



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Medicina

Tesi doctoral amb títol:

**Anàlisi de la trisomia 8 en les síndromes
mielodisplàsiques**

presentada per

Sílvia Saumell i Tutusaus

per optar al grau de Doctora

per la Universitat Autònoma de Barcelona

Bellaterra, 2015

Vist i plau de:

Lourdes Florensa i Brichs
Directora

Francesc Solé i Ristol
Director

Adolf Díez i Pérez
Tutor acadèmic

La Dra. Lourdes Florensa i Brichs, cap del Laboratori de Citologia Hematològica del Servei de Patologia de l'Hospital del Mar de Barcelona i el Dr. Francesc Solé Ristol, Director científic i responsable de la Plataforma de Citogenètica de l'Institut de Recerca Contra la Leucèmia Josep Carreras (IJC) de Badalona,

CERTIFIQUEN:

Que Sílvia Saumell i Tutusaus ha realitzat, sota la seva direcció, el treball "Anàlisi de la trisomia 8 en les síndromes mielodisplàsiques" per optar al grau de Doctora en Medicina.

Aquest treball s'ha realitzat en el Laboratori de Citologia Hematològica i en el Laboratori de Citogenètica Molecular, Servei de Patologia de l'Hospital del Mar dins del Grup de Recerca en neoplàsies hematològiques (GRETNHE) integrat en el Programa d'investigació del Càncer del IMIM (*Hospital del Mar Medical Research Institute*), grup reconegut com a grup d'investigació consolidat per la Generalitat de Catalunya (2009 SGR541).

Barcelona, 2015

Dra. Lourdes Florensa i Brichs

Dr. Francesc Solé i Ristol

“Crec que existeix, i ho sento dins meu, un instint de la veritat o del coneixement o del descobriment, alguna cosa de la mateixa naturalesa que l’instint de la virtut, i el fet que tinguem aquest instint és raó suficient per a la investigació científica”

Charles Darwin

A la meva mare i a l'Òscar,
els meus dos grans puntals.

AGRAÏMENTS

Des del moment en què vaig començar la residència al Servei d'Hematologia de l'Hospital del Mar, on em van veure néixer com a especialista en hematologia, passant pel Laboratori de Citologia Hematològica on, gràcies a tot l'equip que en forma part i a la complicitat dels companys de Citogenètica, vaig créixer com a citòloga, fins ara, que sóc adjunta a l'Hospital Universitari Mútua de Terrassa, on tothom em va rebre amb els braços oberts, m'he trobat pel camí a moltes persones sense les quals aquesta tesi no seria possible. Una persona és la suma dels aports de les persones que coneix, jo he tingut la sort de conèixer gent meravellosa que m'ha aportat grans coses. Dedico una menció especial pels meus directors de tesi la Lourdes i el Kiko, han sigut els meus mestres i guies en aquesta aventura, mil gràcies. Per la Dra. Woessner, em sento afortunada d'haver pogut compartir amb ella les sessions al microscopi, tot un privilegi. Pels meus adjunts, per ensenyar-me tantes coses i tenir paciència en el meu aprenentatge. Pels amics que he fet pel camí. Per l'Òscar, el meu company de viatge i el meu còmplice en tot. Per la meva mare, per creure en mi incondicionalment i ajudar-me sempre. Per tota la meva família que em fa costat, i pels avis que he vist marxar, us enyoro cada dia. I per l'Èlia, que d'ençà que ha nascut m'omple la vida com mai m'havia imaginat, és l'alegria de la meva vida.

Finalment, vull agrair a la *Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia* i als membres del *Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos* la seva col·laboració inestimable en aquest projecte de tesi.

Només em queda donar-vos les gràcies a tots pel suport rebut, m'heu fet el camí més fàcil, i he crescut gràcies a vosaltres.

SST

S'han generat les següents publicacions:

Saumell S, Florensa L, Luño E, Sanzo C, Cañizo C, Hernández JM, Cervera J, Gallart MA, Carbonell F, Collado R, Arenillas L, Pedro C, Bargay J, Nomdedeu B, Xicoy B, Vallespi T, Raya JM, Belloch L, Sanz GF, Solé F. Prognostic value of trisomy 8 as a single anomaly and the influence of additional cytogenetic aberrations in primary myelodysplastic syndromes. *B.J.Haematol* 2012;159(3):311-21;

Saumell S, Solé F, Arenillas L, Montoro J, Valcàrcel D, Pedro C, Sanzo C, Luño E, Giménez T, Arnan M, Pomares H, De Paz R, Arrizabalaga B, Jeréz A, Martínez AB, Sánchez-Castro J, Rodríguez-Gambarte J, Raya JM, Ríos E, Rodríguez-Rivera M, Espinet B, Florensa L. Trisomy 8, a cytogenetic abnormality in myelodysplastic syndromes, is constitutional or not? *PLoS One* 2015;10(6):e0129375

Í **NDEX**

I. ABREVIATURES

II. INTRODUCCIÓ	1
1. Hematopoesi	3
1.1 Mielopoesi	4
2. Neoplàsies mieloides	11
2.1 Síndromes mielodisplàsiques	12
2.1.1 Epidemiologia	12
2.1.2 Etiologia i Patogènia	13
2.1.3 Diagnòstic	14
2.1.3.1 Punció aspirativa de medul·la òssia	19
2.1.3.2 Biòpsia òssia	20
2.1.3.3 Tècniques d'anàlisi genòmic	20
2.1.3.3.1 Citogenètica Convencional	20
2.1.3.3.2 Hibridació <i>in situ</i> Fluorescent	21
2.1.3.3.3 Microarrays genòmics	22
2.1.3.3.4 Tècniques moleculars	23
2.1.4 Classificació	25
2.1.5 Pronòstic	32
2.1.6 Tractament	36
3. Cromosoma 8	38
3.1 Mutacions gèniques en el cromosoma 8	38
3.2 Alteracions estructurals del cromosoma 8	39
3.3 Alteracions en el número de còpies del cromosoma 8	39
3.3.1 Trisomia del cromosoma 8	39
3.3.1.1 Trisomia constitucional del cromosoma 8	40
3.3.1.2 Trisomia adquirida del cromosoma 8	41
4. Síndromes mielodisplàsiques amb trisomia 8 aïllada	42
4.1 Patogènesi de les SMD amb trisomia 8 aïllada	42
4.1.1 Augment de la càrrega gènica	42
4.1.2 Pèrdua del silenciament genòmic	44
4.1.3 Mutacions o reordenaments de gens	44
4.1.4 Mecanismes immunes	46
4.2 Tractament de les SMD amb trisomia 8 aïllada	50

III. HIPOTESI I OBJECTIUS	51
IV. MÈTODE I RESULTATS	55
1. ARTICLE 1: Valor pronòstic de la trisomia 8 com a alteració única i la influència d'alteracions addicionals en les síndromes mielodisplàsiques primàries	59
2. ARTICLE 2: La trisomia 8, alteració citogenètica en les síndromes mielodisplàsiques, és constitucional?	74
V. DISCUSSIÓ	83
1. Caracterització de les SMD amb trisomia 8 aïllada	86
2. Impacte pronòstic de les alteracions addicionals	87
3. Incidència de la trisomia 8 constitucional en les SMD amb aquesta alteració	89
4. Valor diagnòstic de la trisomia 8 en les SMD	90
VI. CONCLUSIONS	91
VII. BIBLIOGRAFIA	95

ABREVIATURES

+8:	trisomia cromosoma 8
2HG:	2-hidroxioglutarat
AA:	anèmia aplàsica
ADN:	àcid desoxiribonucleic
AR:	anèmia refractària
Ara-C:	arabinòsid de citocina
AREB-T:	anèmia refractària amb excés de blasts en transformació
AREB:	anèmia refractària amb excés de blasts
ARSA:	anèmia refractària amb sideroblasts en anell
ATG:	gammaglobulina antitimocítica (de l'anglès <i>anti-thymocyte globulin</i>)
AZA:	azacitidina
CD:	grup de diferenciació per proteïnes de membrana (de l'anglès <i>cluster of differentiation</i>)
CEP8:	sonda centromèrica del cromosoma 8
CFU:	unitat formadora de colònies (de l'anglès <i>colony forming unit</i>)
CFU-L:	unitat formadora de colònies limfoides
CFU-LM:	unitat formadora de colònies limfoidemieloides
CFU-M:	unitat formadora de colònies mieloides
CGH:	hibridació genòmica comparada (de l'anglès <i>comparative genomic hybridization</i>)
CHIP:	hematopoesi conal de potencial indeterminat (de l'anglès <i>clonal hematopoiesis of indeterminate potential</i>)
CMV:	citomegalovirus
CRDM-SA:	citopènia refractària amb displàsia multilíneal amb sideroblasts en anell
CRDM:	citopènia refractària amb displàsia multilíneal
CRDU:	citopènia refractària amb displàsia unilíneal
CsA:	ciclosporina A
cTM8:	trisomia 8 constitucional en mosaic
DNE:	donant no emparentat
EPO:	eritropoetina
FAB:	French-American- British
FEC:	factor estimulant de colònies

FISH:	hibridació <i>in situ</i> fluorescent (de l'anglès <i>fluorescence in situ hybridization</i>)
GESMD:	Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos
GI:	silenciament genòmic (de l'anglès <i>genomic imprinting</i>)
Hb:	hemoglobina
HLA:	antigen leucocitari humà (de l'anglès <i>human leukocyte antigen</i>)
HPN:	hemoglobinúria paroxística nocturna
ICUS:	citopènia idiopàtica de significat incert (de l'anglès <i>idiopathic cytopenia of undetermined significance</i>)
IL:	interleucina
INF:	interferó
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>)
ISCN:	sistema internacional de nomenclatura en citogenètica humana (de l'anglès <i>International System for Human Cytogenetic Nomenclature</i>)
LAM:	leucèmia aguda mieloide
LIF:	factor inhibidor de leucèmia
LMMC:	leucèmia mielomonocítica crònica
LOH:	pèrdua d'heterozigocitat (de l'anglès <i>loss of heterozygosity</i>)
MAPK:	proteïna cinasa activada per mitogen (de l'anglès <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MHC:	complex major d'histocompatibilitat (de l'anglès <i>major histocompatibility complex</i>)
MO:	medul·la òssia
MPO:	mieloperoxidasa
NK:	cèl·lules <i>natural killer</i>
NMP:	neoplàsies mieloproliferatives
NR:	neutropènia refractària
OMS:	Organització Mundial de la Salut
PAS:	àcid periòdic de Schiff (de l'anglès <i>Periodic Acid-Schiff</i>)
PHA:	fitohemaglutinina

PL:	plaquetes
qPCR:	reacció en cadena quantitativa de la polimerasa (de l' anglès <i>quantitative polymerase chain reaction</i>)
QT:	quimioteràpia
RAN:	recompte absolut de neutròfils
SG:	supervivència global
SMD:	síndromes mielodisplàsiques
SMD/NMP:	neoplàsies mielodisplàsiques/mieloproliferatives
SMD+8:	síndrome mielodisplàsica amb +8 aïllada
SNP:	polimorfismes d'un únic nucleòtid (de l' anglès <i>single nucleotide polymorfism</i>)
SP:	sang perifèrica
Th17:	cèl·lules T "helper" productores de IL17
TIS:	tractament immunosupressor
TLR:	receptor "Toll-like" (de l' anglès <i>Toll-like receptor</i>)
TNF:	factor de necrosi tumoral (de l' anglès <i>tumor necrosis factor</i>)
TPH:	transplantament de progenitors hematopoètics
TPO:	trombopoetina
TR:	trombopènia refractària
Treg:	cèl·lules T reguladores
UPD:	disomies uniparentals (de l' anglès <i>uniparental disomy</i>)
VHB:	virus hepatitis B
VHC:	virus hepatitis C
VIH:	virus immunodeficiència humana
WPSS:	índex pronòstic basat en la classificació de l'OMS (de l' anglès <i>WHO classification-based Prognostic Scoring System</i>)
α KG:	α -ketoglutarat

INTRODUCCIÓ

1. HEMATOPOESI

L'hematopoesi és el mecanisme fisiològic responsable de la formació de més de 100 bilions de cèl·lules sanguínies madures cada dia mitjançant la diferenciació i proliferació de cèl·lules mare hematopoètiques. Inicialment, aquest procés es dona en la placenta materna, en el fetge i en la melsa en l'embrió, però en l'adult està confinat en el microambient medul·lar a l'interior dels ossos. El microambient està format per cèl·lules de l'estroma medul·lar que segreguen citocines i proteïnes moduladores de la matriu cel·lular i cèl·lules mesenquimals que generen os, grassa i cartílag. Les cèl·lules estromals presenten factors de creixement juntament amb molècules d'adhesió i d'assentament en la seva membrana cel·lular, produint-se interaccions cèl·lula-cèl·lula amb les cèl·lules hematopoètiques. Aquestes interaccions són essencials per la nidificació i proliferació dels diferents subtipus cel·lulars en zones específiques de l'estroma medul·lar¹⁻⁵.

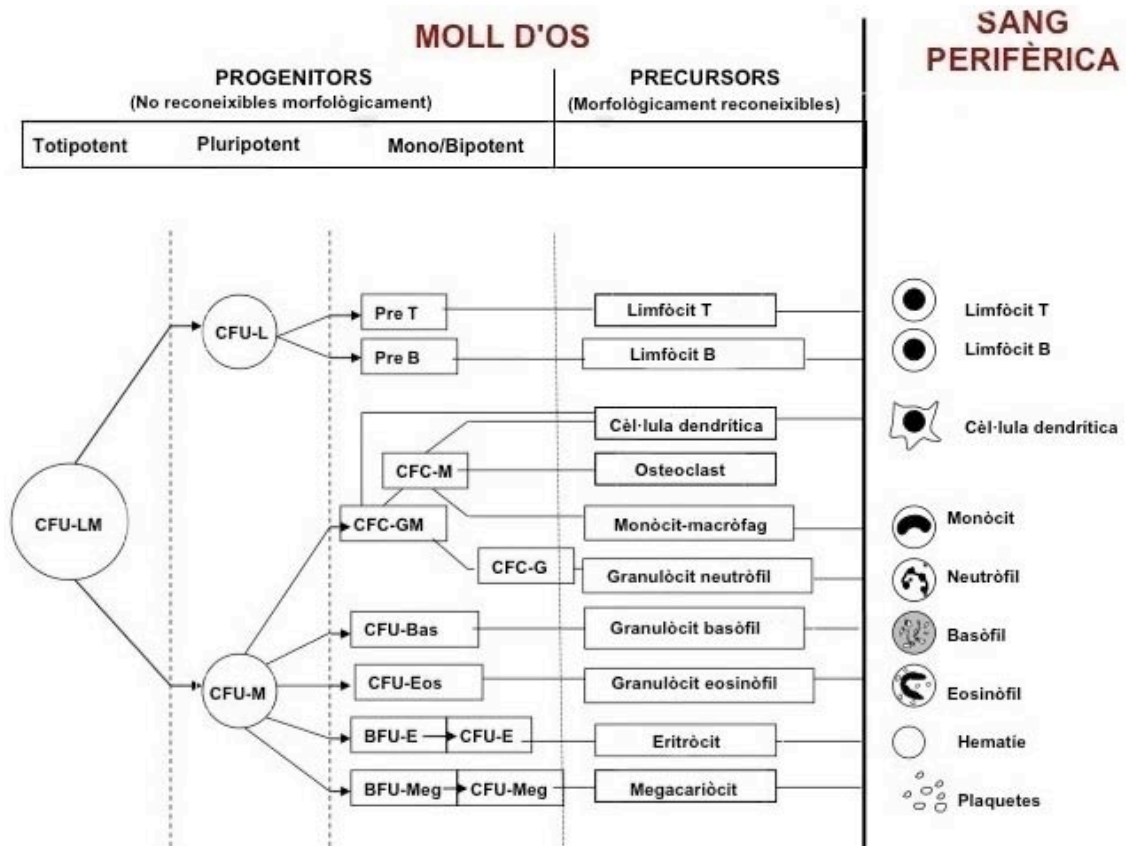


Figura 1. Esquema de la hematopoesi humana (Modificat de Woessner i Florensa. 2008).

