comparisons between different actuarial curves were based on log-rank tests.

R software package (version 2.15.2) was used to perform competing risk analysis for AML evolution, in the presence of death before transformation, considering time between initiation of treatment to AML evolution or last follow-up respectively. Data is expressed as cumulative incidence and 95% CI. All *P* values reported are two-sided and *P* value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

Results

Conventional cytogenetics

In 52 patients analysed by CC, 38 showed an isolated deletion of chromosome 5q, six patients had a deletion of 5q plus one additional chromosomal aberration, and four patients had a complex karyotype (≥ 3 alterations). Two cases were normal (18% and 30% of 5q- cells by FISH) and two cases had an unsuccessful CC study (9% and 15% of 5q- cells by FISH).

SNP-A analyses

All patients showed losses in chromosome 5q, although the deleted regions were variable. SNP-A revealed precise breakpoints that were different from those observed by CC. Conventional techniques indicated that the more proximal band involved in the deletion was 5q13, whereas SNP-A showed that most of the deletions started at 5q14. All but one of the 5q deletions were interstitials. The commonly deleted region (CDR) for del(5q) extended from q22.3 to q31.1 (120 438 462–134 989 521; 14.6 Mb) and the median deletion size was 69.7 Mb. The increased resolution of the SNP-A technique identified significantly more cryptic lesions contributing to complex karyotypes compared with CC ($P < 0.001$; Table II). SNP-A identified additional lesions in 26.3% of patients with del(5q) as the sole chromosomal abnormality, none of them recurrent.

Figure 1 shows a Circos diagram (Krzywinski *et al*, 2009) with the distribution of chromosomal lesions detected by

Table II. Number of cytogenetic aberrations detected by conventional G-banding cytogenetics and single nucleotide polymorphism array (SNP-A). Only cases in which the 5q deletion were detected by both techniques were included.

		Conventional cytogenetics			
		5q- as a sole lesion	5q- + 1 lesion	5q- + ≥ 2 lesions	
SNP-A	5q- as a sole lesion	28	2	0	$P < 0.001$
	5q- + 1 lesion	7	2	0	
	5q- + ≥ 2 lesions	3	2	4	

SNP-A. In addition to deletion of 5q, a total of 48 other chromosomal changes were observed. Chromosomal losses were more frequent ($n = 32$) than gains ($n = 11$); the presence of CNN-LOH was less frequent ($n = 5$). Considering the whole cohort, three cryptic recurrent lesions (in a minimum of two patients) were detected by the SNP-A analysis. Patients 12, 24 and 36 had a deletion on 12p13.2-p13.1, with a CDR 1.2 Mb long (11 602 288–12 779 705; Figure S1A). Patients 20 and 38 shared a deletion on 15q26.1. One additional patient had a CNN-LOH affecting this region (Patient 45; Figure S1B). We also found one recurrent altered region (3q25.3q26.1) either as a deletion (Patient 19) or as a CNN-LOH (Patient 14) encompassing the *THPO* gene. In both patients, the bone marrow study revealed an increase of megakaryocytes as well as platelet clusters.

As a complementary technique, SNP-A added to the karyotype definition in Patients 47 and 50. In some cases, discrepancies were observed between CC and SNP-A result (Patients 7, 32). In two other cases, additional alterations, such as the presence of translocations, were not detected by SNP-A (Patients 24 and 36).

Verification by FISH technique

FISH technique (with commercial or BACs probes) confirmed results detected by SNP-A (Table SII and Figure S1C). FISH study for *TP53* gene in 35 available cases revealed no deletions.

Gene mutational screening

The mutational screening identified one mutation in *CBL*, one in *IDH2*, eight in *TET2* and five in *TP53* (Fig 1). Two cases presented two mutated genes (Patient 9 -*TP53* and *IDH2*- and Patient 23 -*TP53* and *TET2*-) whereas 11 cases presented one mutated gene. Additionally, a SNP called rs11554137 was observed in the *IDH1* gene in seven cases; this SNP has been implicated in adverse prognosis in AML (Wagner *et al*, 2010). Furthermore, one of the rs11554137 SNP cases also had *TET2* mutation (Fig 1 and Table SII).

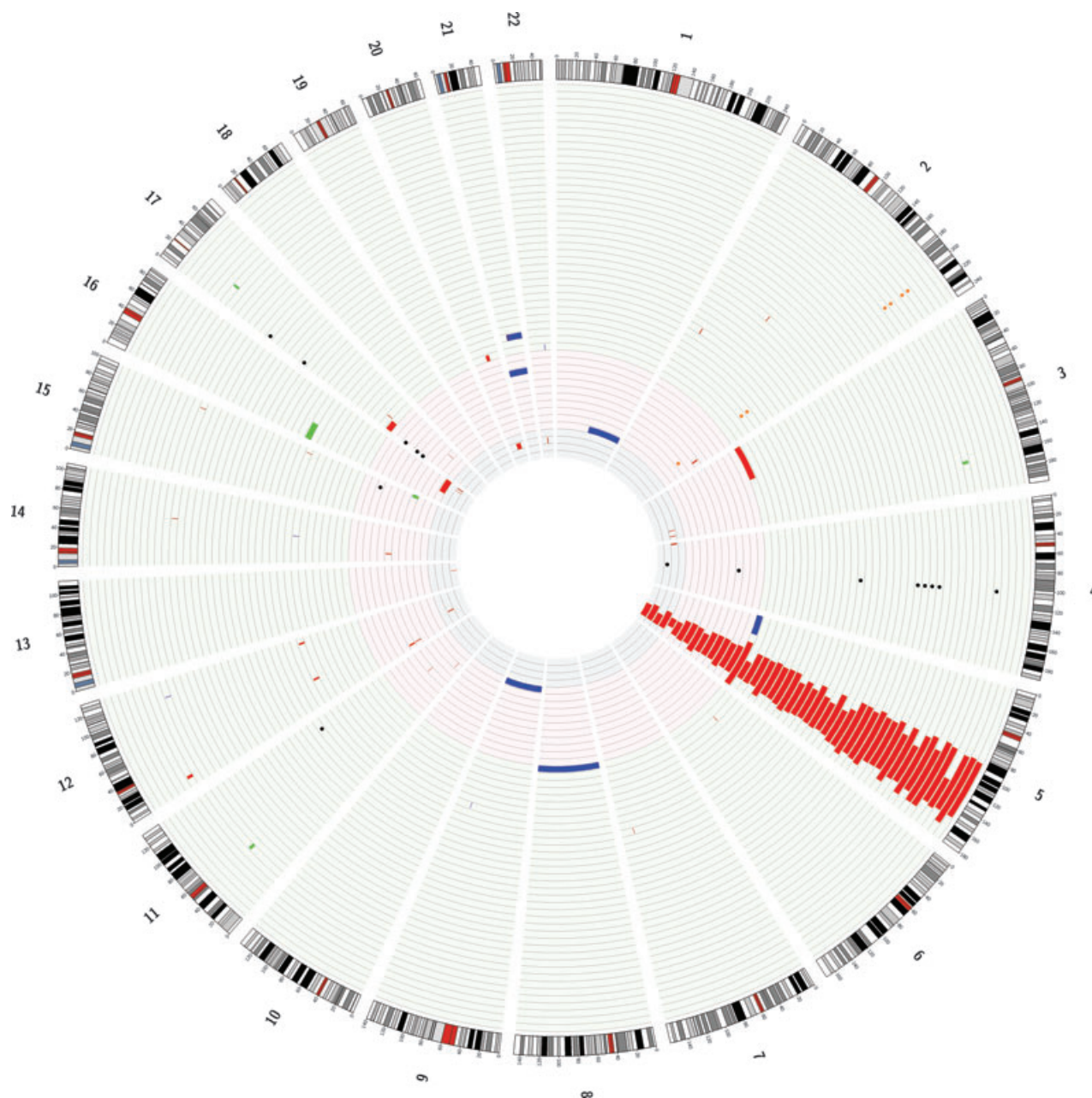


Fig 1. Circos diagram displaying genetic aberrations found by SNP-A and sequencing. Blue bars indicate gains; red bars, losses; and green bars represent copy number neutral losses of heterozygosity (CNN-LOH). Black dots depict point mutations on *CBL* (11q23.3), *IDH2* (15q26.1), *TP53* (17p13.1) and *TET2* (4q24). Orange dots indicate the rs11554137 SNP on *IDH1* gene (2q33.3). Green background indicates haematological responders and red background represents non-responders.