Les cèl·lules medul·lars més indiferenciades són les cèl·lules mare totipotents (amb capacitat de proliferació, diferenciació i autorenovació), que en la seva diferenciació donen lloc a dues grans unitats formadores de colònies (CFU) hematopoètiques, la limfoide (CFU-L) i la mieloide (CFU-M)¹. En els adults, la majoria de cèl·lules mare es troben en fase quiescent, estat que els hi confereix protecció als agents genotòxics i una llarga supervivència. Tant l'estat de quiescència, com el procés d'auto-renovació i diferenciació d'aquestes cèl·lules estan regulats per estímuls externs i per xarxes intracel·lulars reguladores de la transcripció^{2,4,6}. Nosaltres ens centrarem en la mielopoiesi o formació de cèl·lules diferenciades mieloides (cèl·lules dendrítiques mieloides, monòcits, neutròfils, basòfils, eosinòfils, hematies i plaquetes) a partir CFU-M.

1.1 MIELOPOESI

Les CFU-M o progenitors mieloides mantenen l'habilitat d'autorenovar-se però la capacitat de diferenciar-se és únicament cap a la línia mieloide. Això es deu a l'adquisició de receptors d'alguns factors de creixement específics i la pèrdua d'altres. Els factors de creixement que semblen ser importants en la supervivència i expansió de les cèl·lules progenitores *in vitro* són el factor de creixement de cèl·lules mastocítiques (*kit-ligand*), varies interleucines (IL), factor estimulant de colònies (FEC), factor inhibidor de leucèmia (LIF), eritropoetina (EPO), trombopoetina (TPO) i *FLT3-ligand*, entre altres^{1,5}. Aquests factors actuen de forma sinèrgica entre si, generant una elevada activitat mitòtica. Per altra banda, la diferenciació cel·lular també està regulada per xarxes de transducció de senyals intracel·lulars^{5,7}. En la figura 2 podem veure els principals factors de transcripció (GATA-1, GATA-2, PU.1, entre altres) que regulen la diferenciació mieloide i a quin nivell de la diferenciació actuen².

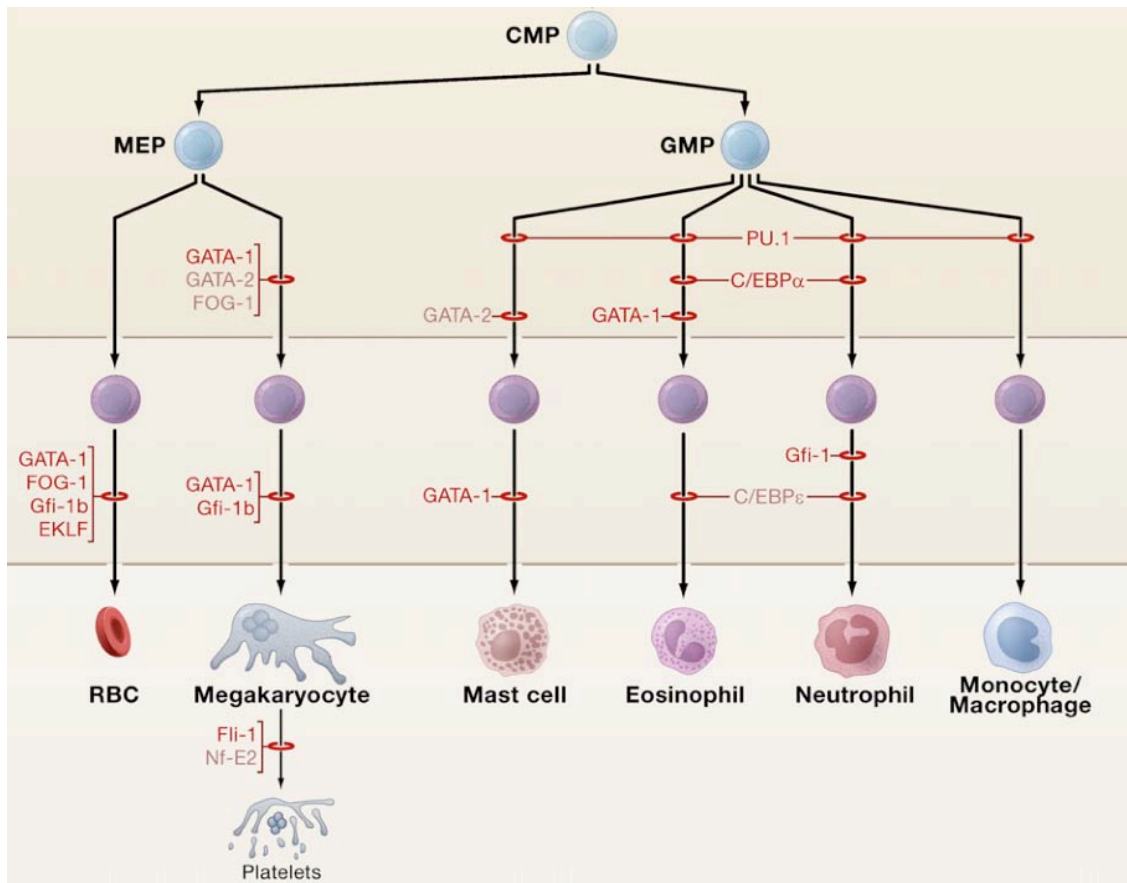


Figura 2. Esquema dels factors de transcripció específics per a la diferenciació mieloides (Modificat de Orkin i cols. 2008).

Les cèl·lules progenitores mieloides no posseeixen trets que permetin diferenciar-les morfològicament, però sí que presenten un conjunt d'antígens de membrana característics que són el CD34, HLA-DR, juntament amb CD38 i CD33. Posteriorment es produeix la diferenciació cap a precursors mieloides. La majoria de cèl·lules de la medul·la òssia són cèl·lules precursors, i al voltant del 90% són precursors mieloides, els quals ja presenten trets morfològics específics que ajuden a la seva identificació i classificació. En aquest estadi també es donen gran quantitat de mitosis amb una gran ampliació de la població cel·lular. La diferenciació dels precursors mieloides va associada a la pèrdua de CD34 i a l'expressió d'antígens específics de sèrie i d'estadis més madurs¹.

Granulopoesi

La sèrie granulopoètica representa entre un 60-65% de les cèl·lules de la medul·la òssia. La granulopoesi engloba la maduració dels neutròfils, eosinòfils i basòfils a partir dels seus precursors. El mieloblast, al llarg de l'evolució cap a neutròfil madur presenta una sèrie de canvis morfològics: reducció de la relació nucli-citoplasma, maduració de la cromatina amb pèrdua dels nuclèols, reducció progressiva de la basofília citoplasmàtica, aparició de la granulació primària o atzuròfila i, per últim, aparició de la granulació secundària o específica (neutròfila, eosinòfila o basòfila). Així doncs, el mieloblast és la primera cèl·lula mieloide morfològicament identificable. Del mieloblast en deriva el promielòcit, la cèl·lula més gran en el procés evolutiu, la qual és basòfila amb arcoplasma perinuclear i nucli de cromatina laxa i nuclèol. En aquest estadi apareix la granulació primària on es localitza la mieloperoxidasa. Seguidament es forma el mielòcit, l'última cèl·lula amb capacitat de divisió. Aquest està desproveït de nuclèol, ha perdut la basofília i té ja granulació específica. La maduració progressa cap a metamielòcit on el nucli presenta forma reniforme. Aquest últim, va estretint-se cada vegada més fins a l'estadi de banda o caiat i, finalment, es produeix la segmentació nuclear, donant lloc als neutròfils segmentats o polimorfonuclears^{1,5}.

La maduració dels eosinòfils i els basòfils segueix els mateixos passos de la maduració dels neutròfils fins a l'aparició dels grànuls específics.

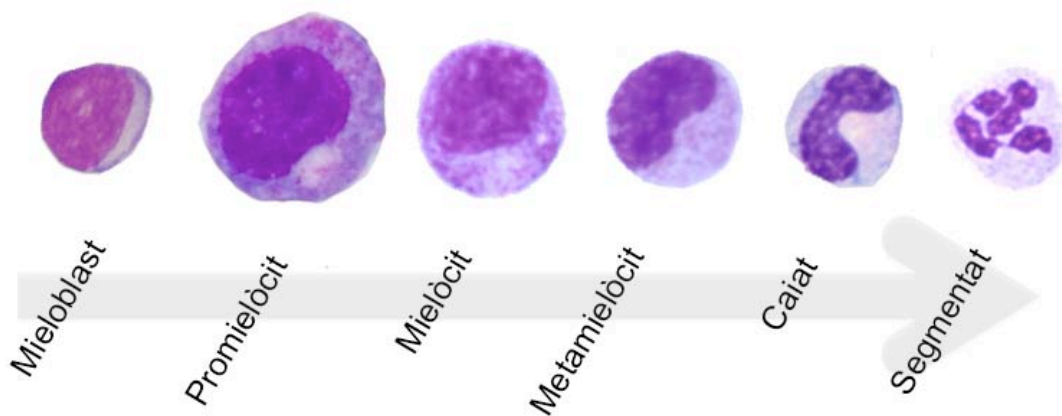


Figura 3. Esquema de la maduració granulopoètica normal

La sèrie granulopoètica neutròfila presenta una expressió intermèdia del marcador CD45, que ens permet distingir-la de la línia monocítica i limfoide. El precursor mioelode més immadur, el mieloblast, és indistingible fenotípicament del precursor monocític més immadur. Però presenta un patró fenotípic de maduració diferenciat al de la sèrie monocítica. Així doncs, els marcadors d'immaduresa inicials CD34 i HLA-DR desapareixen, i en l'estadi de promielòcit ja no s'expressen. El CD117 es manté en l'estadi de promielòcit deixant d'expressar-se en estadis posteriors. Aquest és l'estadi a partir del qual s'expressa CD15. El mielòcit adquireix l'expressió de CD11b i posteriorment expressa CD16. Aquests marcadors incrementen d'intensitat amb la maduració. Els marcadors CD33 i MPO s'expressen des dels progenitors i es mantenen amb la maduració cel·lular. L'expressió de CD13 és variable durant la maduració; s'observa alta intensitat d'expressió en mieloblasts i promielòcits, disminueix en els mielòcits i augmenta de nou fins a estar molt intensament expressat en el neutròfil madur⁸. Els neutròfils polisegmentats presenten CD10⁹.

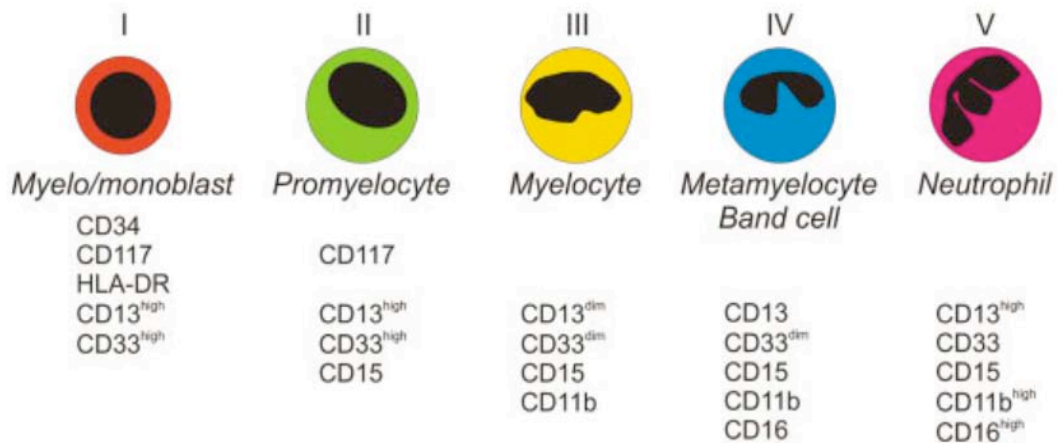


Figura 4. Esquema de la variació del patró d'expressió immunofenotípic en el desenvolupament granulopoètic normal (Modificat de Van Lochem i cols. 2004).

Monopoesi

El monòcit forma part del sistema mononuclear fagocític. La cèl·lula més immadura és el monoblast, difícilment identificable morfològicament. Aquest dóna pas al promonòcit, una cèl·lula de gran mida amb nucli de contorn irregular amb cromatina laxa i amb un o diversos nuclèols, i posteriorment, a monòcit que són les cèl·lules de més gran mida de la sang perifèrica. En aquest estadi el nucli és voluminós i molt irregular, la cromatina és lleugerament condensada, d'aspecte com pentinat i sense nuclèols. Aquest últim passa a la sang perifèrica i finalment es dirigeix als teixits on nia en forma d'histiòcit o de macròfag (si conté material fagocitat). Per tant, els estadis més madurs d'aquesta línia, presenten una morfologia i funció diferent depenent del teixit on s'ubiquen. Configuren les cèl·lules dendrítiques en quasi tots els teixits, les cèl·lules de Kupffer en el fetge, els macròfags dels alvèols pulmonars, els macròfags de les seroses, els osteoclasts de la medul·la òssia i la micròglia en el sistema nerviós central^{1,5}.

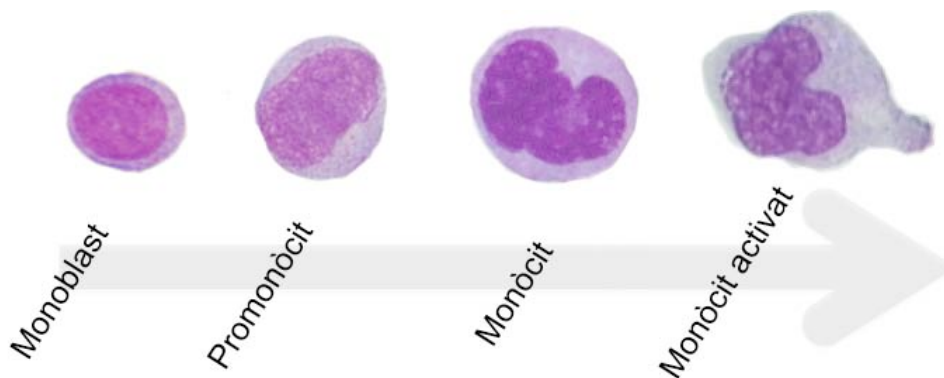


Figura 5. Esquema de la maduració de la sèrie monocítica normal

Pel que fa als marcadors fenotípics dels monòcits, cal destacar que expressen els marcadors mieloides MPO, CD13 i intensament el CD33. L'antigen HLA-DR es presenta als estats molt inicials del progenitor comú granulomonocitari, però només es manté en la maduració de la sèrie monocítica-macrofàgica. Els antígens més sostinguts i que es presenten des d'estadis més immadurs són el CD11b, CD11c, CD4, CD64 i la lisozima. El promonòcit expressa de forma intensa CD33 amb pèrdua de CD34 i CD117. En

aquest estadi i en el de monòcit s'expressa dèbilment CD15. En les fases més madures s'adquireix CD14 i, finalment, CD16 en el monòcit més madur^{1,8}.

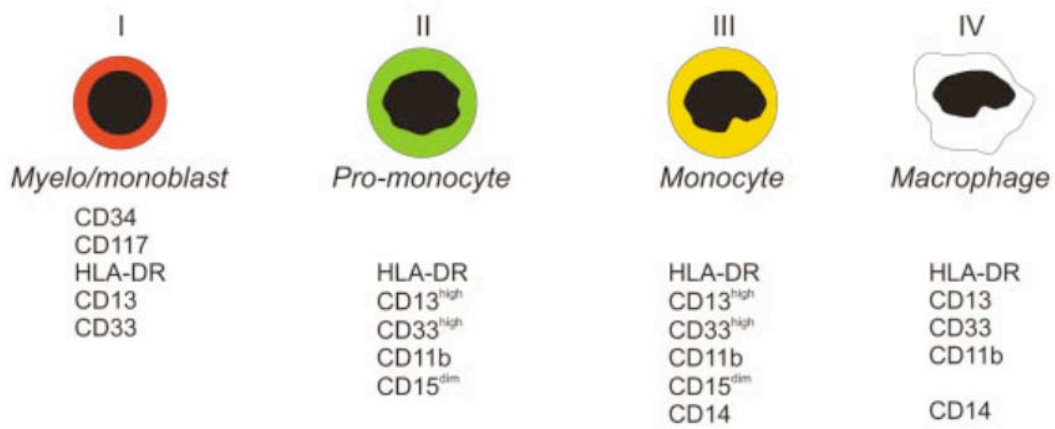


Figura 6. Patró d'expressió immunofenotípic del desenvolupament de la sèrie monocítica normal (Modificat de Van Lochem i cols. 2004).

Eritropoesi

En condicions normals els precursors eritroides representen entre un 30% i un 35% dels elements nucleats de la medul·la òssia. La sèrie eritroide al llarg de la seva maduració va perdent grandària i basofília, i degut a la condensació de la cromatina disminueix la relació nucli-citoplasma fins a l'extrusió del nucli. El procés s'inicia a partir de la maduració del progenitor eritroide cap a proeritroblast, el precursor més immadur, passant pels estadis d'eritroblast basòfil, eritroblast policromatòfil, eritroblast ortocromàtic, reticulòcit (després d'expulsar el nucli), i culmina en hematia o eritròcit. La vida mitjana d'un eritròcit és d'uns 120 dies en els humans^{1,5}.

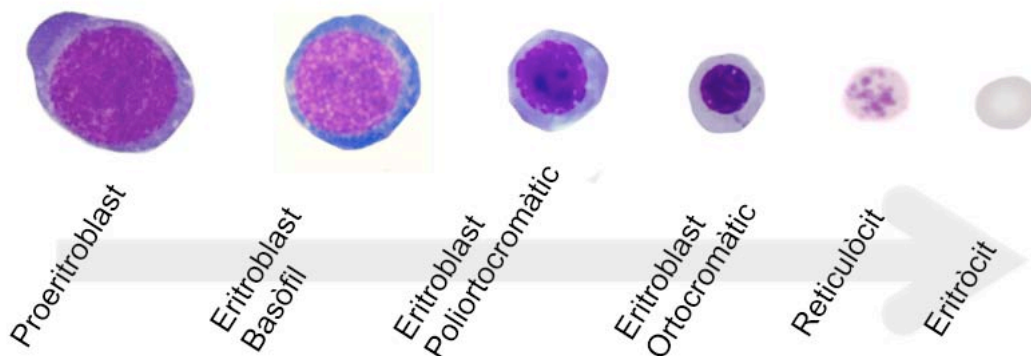


Figura 7. Esquema de la maduració eritroide normal

Pel que fa al fenotip, la sèrie eritroide es caracteritza per perdre gradualment l'expressió de CD45¹⁰. Aquest només s'expressa en el eritroblast més immadur el qual es reconeix per expressar també CD117, CD36 i CD71 (receptor de la transferrina). El CD36 i CD71 deixen d'expressar-se en el moment en que s'expulsa el nucli. La sèrie eritroide presenta des dels seus progenitors més immadurs glucoforina C, considerant-se un marcador de línia. L'expressió de glucoforina A (CD235a) s'adquireix en la fase d'eritroblast i es manté intensa fins a l'hematia⁸.

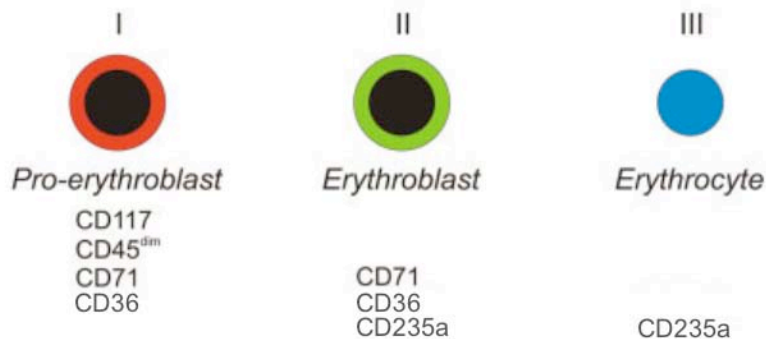


Figura 8. Esquema de la variació del patró d'expressió immunofenotípica en desenvolupament de la sèrie eritroblàstica normal (Modificat de Van Lochem i cols. 2004).

Megacariopoesi

La diferenciació megacariocítica es diferencia de la resta de les línies mieloides en què les diferents divisions nuclears de l'evolució madurativa no s'acompanyen de divisions citoplasmàtiques. Aquest procés s'anomena poliploidització. La cèl·lula precursora més immadura és el promegacarioblast, l'únic estadi evolutiu en que la sèrie megacariopoètica pot realitzar una mitosi completa. Seguidament ve el megacarioblast, la primera cèl·lula identificable morfològicament. Aquest és de mida petita, amb nucli únic o bilobulat de cromatina laxa amb un o diversos nuclèols, citoplasma basòfil i escàs, sense granulació i amb mamellons citoplasmàtics. L'estadi següent és el de promegacariòcit, element amb nucli polilobulat, cromatina condensada sense nuclèols, i amb citoplasma basòfil. A partir del promegacariòcit s'inicia la granulogènesi. Per últim, el megacariòcit madur és la cèl·lula més gran de la

línia i és l'estadi formador de plaquetes. Un 65% dels megacariòcits tenen una ploïdia 8N, tot i que és variable. El seu citoplasma ha perdut tota la basofília i està carregat de grànuls atzuròfils que s'agruparan en 10-12 unitats en la perifèria cel·lular mitjançant les membranes de demarcació. En les darreres etapes de la maduració es desprenen fragments citoplasmàtics plens de grànuls anomenats proplaquetes. Finalment, els grànuls delimitats per les membranes de demarcació es despendran donant lloc a les plaquetes o trombòcits^{1,5}.

Els progenitors megacariocítics comparteixen els marcadors fenotípics mieloides CD33 i CD13, junt amb els marcadors de línia CD61 i C41 que mantenen durant tota la maduració. A partir del promegacarioblast adquireix el marcador CD42 que també mantenen en la seva maduració. Sent, tots tres, marcadors de línia^{1,8}.

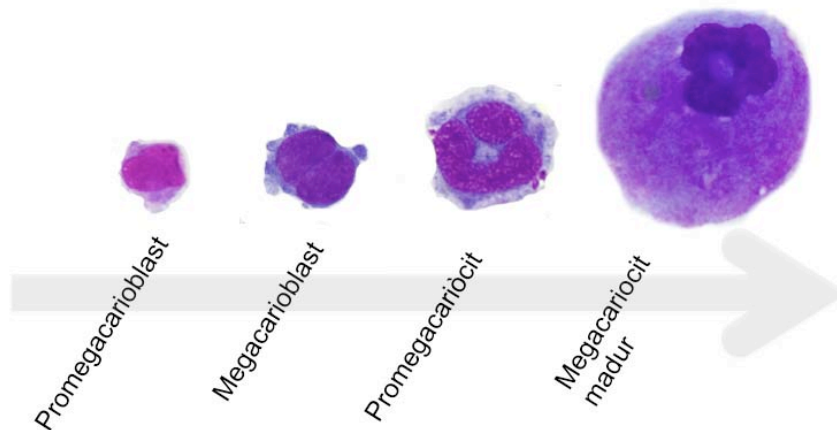


Figura 9. Esquema de la maduració de la sèrie megacariocítica normal

2. NEOPLASIES MIELOIDES

Les neoplàsies mieloides són expansions clonals de cèl·lules d'una o més línies mieloides que, segons l'Organització Mundial de la Salut (OMS), engloben les línies granulocítica (neutròfils, eosinòfils i basòfils), monocítica/macrofàgica, eritroide, megacariocítica i mastocítica¹¹. Les neoplàsies mieloides es donen quan precursors mieloides proliferen en excés. Si aquests precursors no maduren, donen lloc a leucèmies mieloides agudes.

Si els precursors mieloides maduren, i ho fan de manera efectiva, es produeixen les neoplàsies mieloproliferatives (NMP) i si en canvi, maduren ineficaçment, donen lloc a les síndromes mielodisplàsiques (SMD)¹. Tanmateix, algunes de les neoplàsies mieloides presenten característiques de les neoplàsies mieloproliferatives juntament amb altres pròpies de les síndromes mielodisplàsiques, classificant-se en un grup diferenciat en la classificació de l'OMS.

Classificació de les neoplàsies mieloides segons l'OMS¹²:

- Neoplàsies mieloproliferatives
- Neoplàsies mieloides/limfoides amb eosinofília i alteracions de *PDGFRA*, *PDGFRB* i *FGFR1*
- Neoplàsies mielodisplàsiques/ mieloproliferatives
- Síndromes mielodisplàsiques
- Leucèmies agudes mieloides

2.1 SÍNDROMES MIELODISPLÀSIQUES

Les síndromes mielodisplàsiques són un grup de neoplàsies clonals de la cèl·lula mare hematopoètica que es caracteritzen per una mielopoesi ineficaç, presentant displàsia en una o més de les línies mieloides, una medul·la òssia (MO) normo o hipercl·lular, una elevada apoptosi intramedul·lar, que és la responsable principal de l'aparició de citopènies progressives a sang perifèrica (SP)^{12,13}.

Aquestes neoplàsies tenen un curs clínic variable i un risc incrementat de transformació a leucèmia aguda mioide (LAM)¹².

2.1.1 Epidemiologia

Les SMD són les neoplàsies mieloides més freqüents en pacients d'edat avançada, amb una edat mitjana de presentació de 70 anys, sent neoplàsies rares en gent jove¹⁴. La seva incidència s'ha estimat entre 3 i 4 casos per cada 100000 habitants a Europa^{15,16} i als Estats Units d'Amèrica¹⁷. De la mateixa manera, un estudi, recentment realitzat a la província de Girona, ha observat una incidència similar a altres territoris europeus (3,3/100000 habitants)¹⁸.

Aquesta incidència s'incrementa considerablement amb l'edat, observant-se més de 75 casos per cada 100000 persones en la població de més de 65 anys¹⁹. La incidència d'aquestes malalties també varia segons el sexe amb una predominança dues vegades superior en homes que en dones¹⁷.

2.1.2 Etiologia i patogènia

Només el 20% dels casos de SMD són secundaris a tractament citotòxic previ. El 80% restant són esporàdiques o no es coneix específicament l'agent etiològic causant¹². Tot i així, les exposicions a benzè o altres dissolvents, radiacions ionitzants, tints pel cabell, agents químics utilitzats en l'agricultura com ara fertilitzants, herbicides i pesticides, i els hàbits tòxics com el tabaquisme, s'han descrit com a factors que predisposen al desenvolupament d'una SMD²⁰. Per altra banda, altres factors de risc a tenir en compte són els antecedents familiars de neoplàsies hematològiques²⁰, i algunes malalties hereditàries com ara la síndrome de Down, la disqueratosi congènita, la síndrome de Shwachmann-Diamond, la síndrome de Diamond-Blackfan i l'anèmia de Fanconi entre altres^{12,21}. El risc de desenvolupar una SMD o una LAM en un pacient amb una d'aquestes malalties va del 2 al 40% al llarg de la vida²².

Es considera que el desenvolupament d'una SMD és un procés esglaonat, on diverses alteracions oncogèniques progressives produeixen una proliferació cel·lular augmentada amb una maduració conservada però ineficient i una apoptosi intramedul·lar excessiva²³, on el micro-ambient juga un rol important²⁴⁻²⁶.

Així doncs, les troballes que s'han relacionat amb la patogènia d'aquestes neoplàsies són les següents: alteracions en els mecanismes d'apoptosi cel·lular^{13,27-29}, anomalies cromosòmiques específiques recurrents^{30,31}, la presència de disomies uniparentals^{32,33}, alteracions en la biosíntesi ribosomal^{34,35}, mutacions en gens implicats en la proliferació cel·lular^{36,37}, mutacions en gens que produeixen alteracions epigenètiques com modificacions en la metilació de regions promotores de gens^{38,39} i variacions en histones^{40,41}, canvis en microRNAs⁴², disfuncions telomèriques⁴³, alteracions o mutacions de gens que controlen el *splicing* cel·lular⁴⁴⁻⁴⁸, la desregulació de la immunitat i la inflamació^{49,50}.

Algunes d'aquestes alteracions poden presentar-se en persones sanes, sent insuficients per desenvolupar la malaltia. En un treball recent, Steeman et al. proposen el nom de CHIP (*Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential* o hematopoesi clonal de potencial indeterminat) per definir aquests casos, i expliquen que aquestes mutacions poden no tenir conseqüències per a l'hematopoesi normal, però, en canvi, poden conferir avantatge en la supervivència de la clona. Posteriorment, amb l'adquisició de noves alteracions, es pot produir l'expansió de la clona i el fenotip patològic que condueix a la SMD i, en alguns casos, l'evolució a LAM⁵¹.