Relationship between the presence of mutations and outcome

TP53 mutations showed a trend to predict lack of haematological response ($P = 0.061$) but it was not related with the TI achievement. Additionally, complete cytogenetic response was not observed in any of the *TP53* mutated cases. *TP53* mutational status did not correlate with karyotype complexity by either CC or SNP-A. Three out of five mutated cases had del(5q) identified as a single anomaly by CC.

TET2 gene mutations were not associated with the achievement of either haematological, complete cytogenetic responses or TI. *TET2* mutations also did not show differences in terms of OS.

Correlations between genetic lesions, disease characteristics and lenalidomide treatment response

Tables I and III show clinical data according to haematological response and TI achievement respectively. The number of

Table III. Clinical data according to transfusion independence achievement.

Characteristic	TI – responders (<i>n</i> = 29)	TI – non-responders (<i>n</i> = 8)	<i>P</i> value
Age, median, Q1–Q3 (years)	78.0 (72.5–80.0)	61.5 (47.0–79.0)	0.088
Sex, male/female	5/24	3/5	0.332
FAB subtype			
RA	25	8	1.000
RARS	1	0	
RAEB	3	0	
WHO subtype (2001)			
RA and ‘5q- Syndrome’	26	7	0.235
RCMD/RCMD-RS/RAEB-1	0	1	
Haemoglobin, median, Q1–Q3 (g/l)	87 (81–99)	87 (76–102)	0.796
Absolute neutrophil count, median, Q1–Q3 ($\times 10^9/l$)	2.2 (1.5–2.9)	2.4 (1.1–3.3)	0.970
Platelet count, median, Q1–Q3 ($\times 10^9/l$)	322 (239.5–379.5)	177.5 (73.5–241.5)	0.018
Bone marrow blast count, median, Q1–Q3 (%)	2.0 (1.0–4.0)	2.0 (1.0–4.0)	0.969
IPSS risk group			
Low/Int-1	26	7	0.235
Int-2/High	0	1	
Duration of MDS before treatment, median, Q1–Q3 (months)	10.7 (2.5–21.3)	1.95 (1.3–5.5)	0.101
Number of aberrations by CC			
Normal/NM/5q-	26	4	0.027
5q- + ≥ 1	3	4	
Aberrant metaphases, median, Q1–Q3 (%)	69.4 (40.0–84.1)	85.7 (42.8–100.0)	0.185
Number of aberrations by SNP-A			
5q-	20	3	0.215
5q- + ≥ 1	9	5	
<i>TET2</i> status			
Mutated	6	0	0.553
Unmutated	19	5	
<i>TP53</i> status			
Mutated	2	1	0.501
Unmutated	22	5	
5q deletion size, median, Q1–Q3 (Mb)	69.4 (61.0–73.3)	70.7 (69.5–78.5)	0.090

FAB, French-American-British; RA, refractory anaemia; RARS, RA with ring sideroblasts; RAEB, RA with excess of blasts; RCMD, refractory cytopenia with multilineage dysplasia; RCMD, RCMD with ring sideroblasts; IPSS, International Prognostic Scoring System, NM, no metaphases, SNP-A, single nucleotide polymorphism array; Q1, percentile 25; Q3, percentile 75. *P* values in bold indicate significant differences ($P < 0.05$).

lesions detected by CC (0–1 vs. ≥ 2) showed a significant correlation with both the TI ($P = 0.027$) and the haematological response ($P = 0.020$) to lenalidomide treatment. However, additional aberrations detected by SNP-A did not seem to be related to treatment response or TI. Regarding the size of the 5q deletion, responding patients had a CDR of 31.7 Mb (5q22.3–q33.1, median: 69.8 Mb) while the CDR in non-responders was 31.1 Mb (5q21.2–q31.1, median: 70.6 Mb).

Patients with an initial diagnosis of MDS associated with isolated del(5q) chromosome (‘5q- Syndrome’) were more often shown to be responders. In contrast, six out of 11 non-responders had a diagnosis of refractory cytopenia with multilineage dysplasia. Despite this, the WHO morphological risk stratification groups did not associate with haematological response, TI or cryptic aberrations, but a trend to association with CC lesions was observed ($P = 0.070$). Median platelet count showed significant differences for haematological

response ($P = 0.023$) and TI achievement ($P = 0.018$). Considering this observation, a cut-off point of 280×10^9 platelets/l was established for the distinction between haematological responders and non-responders ($P = 0.013$); and 240×10^9 platelets/l for those who achieved TI and those who not ($P = 0.013$).

Multivariate analysis for haematological response and TI independence (Table IV) showed that platelet count was a significant predictor for treatment failure (OR = 6.2, $P = 0.040$) and no TI achievement (OR = 8.4, $P = 0.032$). A trend was identified showing association of complex karyotype (del(5q) + ≥ 1 vs. isolated deletion 5q) with prediction of treatment failure (OR = 4.4, $P = 0.088$) and no TI achievement (OR = 7.5, $P = 0.056$).

For the whole series, competing risk analysis showed that the cumulative incidence of transformation to AML was 20% (95% CI: 4–36%) compared to 39% (16–62%) for patients who died before transformation (Fig 2). Focusing on the

Table IV. Final model of logistic regression of risk to treatment failure and no TI achievement.

Outcome	Variables	OR (95% CI)	P value
Haematological response	Karyotypic complexity (≥ 2 aberrations vs. 0–1)	4.4 (0.8–23.7)	0.088
	Platelet count ($\leq 280 \times 10^9/l$ vs. $>280 \times 10^9/l$)	6.2 (1.1–35.0)	0.040
Transfusion independence	Karyotypic complexity (≥ 2 aberrations vs. 0–1)	7.5 (0.9–58.7)	0.056
	Platelet count ($\leq 240 \times 10^9/l$ vs. $>240 \times 10^9/l$)	8.4 (1.2–59.0)	0.032

OR, odds ratio; CI, confidence interval.

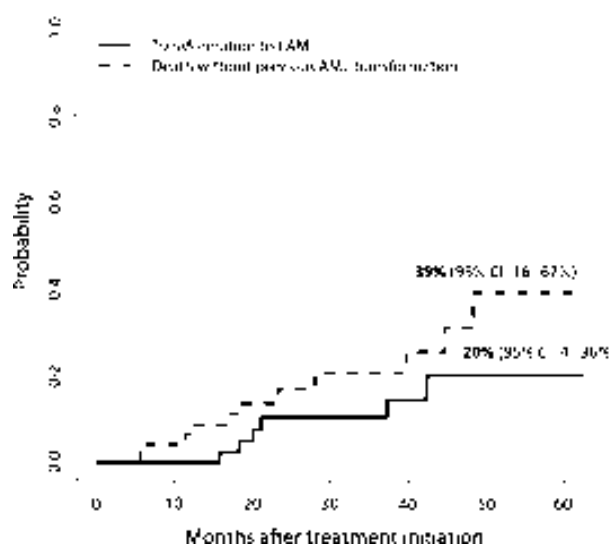


Fig 2. Cumulative incidence for AML transformation compared to death without transformation for the whole series.

20-month time point, cumulative incidence of AML transformation was 5% (0–12%) vs. 14% (4–24%) for death without transformation. At 30 months the cumulative incidence was 11% for AML evolution (1–21%) vs. 21% (8–34%) for death with no transformation.