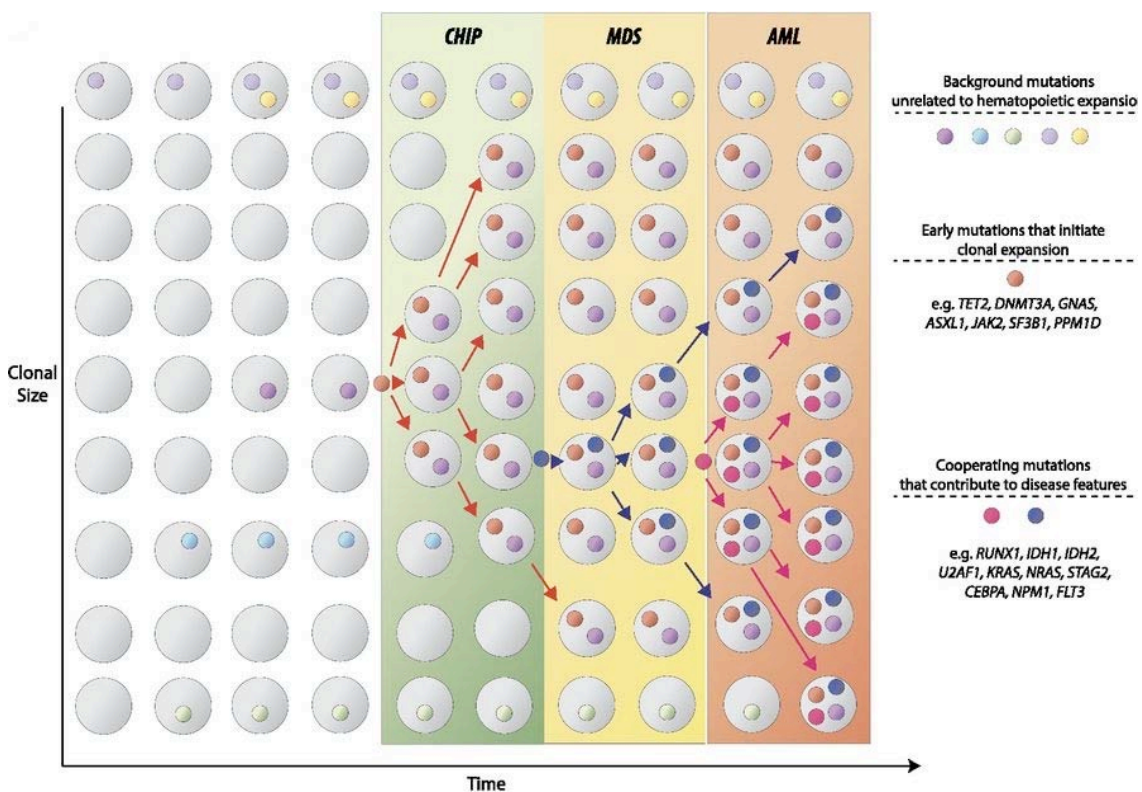


Figura 10. Esquema de l'evolució clonal des de l'hematopoesi normal a síndrome mielodisplàsica o leucèmia aguda mieloide. (Steensma i cols. 2015)

2.1.3 Diagnòstic

Les SMD són un grup de neoplàsies mieloides que es caracteritzen per un moll d'os normo o hipercl·lular, una o diverses citopènies a SP i displàsia en com a mínim una de les línies mieloides: eritropoètica, granulopoètica i megacariocítica. Aquesta definició es van establir inicialment pel *French-American-British Leukaemia Co-operative Group* (FAB) amb posteriors

modificacions per part de l'OMS^{12,52}. En l'any 2007 Valent et al. van publicar una proposta consensuada per part d'un grup d'experts dels criteris mínims per al diagnòstic de les SMD. Aquesta proposta es basava en 2 prerequisits: la presència de com a mínim una citopènia marcada (hemoglobina <11g/dL, un recompte de neutròfils absoluts de <1.5x10⁹/L i una xifra de plaquetes <100x10⁹/L) durant 6 mesos o més, i l'exclusió de causes secundàries de displàsia o citopènies, així com d'algunes malalties que poden tenir troballes comunes (Taula 1). A més a més, com a mínim, un dels següents criteris decisius havien de complir-se: displàsia en més del 10% dels elements d'una o diverses de les sèries mieloides, la presència d'alteracions citogenètiques recurrents i la presència d'entre un 5 i un 19% de cèl·lules blàstiques. En absència de criteris decisius, la demostració de clonalitat o bé la disminució de la formació de colònies en cultius cel·lulars es consideraven altament suggestives de SMD⁵³.

TAULA 1. DIAGNÒSTIC DIFERENCIAL DE LES SMD ^{1,12,54}
Dèficit de ferro, carença i/o factors de maduració (Vitamina B12 i àcid fòlic)
Alcoholisme
Cirrosi hepàtica
Insuficiència renal
Anèmia de processos crònics
Citopènies autoimmunes
Infeccions: virus (VIH, VHC, VHB, parvovirus B19, CMV) i paludisme
Exposició a tòxics (benzol, plom, arsènic, pesticides, productes químics, etc.)
Tractament amb quimioteràpia o radioteràpia
Administració d'eritropoetina, factor de creixement granulopoètic o anàlegs de la trombopoetina
Fàrmacs (cotrimoxazol, immunosupressors, etc.)
Trastorns hematològics congènits
Anèmia aplàsica
HPN

SMD: Síndromes mielodisplàsiques; VIH: virus immunodeficiència humana; VHC: virus hepatitis C; VHB: virus hepatitis B; CMV: citomegalovirus; HPN: hemoglobinúria paroxística nocturna

L'OMS, l'any 2008, va establir els criteris que regeixen actualment pel diagnòstic de les SMD. Aquests es basen en descartar, inicialment, causes secundàries de citopènies i mielodisplàsia i, posteriorment, en la troballa de displàsia en com a mínim el 10% de les cèl·lules d'una o més de les línies mieloides del moll de l'os i/o increment del recompte de blasts (>1% a SP i >5% a MO). En la taula 2 es citen les alteracions morfològiques considerades constitutives de displàsia. La mielodisplàsia es pot acompanyar per un increment en el nombre de mieloblasts fins a un màxim de 19% (a diferència de la FAB, un recompte de ≥20% mieloblasts es considera LAM)¹².

TAULA 2. ALTERACIONS MORFOLÒGIQUES QUE ES CONSIDEREN CONSTITUTIVES DE DISPLÀSIA^{1,12,54}

Diseritropoesi	Disgranulopoesi	Dismegacariocitopoesi
<ul style="list-style-type: none"> · Ponts internuclears · Irregularitats nuclears · Cariorrexi · Multinuclearitat · Canvis megaloblàstics · Mitosis anòmales · Cossos de <i>Höwell-Jolly</i> · Puntejat basòfil · Distribució anòmala de Hb · Sideroblasts en anell (en la tinció de Perls) · Vacuolització · PAS positivitats 	<ul style="list-style-type: none"> · Macroцитosi o gigantisme · Hipersegmentació nuclear · Hiposegmentació nuclear (<i>pseudo Pelger-Huet</i>) · Nucli en anell · Nucli en mirall · Hipercondensació cromatínica (<i>clumping</i>) · Apèndix nuclears · Butxaques nuclears · Granulació gegant (<i>pseudo-Chediak-Higashi</i>) · Hipo/agranularitat · Bastons d'Auer · Cossos de Döhle · Hiposegmentació + hipogranulació 	<ul style="list-style-type: none"> · Nuclis dispersos · Elements bilobulats · Elements monolobulats · Micromegacariòcits

Hb: hemoglobina; PAS: àcid periòdic de *Schiff*

Si els criteris morfològics són poc concloents, es pot realitzar el diagnòstic de SMD amb la troballa d'alguna de les alteracions citogenètiques recurrents que es mostren en la taula 3. Excepte, la trisomia 8, la del(20q), i la pèrdua del

cromosoma Y detectades com a alteració única. Aquestes alteracions, tot i ser alteracions citogenètiques freqüents en les SMD, no s'inclouen com a presumptives de SMD en absència de criteris morfològics concloents.

Alteracions no balancejades	Alteracions balancejades
-5 o del(5q)	t(11;16)(q23;p13.3)
-7 o del(7q)	t(3;21)(q26.2;q22.1)
+8	t(1;3)(p36.3;q21.2)
del(20q)	t(2;11)(p21;q23)
-Y	inv(3)(q21q26.2)
i(17q) o t(17p)	t(6;9)(p23;q34)
-13 o del(13q)	
del(11q)	
del(12p) o t(17p)	
del(9q)	
idic(X)(q13)	

En vermell: Alteracions no diagnòstiques de SMD en absència de criteris morfològics concloents

SMD: Síndromes mielodisplàsiques.

A diferència de la proposta de Valent et al. publicada l'any 2007, en els criteris diagnòstics actuals de la OMS, els llindars per les citopènies s'estableixen amb una hemoglobina <10g/dL, un recompte de neutròfils absoluts de <1.8x10⁹/L i una xifra de plaquetes <100x10⁹/L. Xifres per sobre d'aquests valors no són excloents de SMD en presència d'altres criteris concloents. Així mateix, la presència de citopènies sense altres troballes no és suficient per al diagnòstic de SMD. Aquests casos reben el nom de ICUS (citopènia idiopàtica de significat incert)^{11,12}.

L'any 2012, el Grup Espanyol de Síndromes Mielodisplàsiques (GESMD) va elaborar unes guies consensuades per al diagnòstic de les SMD⁵⁴. En concordança amb els criteris de l'OMS 2008, en aquestes guies especifica que per un correcte diagnòstic de les SMD és imprescindible conèixer els antecedents personals del pacient, les dades clíniques i analítiques, i la realització de l'anàlisi morfològic i l'estudi genètic de la medul·la òssia. La determinació d'alteracions moleculars i l'estudi immunofenotípic no es consideren essencials pel diagnòstic de les SMD (Taula 4).

TAULA 4. TÈCNiques DIAGNÒSTIQUES DE LES SMD I EL SEU GRAU DE RECOMANACIÓ SEGONS DELS GUIES ESPANYOLES DE DIAGNÒSTIC I TRACTAMENT DE LES SMD ⁵⁴ .	
Frotis de sang perifèrica (sense anticoagulant)	Imprescindible
Analítica completa (perfil estudi d'anèmia)	Imprescindible
Punció aspirativa medul·lar <ul style="list-style-type: none"> • Estudi morfològic • Estudi citogenètic • Citometria de flux 	Imprescindible Imprescindible Pot ser útil en el seguiment de la malaltia mínima residual en casos candidats a alo-TPH
Biòpsia òssia	Imprescindible en casos seleccionats (sospita de fibrosi, punció aspirativa seca o ICUS)
FISH, SNP/CGH arrays	Recomanats en casos amb estudi citogenètic poc informatiu
Biologia molecular	Recomanat en casos molt seleccionats (estudis de clonalitat en ICUS, mutació del gen <i>JAK2</i> en casos amb trombocitosi, i determinació dels reordenaments de <i>PDGFRA</i> i <i>PDGFRB</i> i anomalies del gen <i>FGFR1</i> en casos amb eosinofília)

SMD: Síndromes mielodisplàsiques; TPH: Transplant de progenitors hematopoètics; ICUS: citopènia idiopàtica de significat incert; FISH: Hibridació *in situ* fluorescent; SNP: Polimorfismes d'un únic nucleòtid; CGH: hibridació genòmica comparada

Les mutacions gèniques descrites actualment no són específiques de les SMD, es poden trobar en altres tipus de neoplàsies⁵⁵, i algunes, fins i tot, s'han descrit en persones sanes en forma de CHIP^{56,57}. Així doncs, donat a la possibilitat de la troballa d'aquestes alteracions en gent sana i per la dificultat d'accés per majoria d'hospitals a la tecnologia necessària per la seva anàlisi, actualment no són aplicables de forma rutinària en el diagnòstic de les SMD^{37,58,59}. No obstant, s'ha demostrat que alguns d'aquests marcadors genètics tenen un valor

pronòstic, i possiblement, en un futur, s'utilitzaran com indicadors de necessitat d'iniciar tractament en pacients amb aquestes mutacions^{37,58-61}.

Actualment, els estudis moleculars que es realitzen de rutina van dirigits a excloure mutacions més específiques d'altres neoplàsies hematològiques, com s'especifica en la taula 4.

2.1.3.1 Punció aspirativa de medul·la òssia

Es una tècnica senzilla que es sol practicar sobre l'estèrnium o en la cresta ilíaca. Altres estructures òssies també poden punxionar-se, però sempre sota control radiològic. El material aspirat es pot sotmetre a diferents procediments amb finalitat diagnòstica com són la realització de frotis per tinció panòptica i valoració morfològica, cultius cel·lulars, tècniques immunofenotípiques, tècniques de microscopia electrònica, estudis citogenètics i estudis moleculars¹. Per al diagnòstic de les SMD, la punció aspirativa de medul·la òssia és imprescindible, així com la realització de l'estudi morfològic i citogenètic que es realitza amb el material medul·lar⁵⁴.

Les recomanacions per un estudi citològic correcte davant la sospita d'una SMD són realitzar, en preparacions tenyides amb May-Grünwald-Giemsa i sense anticoagulant, un recompte diferencial de 200 leucòcits en el frotis de sang perifèrica i de 500 cèl·lules nucleades en l'extensió del moll d'os. La determinació del percentatge de displàsia en les sèries eritroide, granulocítica i megacariocítica s'ha de realitzar en el moll de l'os, valorant uns 200 elements en les dues primeres i un mínim de 30 elements en la sèrie megacariocítica. Una línia es considera displàsica si presenta, en la medul·la òssia, dismòrfies en el 10% o més dels seus elements. La valoració dels dipòsits de ferro medul·lar mitjançant la tinció de *Perls* permet avaluar la presència de sideroacrèstia (dipòsits de ferro intra mitocondrial) i el comptatge de sideroblasts en anell i descartar ferropènia o bloqueig macrofàgic del ferro^{12,54}. L'estudi citogenètic de medul·la òssia és imprescindible en els casos de sospita de SMD.

2.1.3.2 Biòpsia òssia

La biòpsia òssia és una tècnica exploratòria d'alta rendibilitat diagnòstica i que complementa a la punció aspirativa en l'anàlisi de la medul·la òssia. La biòpsia òssia es realitza normalment en la cresta ilíaca. La mostra d'os és utilitzada per la realització d'estudis morfològics, immunohistoquímics, genètics i moleculars¹. Els estudis morfològics de talls histològics del cilindre ossi ens informaran, sobretot, de la cel·lularitat de la mostra i la presència de fibrosi medul·lar. Malauradament, aquesta tècnica té un escàs rendiment pel que fa al reconeixement cel·lular i a la valoració dels trets morfològics de dishemopoesi¹. Així doncs, en l'estudi diagnòstic de les SMD la biòpsia òssia és una prova complementària, que està indicada davant la sospita de fibrosi medul·lar, en puncions aspiratives medul·lars no productives (seques) o amb poca cel·lularitat i en els casos de citopènia idiopàtica de significat incert (ICUS)⁵⁴.

2.1.3.3 Tècniques d'anàlisi genòmic

2.1.3.3.1 Citogenètica Convencional

És la tècnica citogenètica que permet l'anàlisi de l'estructura dels cromosomes. Les cèl·lules a estudi es cultiven amb el mitogen adient i, després de sotmetre-les a una digestió enzimàtica, es realitza l'extensió sobre un portaobjectes i es tenyeix amb un colorant adequat. La lectura del cariotip es realitza en cèl·lules en metafase, analitzant no solament el nombre de cromosomes existents, sinó també el bandeig de cadascun d'ells per determinar-ne l'estructura. En l'anàlisi de bandes G es realitza una tinció específica, obtenint una alta resolució de bandes fosques i clares. Les bandes clares contenen gran quantitat de gens, i les bandes fosques (bandes G), corresponen a zones pobres en gens. Amb l'anàlisi microscòpic del cariotip amb bandes G es procedeix a la recerca d'alteracions numèriques i estructurals cromosòmiques.

Com hem dit anteriorment l'estudi del cariotip en les SMD esdevé una anàlisi indispensable pel diagnòstic d'aquestes neoplàsies. La troballa d'alteracions estructurals específiques són concloents de mielodisplàsia, i cadascuna d'elles té un impacte pronòstic concret. Així doncs, les Guies Espanyoles de diagnòstic i tractament de les SMD, aconsellen que l'anàlisi cromosòmic es

realitzi mitjançant l'anàlisi de bandes G, avaluant com a mínim 20 metafases. Tot i així, una xifra inferior de metafases serà considerada informativa si es detecta una anomalia de caràcter clonal⁵⁴. D'acord amb *International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN)*, si s'observa el mateix guany o la mateixa alteració estructural en dues metafases o la pèrdua del mateix cromosoma en com a mínim tres, és quan l'alteració es considerarà clonal⁶². En els casos on no és possible l'anàlisi convencional del cariotip es recomana completar-lo mitjançant altres tècniques de citogenètica com la FISH o els SNP/CGH arrays.

2.1.3.3.2 Hibridació *in situ* fluorescent (FISH)

L'hibridació *in situ* fluorescent permet determinar la presència o alteració de seqüències concretes en l'àcid desoxiribonucleic (ADN) a estudi. A diferència de la citogenètica convencional, aquesta tècnica permet analitzar tant cèl·lules en metafase com nuclis en interfase, podent-la aplicar en extensions cel·lulars i també talls de teixit sòlid⁶³. És una tècnica que es basa en la capacitat de l'ADN de desnaturalitzar-se amb l'elevació de la temperatura (70-80°), mitjançant el trencament de ponts d'hidrogen que es troben entre les seves dues cadenes. L'hibridació es basa en la unió de seqüències de nucleòtids marcades amb fluorocroms (sondes), que hem aplicat a la mostra, a la seves zones complementàries específiques de l'ADN desnaturalitzat. Finalment, s'avaluen els senyals dels fluorocroms de les sondes unides a l'ADN, mitjançant un microscopi de fluorescència⁶³. Aquesta tècnica permet la detecció alteracions numèriques i estructurals dels cromosomes així com definir cromosomes marcadors.

Segons les Guies Espanyoles de diagnòstic i tractament de les SMD, l'aplicació d'aquesta tècnica és molt recomanable en aquells casos en què no es disposi d'un estudi del cariotip o en pacients amb cariotip normal però que no s'ha pogut realitzar l'anàlisi de com a mínim 20 metafases. Les sondes que s'han recomanat aplicar en aquests casos són la de 5q i la de 7q, per la seva implicació pronòstica⁵⁴.

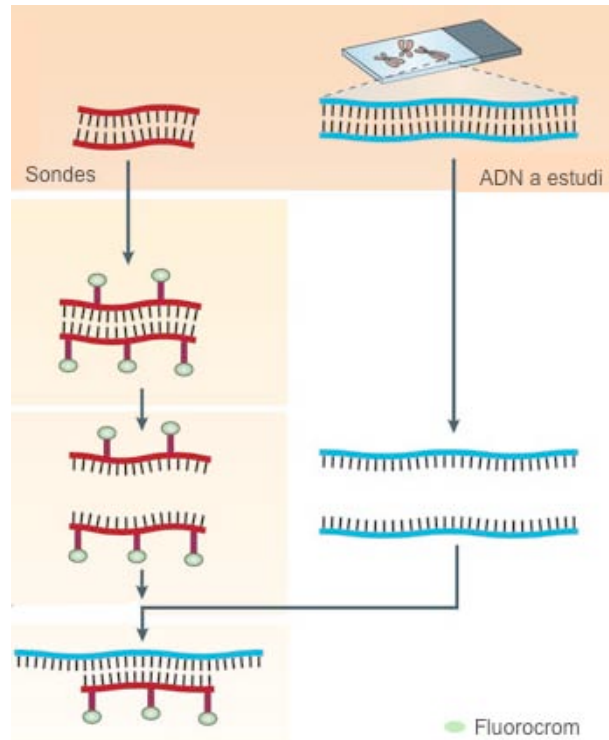


Figura 11. Esquema de procediment de la tècnica de Hibridació *in situ* Fluorescent (Modificat de Speicher i Carter. 2005).

2.1.3.3.3 *Microarrays* genòmics

Els *microarrays* d'ADN genòmic consisteixen en una matriu sòlida en el que s'hi troben fixades milions de seqüències d'ADN normal (sondes). Sobre aquesta matriu s'aplica a l'ADN a estudi marcat amb fluorocrom i es realitza la hibridació de totes les sondes en un sol procediment. Existeixen dos tipus de *microarrays* genòmics, els *microarrays* de CGH (*comparative genomic hybridization*) i els *microarrays* de SNP (*single nucleotide polymorfism*). Els *microarrays* de CGH es basen en la cohibridació *in situ* de ADN tumoral i ADN control, cadascun marcat amb un fluorocrom diferent, i es realitza una comparació de la intensitat de fluorescència entre els dos. Els *microarrays* de SNP són una variant dels anteriors. En aquests la hibridació de l'ADN no és competitiva, ja que s'utilitzen dues matrius, en una s'aplica l'ADN patològic i en l'altre l'ADN control. Amb aquesta tècnica s'analitza el nombre de còpies (guanys i pèrdues) de material genètic i canvis en un únic nucleòtid. És, per tant, una tècnica que permet detectar disomies uniparentals adquirides (pèrdues d'heterozigocitat entre els dos al·lels d'un mateix gen, per pèrdua del al·lel matern o patern d'un gen i posterior reemplaçament per ADN idèntic al al·lel homònim)⁶⁴⁻⁶⁶.

Els *microarrays* de SNP han demostrat la capacitat de detectar alteracions no objectivades per citogenètica convencional en el 30% dels casos de SMD⁶⁷. L'inconvenient d'aquestes tècniques és que no estan a l'abast de la majoria dels laboratoris. Així doncs, les Guies espanyoles de diagnòstic i tractament de les SMD consideren una prova recomanable en aquells laboratoris on es pugui realitzar, en substitució de la tècnica de FISH⁵⁴.

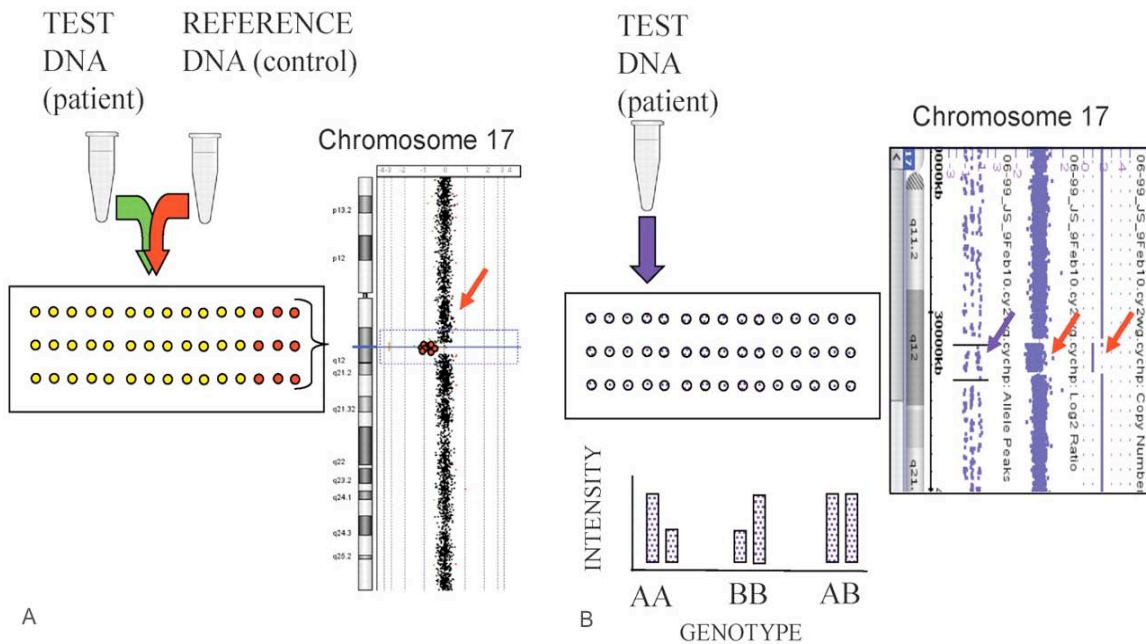


Figura 12. Esquema de l'anàlisi mitjançant *microarray* de CGH (A) i *microarray* de SNP (B). (Rajcan-Separovic i cols. 2012)⁶⁸.

2.1.3.3.4 Tècniques moleculars

Actualment, la detecció de mutacions puntuals en les SMD únicament defineixen clonalitat. Recentment s'han relacionat algunes d'aquestes mutacions amb el pronòstic dels pacients amb SMD que les presenten^{51,58}. Inicialment, els gels d'agarosa dissenyats per a la detecció de diferents llargades de fragments d'ADN mitjançant electroforesi, constituïen la forma bàsica de detecció d'alteracions moleculars. Posteriorment, el desenvolupament de la tècnica de reacció en cadena de la polimerasa (PCR) va permetre la detecció de mutacions puntuals específiques. Aquesta tècnica es basa en l'addició de nucleòtids marcats complementaris a les hebrees d'ADN, mitjançant la ADN polimerasa. En l'actualitat s'estan implementant noves tècniques de seqüenciació d'ADN que es basen en el mètode *Sanger*⁶⁹.

Aquest mètode es fonamenta en la detecció de la seqüència d'ADN mitjançant PCR, utilitzant encebadors marcats radioactivament i nucleòtids modificats que produeixen la parada de la reacció en cadena de síntesi d'ADN en el moment de la seva incorporació. A partir d'aquí, es produeixen diferents cadenes de diferents llargades i s'analitza la seva longitud mitjançant un gel d'electroforesi, podent després determinar l'ordre de cada fragment segons la llargada de cadascun d'ells. El marcatge d'aquest últim nucleòtid i de cadascun dels fragments, permet determinar la seqüència de nucleòtids d'una cadena d'ADN⁷⁰. Amb aquestes tècniques es permet detectar totes les mutacions del fragment d'ADN analitzat, a diferència de la tècnica bàsica de PCR, on es detecta únicament la mutació a estudi.

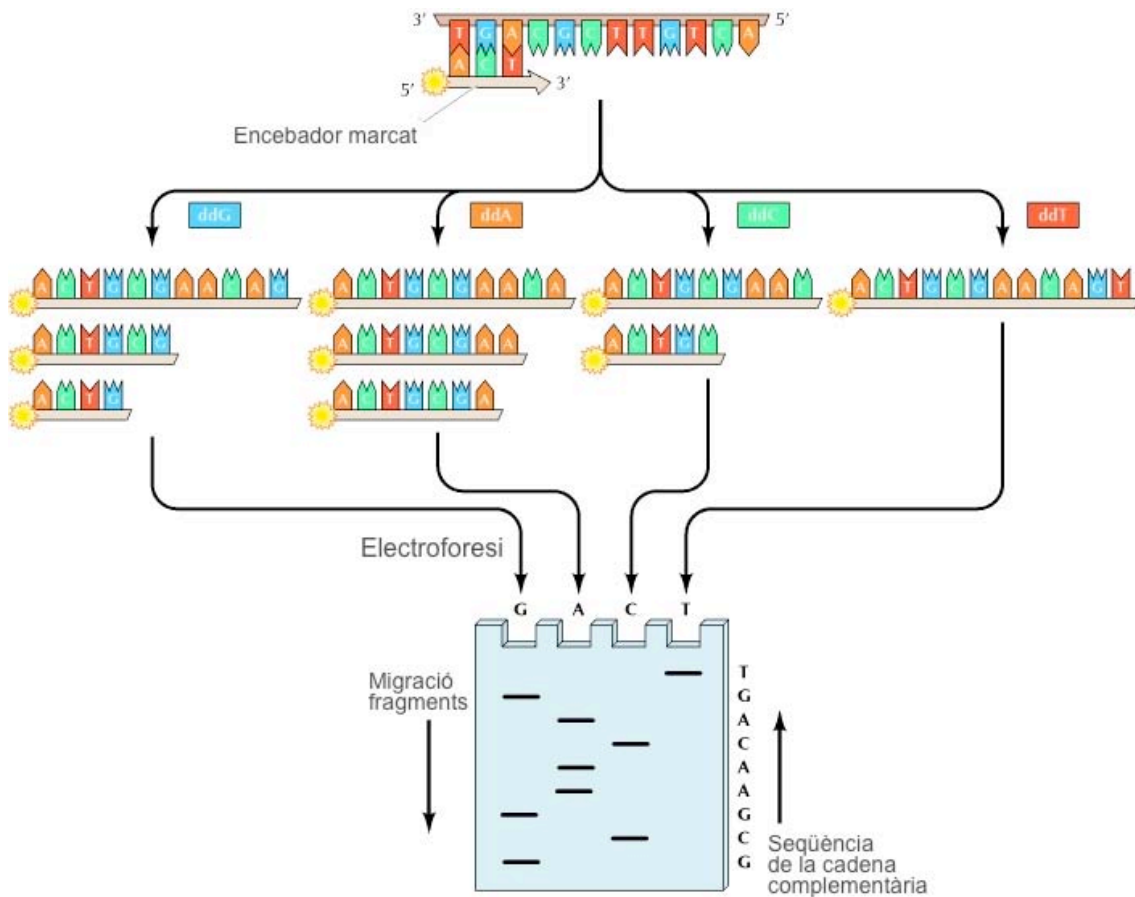


Figura 13. Esquema de la tècnica de seqüenciació de DNA mitjançant el mètode de Sanger (Cooper. 2000).

Actualment, existeixen noves tecnologies pel genotipatge de grans longituds de genoma anomenades *next-generation sequencing*. Aquestes permeten la seqüenciació massiva a gran escala, proporcionant informació del genoma sencer de forma ràpida i acurada⁷¹.

2.1.4 Classificació

La classificació inicial de les SMD va ser la realitzada a l'any 1982 pel grup cooperatiu FAB, que classificava les SMD en cinc categories basant-se en criteris analítics i morfològics. Les variables considerades eren la xifra de monòcits sanguinis, la presència de trets dismòrfics, el percentatge de blasts a SP i MO, la presència de bastons d'Auer, i el percentatge de sideroblasts en anell (Taula 5)⁵².

Els posteriors avenços en el coneixement de l'etiopatogènia d'aquestes neoplàsies i l'associació d'alteracions morfològiques concretes a alteracions citogenètiques i moleculars van posar de manifest la necessitat d'una nova classificació. Un 5-10% de les SMD no són classificables segons la classificació de la FAB¹. Per aquest motiu l'any 2001 va sorgir una nova proposta per part de l'OMS⁷², la qual es basava en les següents variables: la presència de citopènies, el percentatge de blasts a SP i MO, el percentatge de sideroblasts en anell, el nombre de línies displàsiques, la presència de bastons d'Auer i la presència de la del(5q) aïllada en l'estudi citogenètic. Aquesta classificació va ser revisada i modificada l'any 2008, sent actualment la més seguida per al diagnòstic i classificació de les SMD¹².

TAULA 5. CLASSIFICACIÓ DE LA FAB DE LES SMD ⁵²				
Subtipus	Blastes (%)		Monòcits SP	Sideroblastes en anell MO (%)
	SP	MO		
AR	<1	<5	<1x10 ⁹ /L	<15
ARSA	<1	<5	<1x10 ⁹ /L	≥15
AREB	<5	5-20	<1x10 ⁹ /L	Indiferent
AREB-T	≥5	21-30	<1x10 ⁹ /L	Indiferent
		+/- Bastons d'Auer		
LMMC	<5	0-20	≥1x10 ⁹ /L	Indiferent

SMD: Síndromes mielodisplàsiques; AR: anèmia refractària; ARSA: anèmia refractària sideroblàstica; AREB: anèmia refractària amb excés de blastes; AREB-T: anèmia refractària amb excés de blastes en transformació; LMMC: leucèmia mielomonocítica crònica; SP: sang perifèrica; MO: medul·la òssia.