Competing risk analysis considering haematological response showed that there were no differences for AML evolution: 21% (0–42%) vs. 20% (0–47%) for responders and non-responders respectively. In contrast, there were differences for patients who died without transformation: 24% (3–45%) vs. 60% (13–100%), $P = 0.041$. Furthermore, there were differences in patients who evolved to AML: 8% (0–24%) vs. 50% (10–90%), $P = 0.003$; for patients who achieved TI compared to those who did not. There was no difference for patients that died without AML transformation: 20% (1–39%) vs. 25 (0–57%; Table SIII).

Genetic and clinical characteristics of MDS associated with isolated *del(5q)* chromosome abnormality ('5q- Syndrome')

Additional abnormalities were detected in 31% of MDS patients with isolated *del(5q)* chromosome abnormality ('5q- Syndrome') according to the WHO classification (Brunner *et al*, 2001) whereas 47.8% of 'non 5q- Syndrome' MDS patients had cryptic aberrations. The size of the 5q CDR in '5q- Syndrome' patients was different from the 5q CDR in non '5q- Syndrome' patients 5q22.3–q33.1 (120 438 462–152 183 713: 31.7 Mb; median: 69.8 Mb) vs. 5q22.1–q31.1 (110 637 598–134 989 521: 24.4 Mb; median: 69.6 Mb) respectively. However, there was no significant difference in median CDR deletion size.

The presence of MDS with isolated *del(5q)* chromosome abnormality ('5q- Syndrome') was not related to response to treatment, TI or the achievement of complete cytogenetic response. Moreover, the mutation rate was not significantly different compared with other MDS patients.

Discussion

To the best of our knowledge, this study represents the largest genome wide analysis on specimens from patients with myelodysplastic syndrome (MDS) and chromosome 5q deletion (*del(5q)*), to discern the relationship between haematological response to lenalidomide and the relationship to clinical, cytogenetic, and molecular genetic abnormalities. Several studies regarding the application of genomic arrays to MDS have been published (Mohamedali *et al*, 2007; Heinrichs *et al*, 2009; Tiu *et al*, 2011). *Del(5q)* is generally a good prognostic marker in MDS (Mallo *et al*, 2011). However, few genomic studies have been published focusing on the subset of MDS patients with *del(5q)* (Evers *et al*, 2007; Wang *et al*, 2008; Jerez *et al*, 2012) and none of the published papers were included patients treated with lenalidomide. The application of higher resolution techniques led to the detection of aberrations not previously detected by CC in 23.1% of cases. The number of cases with CNAs was in agreement with a previous study (Wang *et al*, 2008). However, CNN-LOH rate differs in these studies because we were able to rule out germ-line aberrations with the inclusion of paired-sample analysis, which is of great importance for the proper study of CNN-LOH. The most common genetic change associated with *del(5q)* was deletion of 12p in our study. This result is also in accordance with some previous data (Wang *et al*, 2008; Göhring *et al*, 2012). We previously reported additional abnormalities in MDS patients with *del(5q)*. The 12p deletion is not a rare abnormality, being present in 5.5% of our multicentre study series (Mallo *et al*, 2011).

One of the novel findings of this study was the presence of a recurrent deletion (15q26.1) affecting the *CHD2* gene that was not present in the germ-line and has not been previously reported in MDS to the best of our knowledge. It has

been described in Hodgkin lymphoma cell lines and postulated to be a tumour suppressor gene (Feys *et al*, 2007). Two cases presented a deletion or a CNN-LOH in 3q26.1, where the *THPO* gene is located. These two cases showed increased platelets in the bone marrow aspirate, which could be related to a molecular lesion affecting the *THPO* gene.

Paired sample analysis (bone marrow and normal DNA) is the best genetic analysis approach for the SNP-A. Only a few studies have applied this strategy in large MDS cohorts (Heinrichs *et al*, 2009). In our study, we conducted paired analysis in 30 patients, an important approach especially for the study of CNN-LOH. Thus, it is important to rule out germ-line lesions, as well as to avoid false positive or negative results. In the absence of normal DNA comparisons, there are recommended analysis algorithms available (Maciejewski *et al*, 2009). SNP-A revealed the presence of additional alterations in 31% of MDS patients with isolated del(5q) chromosome abnormality ('5q- Syndrome') (Brunnering *et al*, 2001), which is in contrast to 47.8% in the remaining MDS cases. SNP-A results supported less karyotypic complexity in patients with '5q- Syndrome' (Brunnering *et al*, 2001). The CDR defined in the '5q- Syndrome' subset encompassed, with wider limits, the CDR previously defined by Boulwood *et al* (2002). This CDR includes two of the three genes described to be mediators in this syndrome: *RPS14* (5q31) (Ebert *et al*, 2008a) and *MIR145* (5q32) (Starczynowski *et al*, 2010). Although the CDR had different length, its median value in both subsets of patients was similar. Interestingly, the CDR in the '5q- Syndrome' CDR is larger than that of the non '5q- Syndrome', as well as in patients with isolated del(5q) (by CC), which have a larger CDR (data not shown). These findings agree with the study reported by Douet-Guilbert *et al* (2012), which hypothesized that investigation of the genes retained outside of the 5q CDR may elucidate the oncogenic mechanisms of this MDS subset. Considering the whole cohort, our CDR is wider (5q22.3–q31.1) than the one reported by Douet-Guilbert *et al* (2012) (5q31.1–q31.3).

Although inclusion of defects by SNP-A did not allow for better separation of responders and non-responders, application of high resolution techniques enabled a deeper analysis of del(5q) MDS and identified new study pathways, such as *CHD2* or *THPO* genes. Treatment response failure predictive value of aberrations relies on del(5q) + ≥ 1 aberrations previously detected by CC and a low platelet count, the latter confirmed in the multivariate analysis. Platelet count has been described as a prognostic factor in general MDS (Greenberg *et al*, 1997, 2012) as well as in MDS with 5q deletion (Mallo *et al*, 2011; Jonasova *et al*, 2012). Several clinical trials, either in MDS del(5q) or MDS non-del(5q), have reported the influence of platelet count in response to lenalidomide treatment (Sekeris *et al*, 2008; Fenaux *et al*, 2011; Le Bras *et al*, 2011).

In the whole series, the cumulative incidence of AML transformation was 20% vs. 39%, for patients who died without transformation. Determination of AML transformation is

difficult in small series but we assessed it because it is a matter of debate for approval of lenalidomide in Europe. Cumulative incidence of AML transformation was similar for haematological responders and non-responders [21% (0–42%) vs. 20% (0–47%)]. Interestingly, patients who did not achieve TI presented a higher cumulative incidence of evolution to AML. Lenalidomide does not increase the rate of evolution to AML as has been shown with larger series (Kuendgen *et al*, 2012).

Studies have shown that mutations in MDS are quite heterogeneous (Bejar *et al*, 2011; Damm *et al*, 2012). Focusing on del(5q) patients, some studies published analyses of *IDH1*, *IDH2*, *JAK2* and *TP53* genes (Fidler *et al*, 2004; Pardani *et al*, 2010; Patnaik *et al*, 2010, 2011; Jädersten *et al*, 2011). Patients with low-risk MDS with isolated del(5q) did not present with *IDH* mutations (Patnaik *et al*, 2011); however, these mutations did appear in advanced MDS, suggesting a relationship to AML evolution (Pardani *et al*, 2010). In our series, only one case (Patient 9) presented with an *IDH2* mutation. This patient was 38-years old, had an IPSS Intermediate-1 score and additional chromosomal aberrations beyond the del(5q), and failed lenalidomide treatment.