Els canvis més significatius de la classificació de l'OMS versus la de la FAB són: la consideració de LAM davant la troballa d'un recompte de més d'un 20% de blasts i davant la presència de $t(8;21)(q22;q22)$, $inv(16)(p13q22)$, $t(16;16)(p13;q22)$ o $t(15;17)(q21;q22)$, l'exclusió de la leucèmia mielomonocítica crònica (LMMC) de la classificació de les SMD, i la consideració de neoplàsies relacionades amb el tractament aquelles SMD desenvolupades posteriorment a l'exposició a un tractament citotòxic (radioteràpia o quimioteràpia)^{11,12}.

Classificació de les SMD segons l'OMS 2008¹²

1- Citopènia refractària amb displàsia unilineal (CRDU)

Les CRDU suposen del 10-20% de totes les SMD, i inclou tots aquells casos que presenten una citopènia refractària o bicitopènia i la presència de displàsia en una única línia mieloide. La pancitopènia s'inclou dins de les SMD inclassificables¹¹. El recompte de blasts ha de ser inferior a l'1% a SP i 5% a MO, i el recompte de sideroblasts en anell inferior al 15%. S'inclouen doncs, l'anèmia refractària (AR) (casos amb anèmia i diseritropoesi), la neutropènia refractària (NR) (casos amb neutropènia i disgranulopoesi) i la trombocitopènia refractària (TR) (casos amb trombocitopènia i dismegacariopoesi). Tot i així, la discordança entre la citopènia i la línia displàsica també es pot presentar. La majoria dels casos són anèmies refractàries, sent rares les neutropènies i les trombocitopènies refractàries.

Les AR presenten alteracions citogenètiques en més del 50% dels casos i les més freqüents són la del(20q), la trisomia 8 i anomalies en els cromosomes 5 o 7. Presenten un curs clínic variable amb una mitjana de supervivència de 66 mesos i un 2% de les mateixes evolucionen a LAM als 5 anys⁷³.

2- Anèmia refractària amb sideroblasts en anell (ARSA)

L'ARSA representa entre el 3 a l'11% de les SMD. Es caracteritza per presentar anèmia, displàsia en la sèrie eritrocítica, comptatge de 15% o més sideroblasts en anell i absència de blasts (<1% en SP i <5% a MO). Tot i així, en alguns casos es pot observar també la presència de neutropènia i/o trombocitopènia. L'aspirat medul·lar sol presentar un increment important dels precursors

eritropoètics displàsics, amb sèries granulocítica i megacariopoètiques sense alteracions. És de destacar, dins dels trets de diseritropoesi, la presència de puntejat basòfil marcat junt amb una alteració en la distribució de l'hemoglobina com a troballa característica en aquesta entitat (*ghost cells*)^{1,74}. El moll de l'os sol ser hipercel·lular i acostumen a observar-se abundants mastòcits i sovint histiòcits blau-mari¹. La sobrecàrrega fèrrica medul·lar és típica, amb possibles dipòsits excessius de ferro també al fetge i a la melsa. La presència de sideroblasts en anell no és exclusiva de ARSA, es pot trobar també en altres subtipus de SMD i en situacions no neoplàsiques. S'han d'excloure d'aquest grup aquells casos que presenten una xifra de plaquetes superior a $450 \times 10^9/L$, classificant-se com a una entitat provisional dins del grup de neoplàsies mielodisplàsiques/ mieloproliferatives amb el nom d'anèmies refractàries amb sideroblasts en anell i trombocitosi (ARSA-T)⁷⁵.

Les alteracions cromosòmiques es troben entre el 5 al 20% dels casos, afectant típicament a un sol cromosoma. Una de les troballes moleculars recentment descrites és la mutació del gen *SF3B1*, implicat en el *splicing* cel·lular, la qual es troba entre el 68 i el 82% dels casos^{44,45,75,76} i és responsable, en part, del dipòsit del ferro en forma de grànuls d'hemosiderina en les mitocòndries, formant la imatge de sideroblasts en anell en la tinció de *Perls*^{45,77}. Aproximadament 1-2% dels casos de ARSA evolucionen a LAM. I la supervivència global d'aquestes SMD és de 69-108 mesos⁷³.

3- Citopènia refractària amb displàsia multilíneal (CRDM)

Aproximadament el 30% de les SMD es classifiquen en aquest grup, i es defineixen per ser aquelles SMD amb més d'una línia mieloide amb trets displàsics, menys d'1% de blasts a SP i menys de 5% de blasts a MO, independentment de si presenta una o diverses citopènies i del nombre de sideroblasts en anell. En les CRDM les alteracions citogenètiques es poden trobar en més del 50% dels casos. El 57-76% dels casos amb més de 15% de sideroblasts en anell presenten la mutació del gen *SF3B1*^{44,45}. En conjunt tenen un curs clínic variable, el pronòstic d'aquests pacients es relaciona amb la intensitat de la citopènia i de la dishemopoiesi. La freqüència de transformació a LAM al cap de 2 anys és del 10% i la mediana de supervivència és d'uns 30 mesos⁷³.

4- Anèmia refractària amb excés de blasts (AREB)

Les AREB representen al voltant del 40% dels casos de SMD. El seu diagnòstic es basa en la presència del 5 al 19% de blasts a MO o del 2 al 19% en SP. La presència de trets de dishemopoesi és sempre present però no implica canvis en la classificació. Es classifiquen en dos subgrups: AREB-1, si presenta 5-9% blasts a MO o 2-4% a SP, i en AREB-2, si presenta 10-19% de blasts a MO o 5-19% a SP. Es classifiquen també com a AREB-2 tots aquells casos de SMD que presenten bastons d'Auer, independentment del nombre de blasts.

Les alteracions citogenètiques es troben en aproximadament el 50% dels casos, sent el cariotip complex una troballa possible. Donat a l'increment de la xifra de blasts, aquest grup de SMD presenten una supervivència menor a la resta de grups i una evolució més freqüent a LAM. Així doncs, aproximadament el 22% dels casos de AREB-1 i el 40% dels casos de AREB-2 progressen a LAM, i la mediana de supervivència és de 16 mesos per les SMD tipus AREB-1 i de 9 mesos les AREB-2⁷³.

5- Síndrome mielodisplàsica amb del(5q) aïllada

L'any 1974 Van den Berghe et al. van descriure un tipus de SMD caracteritzada per presentar-se, majoritàriament, en dones amb edat superior a 50 anys en forma d'anèmia macrocítica, plaquetes normals o elevades, sèrie eritroide hipoplàsica, i menys de 5% de blasts en sang i medul·la òssia. Aquesta SMD presenta la deleció del braç llarg del cromosoma 5 pel que es va anomenar "Síndrome 5q-"⁷⁸. Segons la classificació de l'OMS del 2008 les "Síndromes 5q-" es troben incloses dins de les SMD amb del(5q) aïllada. Aquest grup de l'OMS es caracteritza per presentar la pèrdua del braç llarg del cromosoma 5 com a única alteració citogenètica (a excepció de la pèrdua del cromosoma Y) i sol presentar-se amb anèmia i amb o sense neutropènia. La trombocitosi és present en un 33-50% de les ocasions, sent rara la trombocitopènia. En aquest grup la xifra de blasts és inferior a 1% a SP i a 5% a MO i no s'observen bastons d'Auer. L'aspirat medul·lar sol ser molt cel·lular amb freqüent hipoplàsia de la sèrie roja i trets de dismegacariopoesi característics, amb

megacariòcits augmentats en nombre però de mida petita i amb nucli monolobulat. La displàsia en la resta de sèries mieloides és poc freqüent.

Recentment s'ha descrit com a possible patogènesi del defecte eritroide de les SMD amb del(5q) la pèrdua d'un dels al·lels del gen *RPS14*, ocasionant un defecte en una proteïna ribosomal⁷⁹. Aquesta disfunció ribosomal produeix una activació de la via de p53 amb acumulació nuclear d'aquesta proteïna de manera selectiva en les cèl·lules de la sèrie eritroide⁸⁰. L'apoptosi depenent de la proteïna p53 es troba implicada en la correcta maduració de la línia eritroide, explicant el possible defecte maduratiu d'aquesta en les SMD amb del(5q)^{80,81}. També s'ha reportat el mecanisme d'expansió clonal degut a l'activació de la β -catenina per haploinsuficiència del gen *CSNK1A1* en aquests pacients. L'activació de la β -catenina produeix una proliferació i posterior apoptosi intramedul·lar de les cèl·lules mare hematopoètiques⁸². Per altre banda, s'ha suggerit a partir de models animals, l'haploinsuficiència d'alguns microRNAs (miR-145 i miR-146a) com a origen de la freqüent trombocitosi observada en aquests pacients⁸³. S'han trobat, també, mutacions d'alguns gens, ja descrites en altres neoplàsies mieloides (*ASXL1*, *TET2*, *DNMT3A* i *JAK2*)⁸⁴.

Aquest grup de SMD tenen un relatiu bon pronòstic. Aproximadament el 18% d'aquests pacients evolucionen a LAM al cap de 5 anys del diagnòstic, amb una supervivència mitjana de 66 mesos⁸⁵. La morbiditat d'aquests pacients es deu a l'anèmia i la isquèmia tissular per falta de transport d'oxigen. Així doncs, la majoria dels pacients amb SMD amb del(5q) presenten dependència transfusional important i, com a conseqüència, sobrecàrrega fèrrica⁸⁶. El tractament amb Lenalidomida reverteix les alteracions morfològiques i citogenètiques, i redueix el requeriment transfusional en aquest grup de pacients⁸⁷.

6- Síndrome mielodisplàsica inclassificable

Aquest subgrup de SMD engloba aquells casos que no tenen criteris per classificar-se en cap dels altres grups. No tenen una morfologia específica, però es pot realitzar el diagnòstic de SMD inclassificable en els següents casos:

- Pacients amb trets de CRDU o CRDM però amb 1% de blasts a SP.
- Casos de displàsia unilineal amb pancitopènia a SP.
- Pacients amb citopènia persistent amb $\leq 1\%$ blasts a SP i $< 5\%$ a MO, presència de displàsia evident en una o diverses sèries mieloides però en menys del 10% dels elements, i amb alguna alteració citogenètica considerada com presumpta evidència de SMD (Taula 3).

TAULA 6. TAULA RESUM DE LA CLASSIFICACIÓ DE LES SMD (OMS 2008) ¹²					
Subtipus	Citopènies	Blastes (%)		Displàsia	Sideroblasts en anell (%)
		SP	MO		
CRDU (AR; NR; TR)	Uni o bicitopènia	<1	<5	Unilínia	<15
ARSA	Anèmia	0	<5	Eritroide	≥ 15
CRDM	Una o varies citopènies	<1	<5	≥ 2 línies	Indiferent
AREB-1	Una o varies citopènies	<5	5-9	Indiferent	Indiferent
AREB-2	Una o varies citopènies	5-19 +/- Bastons d'Auer	10-19 +/- Bastons d'Auer	Indiferent	Indiferent
SMD amb del(5q) aïllada	Anèmia	<1	<5	Megacariòcits amb nucli hipolobulat	Indiferent
SMD inclassificable	Bi o pancitopènia	≤ 1	<5	<10% en una o varies línies amb citogenètica presumptiva de SMD	

SMD: Síndromes mielodisplàsiques; CRDU: citopènia refractària amb displàsia unilínia; AR: anèmia refractària; NA: neutropènia refractària; TR: trombopènia refractària; ARSA: anèmia refractària amb sideroblàstica; CRDM: citopènia refractària amb displàsia multilínia; AREB: anèmia refractària amb excés de blastes; SP: sang perifèrica; MO: medul·la òssia

Formes especials de SMD

Algunes SMD presenten característiques clínic-biològiques que no s'han considerat com definitòries d'un subgrup concret dins de les classificacions esmentades prèviament, i que en canvi, tenen trets distintius. Aquests són:

- SMD hipoplàstics:

Conjunt de SMD que en comptes de manifestar-se amb un moll normo o hipercel·lular presenten des de l'inici hipocel·lularitat medul·lar (cel·lularitat de <30% en menors de 60 anys i <20% en majors de 60 anys). Representen el 10% de les SMD i tenen un predomini en el sexe femení. En aquests casos cal descartar causes secundàries d'hipoplàsia com són trastorns autoimmunes i mielopatia tòxica. Per altra banda, el diagnòstic diferencial amb l'aplàsia medul·lar pot ser molt difícil. S'ha suggerit que la hipocel·lularitat d'ambdues patologies pot tenir un origen comú⁸⁸. A més a més, les dues entitats presenten certa resposta al tractament immunosupressor^{89,90}.

- SMD amb mielofibrosi:

Al voltant del 17% de les SMD presenten mielofibrosi. Aquest grup de SMD sol presentar un elevat requeriment transfusional, associant-se a displàsia multilineal, trombocitopènia, citogenètica de mal pronòstic i a un nombre elevat de blasts. La fibrosi medul·lar en les SMD representa un factor de risc de molt mal pronòstic⁹¹. El diagnòstic diferencial principal que s'ha de realitzar és amb les neoplàsies mieloproliferatives en fase fibròtica. En els casos on hi ha més de 20% de blasts, ja considerats LAM, s'ha de descartar la LAM megacarioblàstica i la panmielosi amb mielofibrosi, que a diferència d'una LAM procedent d'un SMD amb mielofibrosi, aquestes dues entitats tenen un inici agut¹.

2.1.5 Pronòstic

Les SMD són un grup de neoplàsies clonals molt heterogeni, cosa que fa que també tinguin un pronòstic molt variable. A més a més, donat que la majoria es donen en pacients d'edat avançada, s'ha de tenir en compte les comorbiditats associades al malalt. Per tant, la determinació del grup pronòstic de cada cas facilita la decisió terapèutica i el maneig del pacient amb SMD⁵⁴. L'índex pronòstic més utilitzat fins ara ha estat el "*International Prognostic Scoring System (IPSS)*", representat en la taula 7. Aquesta estratificació dels pacients amb SMD es basa en les següents variables: el percentatge de blasts a MO, el tipus d'alteració citogenètica i el nombre de citopènies. Aconseguint assignar les SMD en quatre grups pronòstics diferents segons la supervivència global i el risc de transformació a LAM, segons l'assignació d'una sèrie de punts: baix risc (puntuació 0), risc intermedi 1 (puntuació 0,5-1), risc intermedi 2 (puntuació 1,5-2) i alt risc (puntuació 2,5-3,5) (Taula 7). En l'estudi realitzat al 1997, els grups presentaven una mitjana de supervivència de 5.7 anys, 3.5 anys, 1.2 anys i 0.4 anys respectivament³¹.

TAULA 7. ÍNDEX PRONÒSTIC INTERNACIONAL (IPSS) ³¹					
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			
<p>*Cariotip: Bo: normal, -Y, del(5q), del(20q) com alteracions úniques Dolent: complex (≥3 anomalies) o anomalies del cromosoma 7 Intermedi: altres anomalies úniques o dobles</p>					

MO: medul·la òssia

Posteriorment l'OMS l'any 2007, va proposar una nova estratificació pronòstica modificant l'anterior IPSS, on considerava la displàsia multilíneal i la dependència transfusional com a variables de mal pronòstic⁹². Tot i així, aquesta proposta no va demostrar predir millor la supervivència dels malalts amb SMD que l'IPSS.

TAULA 8. ÍNDEX PRONÒSTIC BASAT EN LA CLASSIFICACIÓ DE L'OMS (WPSS)				
Variables pronòstiques	0 punts	1 punt	2 punts	3 punts
Categoria de la OMS	AR, ARSA, "Síndrome 5q-"	CRDM, CRDM-SA	AREB-1	AREB-2
Cariotip*	Bo	Intermedi	Dolent	
Requeriment transfusional*	No	Regular		
<p>*Cariotip:</p> <p>Bo: normal, -Y, del(5q), del(20q) com alteracions úniques</p> <p>Dolent: complex (≥ 3 anomalies) o anomalies del cromosoma 7</p> <p>Intermedi: altres anomalies úniques o dobles</p>				

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

+Requeriments transfusionals: ≥ 1 transfusió cada 8 setmanes en un període de 4 mesos.

En els últims anys s'han realitzat diferents publicacions demostrant com altres variables tenen valor pronòstic en aquests pacients. Així doncs, la presència de fibrosi medul·lar moderada/greu s'ha referit com un factor de mal pronòstic tant en termes de supervivència global (SG) com d'evolució a LAM⁹¹. Un altre factor pronòstic que s'ha referit és el grau de certes citopènies en les SMD de baix risc, sent de molt mal pronòstic la xifra de plaquetes $<30 \times 10^9/L$ i la xifra de neutròfils $<0,5 \times 10^9/L$ ^{93,94}. La importància de la presència de certes alteracions citogenètiques en les SMD ja estava reconeguda, però l'IPSS resta limitat en l'estratificació del risc, ja que agrupa diverses alteracions citogenètiques dins el grup d'anomalies de risc citogenètic intermedi. Amb la intenció de millorar el poder predictiu d'aquestes alteracions, l'any 2012 es va realitzar un estudi cooperatiu a escala mundial amb 2902 pacients amb el qual estratificaven els pacients amb SMD en 19 categories de risc citogenètic, podent precisar millor el paper d'algunes anomalies no reconegudes en l'IPSS⁹⁵. Aquesta classificació ha sigut adoptada pel recentment publicat índex pronòstic per les SMD anomenat *Revised International Prognostic Scoring System* (IPSS-R)⁹⁶. Aquest segueix basant-se en les variables de l'IPSS. Les diferències són les següents: separa les alteracions citogenètiques en 5 grups pronòstics (molt bo, bo, intermedi, pobre i molt pobre) en comptes de 3, diferencia el percentatge de

blasts en MO en quatre (0 - 2%, >2 - <5%, 5 - 10% i >10%), dividint el valor de blasts <5% en dos, i no només comptabilitza el nombre de citopènies sinó també el grau de les mateixes. Amb aquestes variables estratifica els pacients en 5 grups de risc. Segons l'article de Greenberg et al. on es va publicar aquest nou índex pronòstic, l'IPSS-R inclou algunes noves variables en el mètode d'anàlisi del risc pronòstic de les SMD, sent més precís que l'IPSS.⁹⁷ A més a més, aquest índex reconeix el paper de l'edat com un factor influent en la SG però gens decisiu en l'evolució a LAM. Els grups de risc segons els punts atorgats són: molt baix risc (puntuació 0-1.5), baix risc (puntuació >1.5-3), risc intermedi (puntuació >3-4,5), alt risc (puntuació >4,5-6) i molt alt risc (puntuació >6) (Taula 9)

TAULA 9. ÍNDEX PRONÒSTIC INTERNACIONAL REVISAT (IPSS-R) ^{97,98}							
Variables pronòstiques	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 (%)	≤2		>2 i <5		5-10	>10	
Hb (g/dL)	≥10		≥8 i <10	<8			
PL (x10 ⁹ /L)	≥100	≥50 i <100	<50				
RAN (x10 ⁹ /L)	≥0.8	< 0.8					
<p>*Grup de risc citogenètic:</p> <p>Molt bo: -Y, del(11q) com alteracions úniques</p> <p>Bo: normal, -Y, del(5q), del(12p), del(20q) com alteracions úniques i alteracions dobles que incloguin del(5q)</p> <p>Intermedi: del(7q), +8, +19, i(17q) com a alteracions úniques i qualsevol altre clon independent amb una anomalia única o doble</p> <p>Dolent: -7, inv(3)/t(3q)/del(3q), dobles que incloguin -7/del(7q), complex amb 3 anomalies</p> <p>Molt dolent: complex amb >3 anomalies</p>							

MO: medul·la òssia; Hb: hemoglobina; PL: plaquetes; RAN: recompte absolut de neutròfils

Les anomalies moleculars no s'inclouen com a factors pronòstics en l'IPSS-R, tot i que, en els últims anys s'ha demostrat la influència d'algunes mutacions gèniques en el pronòstic de les SMD^{37,58-61}. S'ha descrit que al voltant del 90% de les SMD presenten mutacions somàtiques en algun gen, i que dues terceres parts es troben en casos de SMD sense alteracions citogenètiques⁶¹. Els gens mutats en més freqüència són *TET2*, *SF3B1*, *AXL1*, *SRSF2*, *DNMT3A* i *RUNX1*^{37,59} (Figura 14).

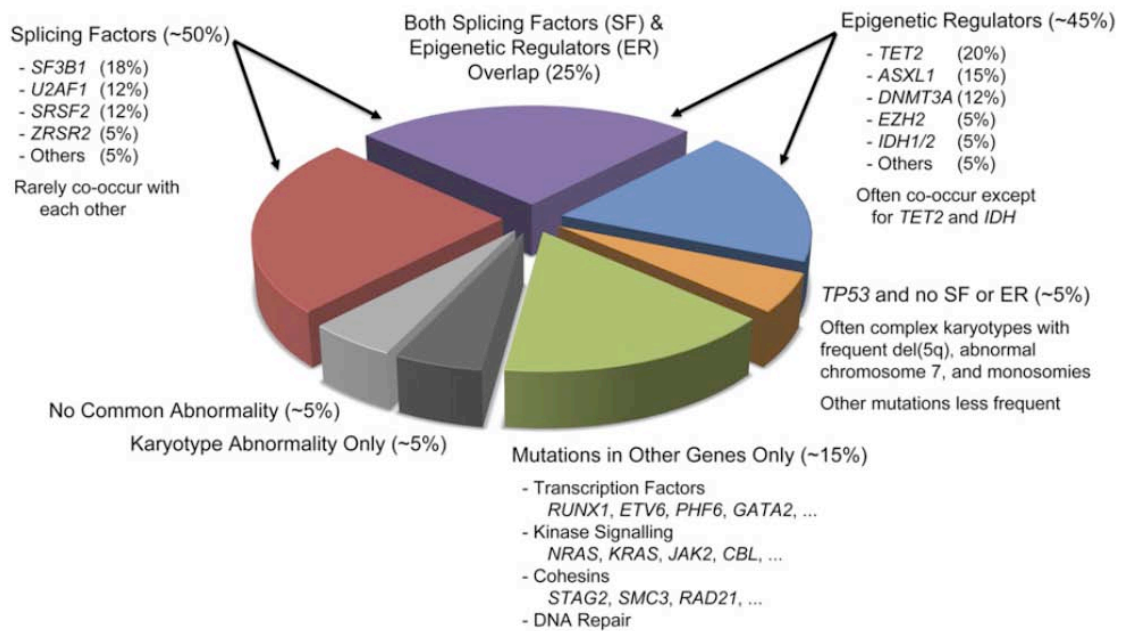


Figura 14. Distribució estimada del valor percentual de les mutacions recurrents i les anomalies citogenètiques en les SMD a partir de les dades dels estudis de Bejar et al. 2011, Papaemmanuil et al 2013 i Haferlach et al 2014 (Bejar i cols. 2014).

Les mutacions de *AXL1*, *DNMT3A*, *SRSF2*, *EZH2* i *RUNX1* s'associen a mal pronòstic^{37,39,41,58}. La mutació del gen TP53 és menys freqüent (5%) però també implica mal pronòstic i sol associar-se a l'augment de la xifra de blastes i a SMD amb cariotip complex, i preveu un alt risc de recaiguda i una inferior supervivència post transplantament al·logènic^{37,51}. La seva troballa implica poca resposta al tractament amb lenalidomida en els casos de SMD amb del (5q)^{37,99,100}. La mutació de *TET2* és la més freqüent i no implica pronòstic en aquestes neoplàsies, tot i que, s'ha observat una millor resposta al tractament hipometilant en les SMD amb aquesta mutació¹⁰¹. Les mutacions de *SF3B1*

estan associades a bon pronòstic i es troben altament relacionades amb la presència de sideroblastes en anell^{45,76}.

Recentment, Papaemmanuil et al. han realitzat un estudi on ha observat un increment del nombre de mutacions en les SMD més avançades i en l'evolució a leucèmia aguda, correlacionant un empitjorament en el pronòstic dels pacients quan més nombre de mutacions somàtiques presenten⁶¹.

Alguns estudis han proposat incloure les mutacions gèniques en els índexs pronòstics de les SMD, però l'escassa millora en l'estratificació del risc enfront dels índexs pronòstics actuals i la dificultat d'accés per a molts centres a la tecnologia necessària per a la seva anàlisi, fa que actualment encara no s'utilitzin com a marcadors pronòstics.

2.1.6 Tractament

Les SMD no tenen un tractament específic segons el subgrup de la classificació de l'OMS per l'heterogeneïtat i la variabilitat en la supervivència d'aquestes neoplàsies. El tractament es basa en el grup de risc pronòstic en què s'engloba el malalt. Cal dir que aquestes neoplàsies són incurables sense un trasplantament al·logènic de progenitors hematopoètics (alo-TPH), el qual es reserva a pacients molt seleccionats a causa de l'alta mortalitat del procediment (37% als 3 anys)¹⁰². Així doncs, és indispensable una correcta classificació i estratificació pronòstica de les mateixes. Gràcies a això, es podrà estratificar el risc de manera individualitzada i determinar la necessitat de tractament adequant-se a cada cas concret.

Hi ha dos grans grups de tractament per les SMD, el tractament de suport, que es basa en la millora global dels símptomes derivats de la malaltia, i el tractament actiu, que fa referència al tractament farmacològic dirigit a modificar la història natural de les SMD.

Les recomanacions del GESMD per a l'inici del tractament, sigui de suport o actiu, en les SMD són⁵⁴:

1. Tots els pacients amb SMD d'alt risc són candidats a tractament actiu.
2. Les citopènies són el principal motiu de tractament en els pacients amb SMD de baix risc.

3. L'anèmia és la principal causa de tractament en pacients amb SMD. La decisió de tractar es valora de forma individual i en funció de la seva repercussió clínica. Una xifra d'hemoglobina de menys de 10g/dL es considera motiu d'iniciar tractament.
4. La trombocitopènia greu ($<20-30 \times 10^9/L$) s'associa a major risc de sagnat i mortalitat per hemorràgia i a menor SG. Els pacients amb xifra de plaquetes $<30 \times 10^9/L$ es consideren candidats a tractament i en canvi els pacients amb plaquetes $30-100 \times 10^9/L$ són candidats a seguiment pròxim, només amb la presència de sagnat són subsidiaris a tractament.
5. La presència de neutropènia greu ($<0,5 \times 10^9/L$) en pacients de baix risc s'associa a major risc d'infeccions, menor SG i major evolució a LAM, per això s'ha de considerar sempre l'inici de tractament. La neutropènia moderada ($0,5- 1 \times 10^9/L$) sense infeccions de repetició no són candidats a iniciar tractament. La presència d'infeccions de repetició requereix individualitzar el tractament, independentment de la xifra de neutròfils.

S'inclouen dins del tractament de suport les transfusions de concentrats d'hematies i/o plaquetes, administració d'agents estimulants de l'eritropoesi, de factors estimulants de colònies de granulòcits i/o d'anàlegs de la trombopoetina i l'ús profilàctic d'antibiòtics.

El tractament farmacològic de les SMD es troba en ple desenvolupament de la troballa de nous agents actius. Els fàrmacs àmpliament utilitzats actualment són la Lenalidomida (derivat de la Talidomida), indicat en els casos de SMD amb del(5q) aïllada i dependència transfusional; tractament immunosupressor (TIS) amb gammaglobulina antitimocítica (ATG) en combinació o no amb ciclosporina (CsA) en SMD on s'ha objectivat una certa resposta als mateixos (SMD hipoplàsics, presència de HLA DR15 i SMD amb trisomia del cromosoma 8); els agents hipometilants com la Azacitidina, aprovada en pacients d'alt risc en primera línia no candidats o amb impossibilitat de tractament intensiu (quimioteràpia/alo-TPH) i com a segona opció terapèutica després del tractament de suport en pacients de baix risc (també existeix la Decitabina però actualment no està aprovada a la Comunitat Europea); la quimioteràpia intensiva en els pacients candidats a alo-TPH sense donant apropiat, i

finalment, l'única opció curativa, l'alo-TPH, indicats en pacients d'alt risc que compleixin criteris de comorbiditat òptims per a la realització del mateix⁵⁴.

3. CROMOSOMA 8

El cromosoma 8 en humans correspon a un dels 23 parells de cromosomes homòlegs fruit de l'empaquetament de l'ADN en una mitosi¹⁰³. La quantitat d'eucromatina empaquetada en el cromosoma 8 representa al voltant del 5% del total del genoma i conté aproximadament 146 milions de bases nitrogenades, les quals codifiquen per 793 gens diferents¹⁰⁴. Existeixen diferents tipus d'alteracions genètiques i citogenètiques que afecten al cromosoma 8 i comprenen mutacions genètiques, alteracions en l'estructura cromosòmica i alteracions en el nombre de còpies del cromosoma. Aquestes alteracions s'han relacionat amb l'aparició de diferents estats patològics, així com, neoplàsies i defectes en el desenvolupament¹⁰⁵.

3.1. Mutacions genètiques en el cromosoma 8:

Les mutacions genètiques es defineixen com a canvis, deleccions o translocacions de bases nucleotídiques d'un gen. Aquestes mutacions poden alterar el marc de lectura genètica produint la no transcripció gènica, alterar la funcionalitat de la proteïna resultant o resultar en una síntesi de proteïnes diferents¹⁰⁶. Diferents exemples de gens compresos en el cromosoma 8, la mutació dels quals comporta diferents patologies, són el *LPL* (Hiperlipoproteïnèmia), *ASAH1* (Lipogranulomatosi de Farber), *HR* (Alopècia Universal), *NEFL* i *GDAP1* (Malaltia de Charcot-Marie-Tooth), *WRN* (Síndrome de Werner), *FGFR1* (Síndrome de Pfeiffer, Síndrome de Jackson-Weiss, Síndrome de Kallman i carcinoma escamós de pulmó) i *C-MYC* (amplificacions del gen en limfomes i alguns tumors sòlids), entre altres¹⁰⁵.