Some studies have focused on genes located in the long arm of chromosome 5q and its gene dosage effect. The main gene of focus has been *RPS14*, whose loss causes a defect in ribosomal protein function (Ebert *et al*, 2008b). Disruption of ribosome integrity leads to *MDM2* gene degradation resulting in *TP53* transactivation. The precise mechanism of action of lenalidomide remains unclear, although it has been shown to stabilize *MDM2* and accelerate *TP53* degradation (Wei *et al*, 2012). *TP53* gene mutations can be detected in approximately 10% of MDS patients (Bejar *et al*, 2011; Kulasekararaj *et al*, 2011) and are usually associated with high-risk MDS, complex cytogenetics and poor prognosis (Kulasekararaj *et al*, 2011; Sebaa *et al*, 2012). They are also significantly associated with deletion of 5q in therapy-related MDS and AML (Christiansen *et al*, 2001). The incidence of *TP53* mutations in del(5q) primary MDS is slightly heterogeneous, between 7% and 19% (Fidler *et al*, 2004; Jädersten *et al*, 2011; Kulasekararaj *et al*, 2011) and has been described as a bad prognostic marker in this population (Jädersten *et al*, 2009, 2011; Kulasekararaj *et al*, 2011). We detected *TP53* point mutations in 5 out of 45 cases (two of whom were responders and three non-responders). This lower detection rate (compared to Jädersten *et al*, 2011) could be explained by the lower sensitivity of the technology used by our group (1–2% vs. 20%). Our results agree with Jädersten *et al* (2011), who reported the influence of *TP53* mutations in lenalidomide treatment failure, as well as its association with the absence of complete cytogenetic response (Bejar *et al*, 2011). However, the *TP53* gene status was not related to thrombocytopenia.

Larger cohorts with non-responders are needed to better elucidate the role of *TP53* gene mutations. Nevertheless, we did not observe an impact on outcome in terms of OS, as

previously described (Jädersten *et al*, 2011; Kulasekararaj *et al*, 2011); it does not seem to be restricted to either poor-risk WHO subtypes or complex cytogenetics. *TP53* mutations have been reported as a strong predictor of disease progression (Jädersten *et al*, 2011; Kulasekararaj *et al*, 2011). However, in our cohort, six out of 38 (15.8%) patients that were wild type for *TP53* progressed, which suggests that there are still additional unidentified genetic abnormalities involved in AML transformation.

We conclude that SNP-A is a highly sensitive technique that gives a detailed genomic approach to MDS with del(5q). This analysis detected the involvement of three recurrent regions: 12p, 15q and 3q in this population. It is an exploratory analysis and we are aware that our series is limited by its size and could reduce the statistical power of our results. Lenalidomide-responsive and non-responsive patients did not show significant genomic differences, beyond the trend to an association of *TP53* with absence of haematological or complete cytogenetics response. The presence of a complex karyotype consisting of del(5q) plus other chromosomal aberrations and a low platelet baseline count were identified as predictors for lenalidomide treatment failure in MDS with del(5q). These data, which can be obtained from routine diagnostic techniques, should be carefully considered in treatment choice options.

Acknowledgements

The authors would like to thank David Valcárcel, Raquel de Paz, Fernando Ramos, Montserrat Arnan, Lurdes Zamora, Javier Grau, Ismael Buño, Elisa Luño, David Gallardo, Elisabet Talavera, Javier Marco, Pilar Rabassa, Beatriz Arrizabalaga, Teresa Hernández-Santamaría, Gemma Azaceta, Francisco Llinares, Ernesto Pérez and Judith Sánchez-Castro for providing clinical data; Lara Nonell, Sergi Mojal and Olga Garcia for their statistical assessment; Eulàlia Puigdecamet, for her excellent technical assistance; and Bernat Gel, for performing Circos diagram.

Funding

This study was partially supported by research funding from Celgene Spain to JC, JMH and FS as well as by grants from Instituto de Salud Carlos III FEDER, Ministerio de Sanidad y Consumo (Spain): FI 07/00107, PI07/1009, PI08/0440, PI09/01543 and PI 11/02010; Ministerio de Ciencia e Innovación BES2008-008053; Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC, FEDER): RD06/0020/0031, RD07/0020/

2004, RD09/0076/00036 and RD12/0036/0044; Xarxa de Tumors sponsored by Pla Director d'Oncologia de Catalunya (XBTC); SGR 541 (Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca, Departament d'Innovació, Universitat i Empresa); Obra Social Banca Cívica (Caja Burgos), Proyectos de investigación del SACYL 355/A/09, 'PROMETEO' 2011/025 from Generalitat Valenciana; Beca de Investigación de la Fundación Española de Hematología y Hemoterapia and COST BM0801: European Genetic and Epigenetic Study on AML and MDS.

Authorship contributions

MM performed FISH and SNP-A studies, provided samples, collected data, analysed clinical data, performed statistical analysis, wrote the manuscript and gave final approval. MdR and EL provided samples, collected data, analysed clinical data and gave final approval. MI performed molecular studies, wrote the manuscript and gave final approval. MJC, MJL, DC, TGM, IM, ES and SA provided samples, collected data and gave final approval. LA and LF performed morphologic review, collected data and gave final approval. CP, AJ, JM, MN and MDC collected data and gave final approval. JC and JCC designed research and gave final approval. JMH designed research, collected data, analysed clinical data and gave final approval. FS designed research, performed cytogenetic review, collected data, analysed clinical data and gave final approval.

Conflict of interest disclosure

MJC, JC, JCC, JMH and FS have received research funding and have served as a consultant and on the scientific advisory board of Celgene. The remaining authors declare no competing financial interests.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Fig S1. Recurrent lesions detected by SNP-A and validated by FISH.

Table S1. Diagnosis, conventional cytogenetics, SNP Array and mutational analysis from the whole series.

Table S2. Treatment response and follow-up information from the whole series.

Table S3. Cumulative incidence for AML transformation compared to death without AML evolution.

References

- Bartlett, J.B., Tozer, A., Stirling, D. & Zeldis, J.B. (2005) Recent clinical studies of the immunomodulatory drug (IMiD) lenalidomide. *British Journal of Cancer*, **93**, 613–619.
- Bejar, R., Stevenson, K., Abdel-Wahab, O., Galili, N., Nilsson, B., Garcia-Manero, G., Kantarjian, H., Raza, A., Levine, R.L., Neuberg, D. & Ebert, B.L. (2011) Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *The New England Journal of Medicine*, **364**, 2496–2506.
- Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flannrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R. & Sultan,

- C. (1982) Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *British Journal of Haematology*, **51**, 189–199.
- Boultonwood, J., Fidler, C., Strickson, A.J., Watkins, F., Gama, S., Kearney, L., Tosi, S., Kasprzyk, A., Cheng, J.F., Jaju, R.J. & Wainscoat, J.S. (2002) Narrowing and genomic annotation of the commonly deleted region of the 5q- syndrome. *Blood*, **99**, 4638–4641.
- Brunning, R.D., Bennett, J., Flandrin, G., Matutes, E., Head, D., Vardiman, J.W. & Harris, N.L. (2001) Myelodysplastic syndromes. In: *Pathology and Genetics. Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* (ed. by E.S. Jaffe, N.L. Harris, H. Stein & J.W. Vardiman), pp. 61–73. IARC, Lyon.
- Carbuccia, N., Trouplin, V., Gelsi-Boyer, V., Murati, A., Rocquain, J., Adelaide, J., Olschwang, S., Xerri, L., Vey, N., Chaffanet, M., Birnbaum, D. & Mozziconacci, M.J. (2010) Mutual exclusion of ASXL1 and NPM1 mutations in a series of acute myeloid leukemias. *Leukemia*, **24**, 469–473.
- Chen, C., Bowen, D.T., Giagounidis, A.A., Schlegelberger, B., Haase, S. & Wright, E.G. (2010) Identification of disease- and therapy-associated proteome changes in the sera of patients with myelodysplastic syndromes and del(5q). *Leukemia*, **24**, 1875–1884.
- Cheson, B.D., Greenberg, P.L., Bennett, J.M., Lowenberg, B., Wijermans, P.W., Nimer, S.D., Pinto, A., Beran, M., de Witte, T.M., Stone, R.M., Mittelman, M., Sanz, G.F., Gore, S.D., Schiffer, C.A. & Kantarjian, H. (2006) Clinical application and proposal for modification of the international working group (IWG) response criteria in myelodysplasia. *Blood*, **108**, 419–425.
- Christiansen, D.H., Andersen, M.K. & Pedersen-Bjerggaard, J. (2001) Mutations with loss of heterozygosity of p53 are common in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia after exposure to alkylating agents and significantly associated with deletion or loss of 5q, a complex karyotype, and a poor prognosis. *Journal of Clinical Oncology*, **19**, 1405–1413.
- Corey, S.J., Minden, M.D., Barber, D.L., Kantarjian, H., Wang, J.C. & Schimmer, A.D. (2007) Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. *Nature Reviews Cancer*, **7**, 118–129.
- Damm, F., Kosmider, O., Gelsi-Boyer, V., Renneville, A., Carbuccia, N., Hidalgo-Curtis, C., Della Valle, V., Couronne, L., Scourzic, L., Chesnais, V., Guerci-Bresler, A., Slama, B., Beyne-Rauzy, O., Schmidt-Tanguy, A., Stamatoullas-Bastard, A., Dreyfus, F., Prebet, T., de Botton, S., Vey, N., Morgan, M.A., Cross, N.C., Preudhomme, C., Birnbaum, D., Bernard, O.A., Fontenay, M. & on behalf of the Groupe Francophone des Myelodysplasies. (2012) Mutations affecting mRNA splicing define distinct clinical phenotypes and correlate with patient outcome in myelodysplastic syndromes. *Blood*, **119**, 3211–3218.
- Delhommeau, F., Dupont, S., Della Valle, V., James, C., Trannoy, S., Masse, A., Kosmider, O., Le Couedic, J.P., Robert, F., Alberdi, A., Lecluse, Y., Plo, I., Dreyfus, F.J., Marzac, C., Casadevall, N., Lacombe, C., Romana, S.P., Dessen, P., Soulier, J., Viguie, F., Fontenay, M., Vainchenker, W. & Bernard, O.A. (2009) Mutation in TET2 in myeloid cancers. *The New England Journal of Medicine*, **360**, 2289–2301.
- Douet-Guilbert, N., De Braekeleer, E., Basinko, A., Herry, A., Gueganic, N., Bovo, C., Trillet, K., Dos Santos, A., Le Bris, M.J., Morel, F., Eveillard, J.R., Berthou, C. & De Braekeleer, M. (2012) Molecular characterization of deletions of the long arm of chromosome 5 (del(5q)) in 94 MDS/AML patients. *Leukemia*, **26**, 1695–1697.
- Ebert, B.L., Galili, N., Tamayo, P., Bosco, J., Mak, R., Pretz, J., Tanguturi, S., Ladd-Acosta, C., Stone, R., Golub, T.R. & Raza, A. (2008a) An erythroid differentiation signature predicts response to lenalidomide in myelodysplastic syndrome. *PLoS Medicine*, **5**, e35.
- Ebert, B.L., Pretz, J., Bosco, J., Chang, C.Y., Tamayo, P., Galili, N., Raza, A., Root, D.E., Attar, E., Ellis, S.R. & Golub, T.R. (2008b) Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature*, **451**, 335–339.
- Evers, C., Beier, M., Poelitz, A., Hildebrandt, B., Servan, K., Drechsler, M., Germing, U., Royer, H.D. & Royer-Pokora, B. (2007) Molecular definition of chromosome arm 5q deletion end points and detection of hidden aberrations in patients with myelodysplastic syndromes and isolated del(5q) using oligonucleotide array CGH. *Genes, Chromosomes & Cancer*, **46**, 1119–1128.
- Fenaux, P., Giagounidis, A., Selleslag, D., Beyne-Rauzy, O., Mufti, G., Mittelman, M., Muus, P., Te Boekhorst, P., Sanz, G., Del Canizo, C., Guerci-Bresler, A., Nilsson, L., Platzbecker, U., Lubbert, M., Quesnel, B., Cazzola, M., Ganser, A., Bowen, D., Schlegelberger, B., Aul, C., Knight, R., Francis, J., Fu, T., Hellstrom-Lindberg, E. & MDS-004 Lenalidomide del5q Study Group. (2011) A randomized phase 3 study of lenalidomide versus placebo in RBC transfusion-dependent patients with low-/intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes with del5q. *Blood*, **118**, 3765–3776.
- Feys, T., Poppe, B., De Preter, K., Van Roy, N., Verhasselt, B., De Paepe, P., De Paepe, A. & Speleman, F. (2007) A detailed inventory of DNA copy number alterations in four commonly used hodgkin's lymphoma cell lines. *Haematologica*, **92**, 913–920.
- Fidler, C., Watkins, F., Bowen, D.T., Littlewood, T.J., Wainscoat, J.S. & Boultonwood, J. (2004) NRAS, FLT3 and TP53 mutations in patients with myelodysplastic syndrome and a del(5q). *Haematologica*, **89**, 865–866.
- Göhring, G., Lange, K., Hofmann, W., Nielsen, K.V., Hellstrom-Lindberg, E., Roy, L., Morgan, M., Kreipe, H., Busche, G., Giagounidis, A. & Schlegelberger, B. (2012) Telomere shortening, clonal evolution and disease progression in myelodysplastic syndrome patients with 5q deletion treated with lenalidomide. *Leukemia*, **26**, 356–358.
- Greenberg, P., Cox, C., LeBeau, M.M., Fenaux, P., Morel, P., Sanz, G., Sanz, M., Vallespi, T., Hamblin, T., Oscier, D., Ohyashiki, K., Toyama, K., Aul, C., Mufti, G. & Bennett, J. (1997) International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*, **89**, 2079–2088. ERRATUM. *Blood*, **91**, 1100.
- Greenberg, P.L., Tuechler, H., Schanz, J., Sanz, G., Garcia-Manero, G., Solé, F., Bennett, J.M., Bowen, D., Fenaux, P., Dreyfus, F., Kantarjian, H., Kuendgen, A., Levis, A., Malcovati, L., Cazzola, M., Cermak, J., Fonatsch, C., Le Beau, M.M., Slovak, M.L., Krieger, O., Luebbert, M., Maciejewski, J., Magalhaes, S.M., Miyazaki, Y., Pfeilstocker, M., Sekeres, M., Sperr, W.R., Stauder, R., Tauro, S., Valent, P., Vallespi, T., van de Loosdrecht, A.A., Germing, U. & Haase, D. (2012) Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*, **120**, 2454–2465.
- Haase, D. (2008) Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. *Annals of Hematology*, **87**, 515–526.
- Haase, D., Germing, U., Schanz, J., Pfeilstocker, M., Nosslinger, T., Hildebrandt, B., Kundgen, A., Lubbert, M., Kunzmann, R., Giagounidis, A.A., Aul, C., Trumper, L., Krieger, O., Stauder, R., Muller, T.H., Wimazal, F., Valent, P., Fonatsch, C. & Steidl, C. (2007) New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood*, **110**, 4385–4395.
- Heinrichs, S., Kulkarni, R.V., Bueso-Ramos, C.E., Levine, R.L., Loh, M.L., Li, C., Neuberg, D., Kornblau, S.M., Issa, J.P., Gilliland, D.G., Garcia-Manero, G., Kantarjian, H.M., Estey, E.H. & Look, A.T. (2009) Accurate detection of uniparental disomy and microdeletions by SNP array analysis in myelodysplastic syndromes with normal cytogenetics. *Leukemia*, **23**, 1605–1613.
- Jädersten, M., Saft, L., Pellagatti, A., Göhring, G., Wainscoat, J.S., Boultonwood, J., Porwit, A., Schlegelberger, B. & Hellstrom-Lindberg, E. (2009) Clonal heterogeneity in the 5q- syndrome: P53 expressing progenitors prevail during lenalidomide treatment and expand at disease progression. *Haematologica*, **94**, 1762–1766.
- Jädersten, M., Saft, L., Smith, A., Kulasekararaj, A., Pomplun, S., Göhring, G., Hedlund, A., Hast, R., Schlegelberger, B., Porwit, A., Hellstrom-Lindberg, E. & Mufti, G.J. (2011) TP53 mutations in low-risk myelodysplastic syndromes with del(5q) predict disease progression. *Journal of Clinical Oncology*, **29**, 1971–1979.
- Jerez, A., Gondek, L.P., Jankowska, A.M., Makishima, H., Przychodzen, B., Tiu, R.V., O'Keefe, C.L., Mohamedali, A.M., Batista, D., Sekeres, M.A., McDevitt, M.A., Mufti, G.J. & Maciejewski, J.P. (2012) Topography, clinical, and genomic correlates of 5q myeloid malignancies revisited. *Journal of Clinical Oncology*, **30**, 1343–1349.

- Jonasova, A., Cermak, J., Vondrakova, J., Siskova, M., Hochova, I., Kadlcikova, E., Cerna, O., Sykora, M., Vozobulova, V., Seifertova, N., Michalova, K., Zemanova, Z., Brezinova, J., Belohlavkova, P., Kostecka, A. & Neuwirtova, R. (2012) Thrombocytopenia at diagnosis as an important negative prognostic marker in isolated 5q- MDS (IPSS low and intermediate-1). *Leukemia Research*, **36**, e222–e224.
- Krypuy, M., Ahmed, A.A., Etemadmoghadam, D., Hyland, S.J., Australian Ovarian Cancer Study Group, DeFazio, A., Fox, S.B., Brenton, J.D., Bowtell, D.D. & Dobrovic, A. (2007) High resolution melting for mutation scanning of TP53 exons 5–8. *BMC Cancer*, **7**, 168.
- Krzywinski, M., Schein, J., Birol, L., Connors, J., Gascoyne, R., Horsman, D., Jones, S.J. & Marra, M.A. (2009) Circos: an information aesthetic for comparative genomics. *Genome Research*, **19**, 1639–1645.
- Kuendgen, A., Lauseker, M., List, A.F., Fenaux, P., Giagounidis, A.A., Brandenburg, N.A., Backstrom, J., Glasmacher, A., Hasford, J. & Germing, U. (2012) Lenalidomide does not increase AML progression risk in RBC transfusion-dependent patients with Low- or Intermediate-1-risk MDS with del(5q): a comparative analysis. *Leukemia*, doi: 10.1038/leu.2012.369.
- Kulasekararaj, A.G., Smith, A.E., Mian, S.A., Mohamedali, A.M., Krishnamurthy, P., Lea, N.C., Gáken, J., Pennaneach, C., Ireland, R., Czepulkowski, B., Pomplun, S., Marsh, J.C., Mufti, G.J. (2013) TP53 mutations in myelodysplastic syndrome are strongly correlated with aberrations of chromosome 5, and correlate with adverse prognosis. *British Journal of Haematology*, **160**, 660–672.
- Le Bras, F., Sebent, M., Kelaidi, C., Lamy, T., Dreyfus, F., Delaunay, J., Banos, A., Blanc, M., Vey, N., Schmidt, A., Visanica, S., Eclache, V., Turlure, P., Beyne-Rauzy, O., Guerci, A., Delmer, A., de Botton, S., Rea, D., Fenaux, P. & Ades, L. (2011) Treatment by lenalidomide in lower risk myelodysplastic syndrome with 5q deletion—the GFM experience. *Leukemia Research*, **35**, 1444–1448.
- List, A., Dewald, G., Bennett, J., Giagounidis, A., Raza, A., Feldman, E., Powell, B., Greenberg, P., Thomas, D., Stone, R., Reeder, C., Wride, K., Patin, J., Schmidt, M., Zeldis, J. & Knight, R. (2006) Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *The New England Journal of Medicine*, **355**, 1456–1465.
- Maciejewski, J.P., Tiu, R.V. & O'Keefe, C. (2009) Application of array-based whole genome scanning technologies as a cytogenetic tool in haematological malignancies. *British Journal of Haematology*, **146**, 479–488.
- Makishima, H., Cazzolli, H., Szpurka, H., Dunbar, A., Tiu, R., Huh, J., Muramatsu, H., O'Keefe, C., Hsi, E., Paquette, R.L., Kojima, S., List, A.F., Sekeres, M.A., McDevitt, M.A. & Maciejewski, J.P. (2009) Mutations of e3 ubiquitin ligase cbl family members constitute a novel common pathogenic lesion in myeloid malignancies. *Journal of Clinical Oncology*, **27**, 6109–6116.
- Mallo, M., Cervera, J., Schanz, J., Such, E., Garcia-Manero, G., Luno, E., Steidl, C., Espinet, B., Vallespi, T., Germing, U., Blum, S., Ohyashiki, K., Grau, J., Pfeilstocker, M., Hernandez, J.M., Noesslinger, T., Giagounidis, A., Aul, C., Calasanz, M.J., Martin, M.L., Valent, P., Collado, R., Haferlach, C., Fonatsch, C., Lubbert, M., Stauder, R., Hildebrandt, B., Krieger, O., Pedro, C., Arenillas, L., Sanz, M.A., Valencia, A., Florensa, L., Sanz, G.F., Haase, D. & Sole, F. (2011) Impact of adjunct cytogenetic abnormalities for prognostic stratification in patients with myelodysplastic syndrome and deletion 5q. *Leukemia*, **25**, 110–120.
- Mohamedali, A., Gaken, J., Twine, N.A., Ingram, W., Westwood, N., Lea, N.C., Hayden, J., Donaldson, N., Aul, C., Gattermann, N., Giagounidis, A., Germing, U., List, A.F. & Mufti, G.J. (2007) Prevalence and prognostic significance of allelic imbalance by single-nucleotide polymorphism analysis in low-risk myelodysplastic syndromes. *Blood*, **110**, 3365–3373.
- Oliva, E.N., Cuzzola, M., Aloe Spiriti, M.A., Poloni, A., Lagana, C., Rigolino, C., Morabito, F., Galimberti, S., Ghio, R., Cortelezzi, A., Palumbo, G.A., Sanpaolo, G., Finelli, C., Ricco, A., Volpe, A., Roda, F., Breccia, M., Alimena, G., Nobile, F. & Latagliata, R. (2012) Biological activity of lenalidomide in myelodysplastic syndromes with del5q: results of gene expression profiling from a multicenter phase II study. *Annals of Hematology*, **92**, 25–32.
- Pardanani, A., Patnaik, M.M., Lasho, T.L., Mai, M., Knudson, R.A., Finke, C., Ketterling, R.P., McClure, R.F. & Tefferi, A. (2010) Recurrent IDH mutations in high-risk myelodysplastic syndrome or acute myeloid leukemia with isolated del(5q). *Leukemia*, **24**, 1370–1372.
- Paschka, P., Schlenk, R.F., Gaidzik, V.I., Habdank, M., Kronke, J., Bullinger, L., Spath, D., Kayser, S., Zucknick, M., Gotze, K., Horst, H.A., Germing, U., Dohner, H. & Dohner, K. (2010) IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication. *Journal of Clinical Oncology*, **28**, 3636–3643.
- Patnaik, M.M., Lasho, T.L., Finke, C.M., Gangat, N., Caramazza, D., Holtan, S.G., Pardanani, A., Knudson, R.A., Ketterling, R.P., Chen, D., Hoyer, J.D., Hanson, C.A. & Tefferi, A. (2010) WHO-defined 'myelodysplastic syndrome with isolated del(5q)' in 88 consecutive patients: survival data, leukemic transformation rates and prevalence of JAK2, MPL and IDH mutations. *Leukemia*, **24**, 1283–1289.
- Patnaik, M.M., Lasho, T.L., Finke, C.M., Knudson, R.A., Ketterling, R.P., Chen, D., Hoyer, J.D., Hanson, C.A. & Tefferi, A. (2011) Isolated del(5q) in myeloid malignancies: clinicopathologic and molecular features in 143 consecutive patients. *American Journal of Hematology*, **86**, 393–398.
- Sebaa, A., Ades, L., Baran-Marzack, F., Mozziconacci, M.J., Penther, D., Dobbstein, S., Stamatoullas, A., Recher, C., Prebet, T., Moulessehou, S., Fenaux, P. & Eclache, V. (2012) Incidence of 17p deletions and TP53 mutation in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with 5q deletion. *Genes, Chromosomes & Cancer*, **51**, 1086–1092.
- Sekeres, M.A., Maciejewski, J.P., Giagounidis, A.A., Wride, K., Knight, R., Raza, A. & List, A.F. (2008) Relationship of treatment-related cytopenias and response to lenalidomide in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *Journal of Clinical Oncology*, **26**, 5943–5949.
- Sekeres, M., Giagounidis, A., List, A., Sanz, G., Selleslag, D., Backstrom, J., Fu, T. & Fenaux, P. (2011) Predictive factors for overall survival (OS) and AML progression in a large cohort of patients with low-/int-1-risk MDS with del(5q) treated with lenalidomide (LEN). *Haematologica*, **96**, 202, abstract 481
- Shaffer, L., Slovak, M. & Campbell, L. (2009) ISCN2009: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Karger AG, Basel, Switzerland.
- Solé, F., Luño, E., Sanzo, C., Espinet, B., Sanz, G.F., Cervera, J., Calasanz, M.J., Cigudosa, J.C., Milla, F., Ribera, J.M., Bureo, E., Márquez, M.L., Arranz, E. & Florensa, L. (2005) Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica*, **90**, 1168–1178.
- Starczynowski, D.T., Kuchenbauer, F., Argiropoulos, B., Sung, S., Morin, R., Muranyi, A., Hirst, M., Hogge, D., Marra, M., Wells, R.A., Buckstein, R., Lam, W., Humphries, R.K. & Karsan, A. (2010) Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q- syndrome phenotype. *Nature Medicine*, **16**, 49–58.
- Tiu, R.V., Gondek, L.P., O'Keefe, C.L., Elson, P., Huh, J., Mohamedali, A., Kulasekararaj, A., Advani, A.S., Paquette, R., List, A.F., Sekeres, M.A., McDevitt, M.A., Mufti, G.J. & Maciejewski, J.P. (2011) Prognostic impact of SNP array karyotyping in myelodysplastic syndromes and related myeloid malignancies. *Blood*, **117**, 4552–4560.
- Venner, C.P., Wegrzyn Woltosz, J., Nevill, T.J., Deeg, H.J., Caceres, G., Platzbecker, U., Scott, B.L., Sokol, L., Sung, S., List, A.F. & Karsan, A. (2012) Correlation of clinical response and response duration with miR-145 induction by lenalidomide in CD34+ cells from patients with del(5q) myelodysplastic syndrome. *Haematologica*, **98**, 409–413.
- Villa, O., Del Campo, M., Salido, M., Gener, B., Astier, L., Del Valle, J., Gallastegui, F., Perez-Jurado, L.A. & Sole, F. (2007) Small supernumerary marker chromosome causing partial trisomy 6p in a child with craniosynostosis. *American Journal of Medical Genetics*, **143A**, 1108–1113.
- Wagner, K., Damm, F., Göhring, G., Gorlich, K., Heuser, M., Schafer, I., Ottmann, O., Lubbert, M., Heit, W., Kanz, L., Schlimok, G., Raghavachar, A.A., Fiedler, W., Kirchner, H.H., Brügger, W., Zucknick, M., Schlegelberger, B., Heil, G., Ganser, A. & Krauter, J. (2010) Impact of IDH1 R132

- mutations and an IDH1 single nucleotide polymorphism in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: SNP rs11554137 is an adverse prognostic factor. *Journal of Clinical Oncology*, **28**, 2356–2364.
- Wang, L., Fidler, C., Nadig, N., Giagounidis, A., Della Porta, M.G., Malcovati, L., Killick, S., Gattermann, N., Aul, C., Boultonwood, J. & Wainscoat, J.S. (2008) Genome-wide analysis of copy number changes and loss of heterozygosity in myelodysplastic syndrome with del(5q) using high-density single nucleotide polymorphism arrays. *Haematologica*, **93**, 994–1000.
- Wei, S., Chen, X., McGraw, K., Zhang, L., Komrokji, R., Clark, J., Caceres, G., Billingsley, D., Sokol, L., Lancet, J., Fortenbery, N., Zhou, J., Eksioglu, E.A., Sallman, D., Wang, H., Epling-Burnette, P.K., Djeu, J., Sekeres, M., Maciejewski, J.P. & List, A. (2013) Lenalidomide promotes p53 degradation by inhibiting MDM2 auto-ubiquitination in myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *Oncogene*, **32**, 1110–1120.

2. Annex 2: Presentació en congressos dels treballs d'aquesta tesi

Treball I

Mallo M, Arranz E, Cervera J, Mayans JR, Collado R, Sanz A, Luño E, Sanzo C, Gómez E, Espinet B, Salido M, Florensa L, Arenillas L, Pedro C, Ramiro S, González O, Font P, Renedo M, Such E, Sanz GF, García C, Oliver I, Carbonell F, Gómez V, Andreu R, León P, Martín ML, Solé F. *Aplicación de la FISH 5q en la selección de pacientes con SMD candidatos a recibir lenalidomida.*

Tipus de presentació: Oral.

Congrés: *XLIX Reunión Nacional de la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia.* Octubre 2007, Pamplona.

Mallo M, Arenillas L, Espinet B, Salido M, Hernández JM, Lumbreras E, del Rey M, Arranz E, Ramiro S, Font P, González O, Renedo M, Cervera J, Such E, Sanz GF, Luño E, Sanzo C, Calasanz MJ, Mayans J, García-Ballesteros C, Amigo V, Collado R, Oliver I, Carbonell F, Bureo E, Insunza A, Yañez L, Muruzabal MJ, Gómez-Beltrán E, Andreu R, León P, Gómez V, Sanz A, Casasola N, Moreno E, Alegre A, Martín ML, Pedro C, Serrano S, Florensa L, Solé F. *FISH improves the detection of 5q31 deletion in myelodysplastic syndromes (MDS) without cytogenetic evidence of 5q-.*

Tipus de presentació: Pòster.

Congrés: *13th Congress of the European Hematology Association.* Juny 2008, Copenhagen, Dinamarca.

Treball II

Mallo M, Cervera J, Schanz J, Espinet B, Such E, Luño E, Steidl C, Martín ML, Germing U, Granada I, Pfeilstöcker M, Hernández JM, Nösslinger T, Calasanz MJ, Valent P, Collado R, Fonatsch C, Bureo E, Lübbert M, Ríos R, Stauder R, Arranz E, Hildebrandt B, Cigudosa JC, Pedro C, Salido M, Arenillas L, Sanz GF, Sanz MA, Valencia A, Florensa L, Haase D, Solé F. *Prognostic impact of additional chromosomal aberrations to 5q- in patients with primary myelodysplastic syndromes.*

Tipus de presentació: Oral.

Congrés: *13th Congress of the European Hematology Association.* Juny 2008, Copenhagen, Dinamarca.

Mallo M, Cervera J, Schanz J, Espinet B, Such E, Luño E, Steidl C, Martín ML, Germing U, Granada I, Pfeilstöcker M, Hernández JM, Nösslinger T, Calasanz MJ, Valent P, Collado R, Fonatsch C, Bureo E, Lübbert M, Ríos R, Stauder R, Arranz E, Hildebrandt B, Cigudosa JC, Pedro C, Salido M, Arenillas L, Sanz GF, Sanz MA, Valencia A, Florensa L, Haase D, Solé F. *Impacto pronóstico de alteraciones adicionales a 5q- en pacientes con síndrome mielodisplásico primario.*

Tipus de presentació: Oral (sessió plenària).

Congrés: *L Reunión Nacional de la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia.* Octubre 2008, Murcia.

Mallo M, Cervera J, Schanz J, Espinet B, Such E, Luño E, Steidl C, Martín ML, Germing U, Grau J, Pfeilstöcker M, Hernández JM, Nösslinger T, Calasanz MJ, Valent P, Collado R, Fonatsch C, Bureo E, Lübbert M, Ríos R, Stauder R, Arranz E, Hildebrandt B, Slovak ML, Cigudosa J, Eclache V, Krieger O, Pedro C, Salido M, Arenillas L, Sanz G, Sanz MA, Valencia A, Florensa L, Haase D, Solé F. *Prognostic Impact of Additional Chromosomal Aberrations (ACA) to 5q- in Patients with primary Myelodysplastic Syndrome.*

Tipus de presentació: Pòster.

Congrés: *50th American Society of Hematology Annual Meeting.* Desembre 2008, San Francisco, EUA.

Treball III

Mallo M, del Rey M, Ibáñez M, Calasanz MJ, Larráyoz MJ, Arenillas L, Pedro C, Jerez A, Maciejewski J, Costa D, Nomdedeu M, Díez-Campelo M, Lumbreras E, González-Martínez T, Marugán I, Valcárcel D, Such E, Cervera J, de Paz R, Ramos F, Arnan M, Grau J, Buño I, Luño E, Gallardo D, Talavera E, Hernández JM, Solé F. *Influencia de las alteraciones citogenéticas y mutacionales en la respuesta al tratamiento con lenalidomida en los SMD con delección 5q.*

Tipus de presentació: Pòster.

Congrés: *LIII Reunión Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia.*
Octubre 2011, Saragossa.

Mallo M. *Response to lenalidomide in MDS 5q-: influence of cytogenetics and mutations.*

Tipus de presentació: Oral.

Congrés: *COST Action BM0801: European Genetic and Epigenetic Study on AML and MDS. EuGESMA: 4th Working Group and 5th MC Meeting.* Abril 2012, Belgrad, Serbia.

Mallo M, Del Rey M, Ibáñez M, Calasanz MJ, Larráyoiz MJ, Arenillas L, Pedro C, Jerez A, Maciejewski JP, Costa D, Nomdedeu M, Diez-Campelo M, Lumbreras E, González-Martínez T, Marugán I, Such E, Cervera J, Cigudosa JC, Hernández JM, Solé F. *Karyotypic complexity and low platelet baseline count predict lenalidomide treatment failure in myelodysplastic syndromes with del(5q).*

Tipus de presentació: Pòster.

Congrés: *17th Congress of the European Hematology Association.* Juny 2012, Amsterdam, Països Baixos.

3. Annex 3: Altres publicacions elaborades durant la realització de la tesi doctoral

Publicacions com autora

- **Mallo M**, Salido M, Espinet B, Cervera J, Canellas A, Pajuelo JC, Pedro C, Florensa L, Sanz MA, Solé F. *Could ATRA/Idarubicin treatment of acute promyelocytic leukemia induce the appearance of new clonal cytogenetic abnormalities in patients in complete remission?*. *Leuk Res* 2006;31(9):1323-5. Factor d'impacte: 2,561.
- **Mallo M**, Espinet B, Salido M, Ferrer A, Pedro C, Besses C, Pérez-Vila E, Serrano S, Florensa L, Solé F. *Gain of multiple copies of the CFBF gene: a new genetic aberration in a case of granulocytic sarcoma*. *Cancer Genet Cytogenet* 2007; 179(1):62-5. Factor d'impacte: 1,559.
- **Mallo M**, Osca G, Solorzano J, Arenillas L, Florensa L, Solé F. *TET2 gene is not deleted in chronic myelomonocytic leukemia: a FISH retrospective study*. *Haematologica* 2010;95(10):1798-1800. Factor d'impacte: 6,532.
- **Mallo M**, Luño E, Sanzo C, Cervera J, Haase D, Schanz J, García-Manero G, Del Cañizo C, Sanz GF, Solé F. *Clinical impact of the clone size in MDS cases with monosomy 7 or 7q deletion, trisomy 8, 20q deletion and loss of Y chromosome*. *Leuk Res* 2011;35(6):834-836. Factor d'impacte: 2,923.

Publicacions com a col·laboradora

- Galván AB, **Mallo M**, Arenillas L, Salido M, Espinet B, Pedro C, Florensa L, Serrano S, Solé F. *Does monosomy 5 really exist as a common aberration in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias?* *Leuk Res* 2010;34(9):1242-1245. Factor d'impacte: 2,555.
- Such E, Cervera J, Costa D, Solé F, Vallespí T, Luño E, Collado R, Calasanz MJ, Hernández-Rivas JM, Cigudosa JC, Nomdedeu B, **Mallo M**, Carbonell F, Bueno J, Ardanaz MT, Ramos F, Tormo M, Sancho-Tello R, Del Cañizo C, Gómez V, Marco V, Xicoy B, Bonanad S, Pedro C, Bernal T, Sanz GF. *Cytogenetic risk stratification in chronic myelomonocytic leukemia*. *Haematologica* 2011;96(3):375-383. Factor d'impacte: 6,424.

- Villa O, **Mallo M**, Kosyakova N, Salido M, Liehr T, Martínez-Avilés L, Pedro C, García-Aragonés M, Espinet B, Bellosillo B, Florensa L, Arenillas L, Cuscó I, Jurado LA, Solé F. *Deletion of TET2 gene in an acute myeloid leukemia case with a t(4;15)(q24;q26) characterized by glass needle based chromosome microdissection and oligonucleotide array.* Leuk Res 2011; 35(9): e161-e163. Factor d'impacte: 2,923.
- Such E, Cervera J, Ibáñez M, Gómez-Seguí I, Luna I, López-Pavía M, **Mallo M**, Collado R, Vicente A, Hernández-Boluda JC, Luño E, Andreu R, Sanz GF, Sanz MA. *Absence of mutations in the activation loop and juxtamembrane domains of VEGFR-1 and VEGFR-2 gene in chronic myelomonocytic leukemia (CMML).* Leuk Res. 2012;36(3):e50-1. Factor d'impacte (2011): 2,923.
- Schanz J, Tuechler H, Sole 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, García-Manero G, Faderl S, Pierce S, Le Beau MM, Bennett JM, Greenberg P, Germing U, Haase D. *A new, comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes and oligoblastic AML following MDS derived from an international database merge.* J Clin Oncol 2012; 30(8): 820-829. Factor d'impacte (2011): 18,372.
- Valcárcel D, Ademà V, Solé F, Ortega M, Nomdedeu B, Sanz G, Luño E, Cañizo C, de la Serna J, Ardanaz M, Marco V, Collado R, Grau J, **Mallo M**, Vallespí T. *Complex, not monosomal, karyotype is the cytogenetic marker of poorest prognosis in patients with primary myelodysplastic syndrome.* J Clin Oncol 2013; 31(7):916-922. Factor d'impacte (2011): 18,372.
- 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):416-421. Factor d'impacte (2011): 2,923.

- Arenillas L, **Mallo M**, Ramos F, Guinta K, Barragán E, Lumbreras E, Larráyo MJ, De Paz R, Tormo M, Abáigar M, Pedro C, Cervera J, Such E, Calasanz MJ, Díez-Campelo M, Sanz GF, Hernández JM, Luño E, Saumell S, Maciejewski J, Florensa L, Solé F. *Single nucleotide polymorphism array karyotyping: a diagnostic and prognostic tool in myelodysplastic syndromes with unsuccessful conventional cytogenetic testing*. Sotmès a publicació.