Figura 15. Esquema de la morfologia òptica amb bandes G del cromosoma 8 (Gilbert i cols. 2001)

3.2. Alteracions estructurals:

Els canvis estructurals dels cromosomes es deuen a ruptures del cromosoma seguides de la pèrdua o reordenament de material genètic¹⁰⁶ i són les següents:

- Delecions: Pèrdues d'una part del cromosoma que afecten la porció terminal o intermèdia del mateix.
- Inversions: reordenaments que consisteixen en dues ruptures dins del mateix cromosoma seguides d'una reincorporació invertida del fragment intermedi resultant.
- Isocromosoma: delecio d'un dels braços del cromosoma i duplicació del braç restant. En el cromosoma 8 és més freqüent l'isocromosoma del braç llarg, i(8q).
- Translocacions: trasllats d'un tros de cromosoma 8 a un altre cromosoma diferent. Una *translocació recíproca balancejada* és aquella en què es produeix intercanvi de material genètic entre dos o més cromosomes diferents. Diverses translocacions del cromosoma 8 amb altres cromosomes estan implicades en neoplàsies hematològiques (t(8;21)(q22;q22) en LAM, t(8;14)(q24;q32) en el limfoma de Burkitt, entre altres)¹².

3.3. Alteracions del nombre de còpies del cromosoma:

Aquestes alteracions són degudes a alteracions en la meiosi cel·lular dels gàmetes o en una incorrecta separació de les cromàtides en la segona mitosi cel·lular de les cèl·lules somàtiques¹⁰⁶. Quan es produeix una pèrdua d'un dels cromosomes 8 homòlegs en resulta una monosomia del cromosoma 8 (-8) i, en canvi, si es guanya una o dues còpies addicionals del cromosoma 8 tenim una trisomia (+8) o tetrasomia del cromosoma 8 (+8,+8) respectivament.

Nosaltres ens centrarem en la trisomia del cromosoma 8, una de les alteracions més freqüents en les síndromes mielodisplàsiques.

3.3.1 Trisomia del cromosoma 8 (+8)

Aneuploidia a expenses de l'adquisició d'un cromosoma 8 extra en la dotació cromosòmica cel·lular de forma constitucional o adquirida¹⁰⁷.

3.3.1.1 Trisomia constitucional del cromosoma 8

La trisomia constitucional del cromosoma 8 es deu a l'adquisició d'una còpia extra del cromosoma 8 en la fase d'embriogènesi o prèviament a la mateixa, i per tant, es trobarà en tots els tipus cel·lulars de l'individu. Aquesta pot ser completa o en forma de mosaïcisme. En la **trisomia homogènia o completa del cromosoma 8** totes les cèl·lules d'un individu presenten tres cromosomes 8 com a causa d'un error en la meiosi de les cèl·lules germinals dels progenitors^{108,109}, i acostuma a ser incompatible amb la vida¹¹⁰. La **trisomia 8 en mosaic (cTM8) o síndrome de Warkany** es deu a la incorrecta disjunció cromosòmica en la mitosi cel·lular post-zigòtica i comporta la presència de dues poblacions cel·lulars coexistents en un mateix teixit, una amb un cromosoma 8 extra i l'altre amb dotació cromosòmica normal^{108,109}.

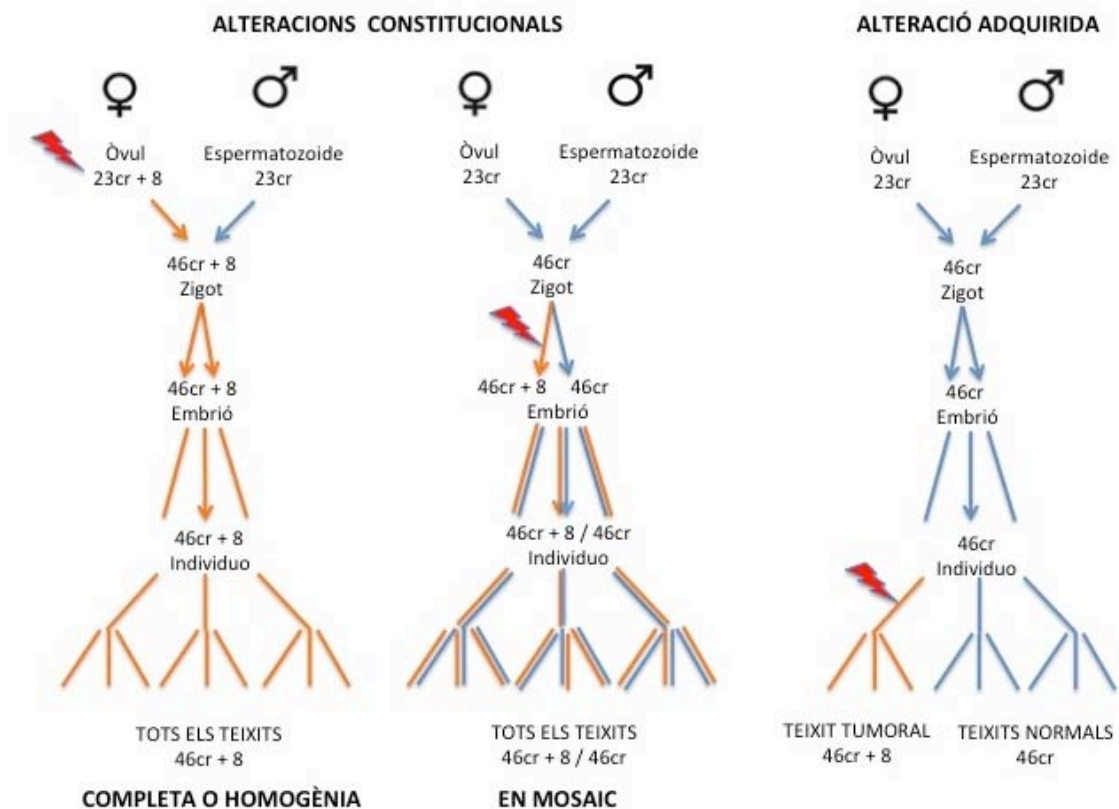


Figura 16. Esquema de els diferents tipus d'adquisició de un cromosoma 8 extra.

La cTM8 és compatible amb la vida i s'ha descrit amb una freqüència d'aproximadament 1/35000 naixements¹¹¹. Es tracta d'una síndrome clínica molt heterogènia, en alguns casos amb retard mental i malformacions (deformitats cranials, front prominent, paladar ogival, orelles d'implantació baixa i deformades, tronc allargat, solcs plantars profunds i mobilitat articular reduïda)

i altres casos amb presentacions quasi imperceptibles fenotípicament^{112,113}. S'ha postulat que la cTM8 predisposa, a aquests pacients, a presentar fenòmens autoimmunes¹¹⁴, així com a l'aparició de neoplàsies al llarg de la vida¹¹⁵.

Recentment, s'ha observat com la presència d'aneuploïdies, com la cT8M, es relaciona amb defectes en el desenvolupament neuronal i amb la gènesi tumoral¹¹⁶. Les neoplàsies més freqüentment relacionades amb la cT8M són les neoplàsies mieloides.^{113,115,117} Maserati et al. varen publicar que la trisomia 8 és constitucional en un 15-20% de les LAM i les SMD¹¹⁸. Tot i que, l'estudi es basava en una sèrie molt curta de pacients i utilitzant com a control, únicament, la citogenètica constitucional de sang perifèrica.

3.3.1.2 Trisomia adquirida del cromosoma 8

La trisomia adquirida del cromosoma 8 és la presència, de forma clonal i anòmala, d'un cromosoma 8 extra en una subpoblació cel·lular de l'individu, és a dir, restringida únicament en les cèl·lules tumorals. Aquesta s'ha descrit en diferents neoplàsies com són el tumor de Wilms, el sarcoma d'Ewing, el carcinoma de cèl·lules clares renal, els tumors germinals i sobretot en les neoplàsies hematopoètiques¹¹⁹. Dins de les neoplàsies hematopoètiques, la +8 predomina en aquelles d'origen mieloide. En les LAM i les SMD, la +8 és l'alteració numèrica més freqüent^{12,119,120}. En aquest treball ens centrarem en les SMD amb +8.

4. SÍNDROMES MIELODISPLÀSIQUES AMB TRISOMIA 8 AÏLLADA

Les SMD amb +8 com a única alteració citogenètica (SMD+8) s'han descrit amb una freqüència d'entre el 5-11% de les SMD^{31,92,95,98,119,121-124}. La +8 és l'alteració més freqüent en forma de guany cromosòmic en aquestes neoplàsies, tot i així, aquesta alteració no és considerada amb suficient valor diagnòstic en casos amb absència de criteris morfològics concloents de SMD, a diferència d'altres alteracions citogenètiques recurrents¹². Per altra banda, l'impacte pronòstic de la +8 en les SMD no està ben establert, ja que hi ha una alta variabilitat entre la supervivència reportada en els diversos estudis publicats^{30,95,98,121-123,125,126}. Encara que, segons l'IPSS i el nou IPSS-R, les

SMD+8 es troben en el grup de risc intermedi amb una mitjana de supervivència de 23 mesos^{31,95,97}. En aquests estudis s'han inclòs leucèmies mielomonocítiques cròniques i casos amb més de 20% de blasts. Aquestes neoplàsies, segons els criteris de l'OMS, es consideren com a neoplàsies mielodisplàsiques/mieloproliferatives (SMD/NMP) i LAM, respectivament i no com a SMD.

4.1. Patogènesi de les SMD amb trisomia 8 aïllada

Un dels punts de discussió en la patogènia de les SMD és si la cèl·lula neoplàsica inicial és la cèl·lula mare pluripotent o bé si la patogènesi s'origina en una cèl·lula més diferenciada. En alguns casos de LAM s'ha demostrat la presència de la trisomia 8 tant en els precursors mieloides com en elements de la línia limfoide, suggerint l'adquisició d'aquesta alteració en la cèl·lula mare pluripotent¹²⁷. En pacients amb SMD, en canvi, hi ha alguns estudis on conclouen que la +8 es troba exclusivament en la línia mioide¹²⁸⁻¹³⁰. Tanmateix, Nilsson et al. (2002) varen reportar la presència de +8 en part de les cèl·lules mare pluripotents d'aquests pacients. Aquests autors, a partir de cultius cel·lulars, van demostrar una diferenciació ineficient de les cèl·lules mare disòmiques en pacients amb SMD+8, suggerint que podrien formar part de la clona patològica¹³¹. Així doncs, no queda clar el moment exacte de la diferenciació cel·lular on es produeix l'adquisició d'un cromosoma 8 de més. Per altra banda, la participació del cromosoma 8 extra en la patogènia de les SMD+8 no està ben definida. S'han suggerit diverses hipòtesis per explicar la implicació de la +8 en aquestes neoplàsies. S'inclouen: la possibilitat d'una expressió augmentada dels gens del cromosoma 8, com a conseqüència de la presència d'un cromosoma 8 extra, la desregulació de la inactivació gènica d'un dels progenitors o silenciament genòmic (*genomic imprinting*), i finalment la possibilitat de la duplicació de mutacions o reordenaments d'alguns gens presents en el cromosoma 8 extra.

4.1.1 Augment de la càrrega gènica

Inicialment es va postular que el guany de la càrrega gènica de *C-MYC*, gen localitzat en el braç llarg del cromosoma 8 i que activa el cicle cel·lular, explicava l'efecte de la +8 en les neoplàsies hematològiques. L'any 1995,

Mertens et al. en un estudi amb 2536 pacients amb diferents neoplàsies hematològiques van observar que, en la majoria de casos, el guany de material genètic del cromosoma 8 es dona en forma d'adquisició d'un cromosoma 8 sencer, i que, per tant, era improbable que l'efecte patogènic de la +8 s'expliqués únicament per la sobreexpressió d'un sol gen¹³². L'any 2004, Chen et al. van realitzar un estudi per determinar les característiques d'expressió gènica de cèl·lules CD34+ purificades de 13 pacients diagnosticats de SMD amb trisomia 8 com a única alteració. Aquests autors van veure que hi havia, de forma diferencial, una sobreexpressió de gens implicats en mecanismes immunes i en la inflamació (*TGF-B*, *receptor de TGF-B*, *IL-10*, *IL-7R*, *VCAM-1* i *C-MAF*), de gens implicats en el control del cicle cel·lular i la transducció de senyals i d'oncogens (*CCNE1*, *CDK2*, *IGF*, *IGFR1*, *V-ABL*, *RAD51* i *AXL*). En canvi es va objectivar una infraexpressió d'alguns gens inhibidors de l'apoptosi cel·lular (*BIRC5* i *NAIP*)¹³³. Posteriorment, el mateix grup investigador va demostrar, mitjançant PCR quantitativa, la sobreexpressió dels gens *C-MYC*, *CD1* i *SURVIVINA* en pacients amb SMD +8¹³⁴. Aquests gens produeixen l'estimulació del cicle cel·lular i la inhibició de l'apoptosi¹³⁵⁻¹³⁷. L'any 2010, Pellagatti et al. van publicar un nou estudi amb microarrays d'expressió on van constatar, novament, que els pacients amb SMD amb +8 presentaven desregulació de vies associades amb la resposta immune¹³⁸. Posteriorment Sloand et al. van observar la sobreexpressió del gen *WT1* en pacients amb SMD+8¹³⁹. Anteriorment, ja s'havia reportat la sobreexpressió d'aquest gen en altres tipus de SMD¹³³ i el seu paper antiapoptòtic en aquest tipus de neoplàsies¹⁴⁰.

L'alteració de gens implicats en el control del cicle cel·lular i en l'apoptosi cel·lular, pot explicar, en part, la mielopoesi ineficaç i la presència de citopènies. Els gens implicats en la immunitat i la inflamació sobreexpressats en les SMD+8 es troben similarment sobreexpressats en l'aplàsia medul·lar^{133,141}. Aquestes troballes són concordants amb el comportament clínic similar d'ambdues patologies, les quals responen favorablement a immunoteràpia⁸⁸. Curiosament, els patrons d'expressió gènica de les SMD +8 i de les LAM amb +8 aïllada no presenten característiques comunes. En les SMD+8, al contrari de les LAM amb +8 aïllada, no s'observa sobreexpressió de gran part dels gens localitzats en aquest cromosoma¹⁴²⁻¹⁴⁴.

4.1.2. Pèrdua del silenciament genòmic (*genomic imprinting*)

Mitjançant la reproducció sexual els humans heretem dos còpies de cada gen, una materna i l'altra paterna, continguts en cadascun dels 23 parells de cromosomes homòlegs. Tot i així, existeixen diferències funcionals entre l'al·lel matern i el patern d'un gen. En condicions normals i en la majoria de casos, es produeix una inactivació selectiva de l'al·lel matern o de l'al·lel patern de cada gen. Aquest procés s'anomena silenciament genòmic o *genomic imprinting* (GI), i és essencial pel normal desenvolupament en els mamífers¹⁰⁶. El GI es troba definit per metilacions genètiques en la gametogènesi i es preserva a través de les diferents divisions cel·lulars. La pèrdua de la regulació epigenètica de les metilacions de diferents gens, així com, la pèrdua d'heterozigocitat (LOH) com són les disomies uniparentals (UPD), o fins i tot, la duplicació de part del material genètic (com la trisomia del cromosoma 8), poden produir una pèrdua de l'expressió genètica monoal·lèlica i donar lloc a la gènesi tumoral^{145,146}. Entre les SMD +8, s'han publicat casos de SMD on es descriu l'origen paternal o maternal del cromosoma 8 duplicat, sense objectivar-se dominància clara¹²⁴. No obstant això, no hi han estudis adreçats específicament a l'estudi de l'efecte de la pèrdua de l'expressió monoal·lèlica en les SMD +8.

4.1.3. Mutacions o reordenaments de gens

En diversos estudis mitjançant *Southern blot*, *FISH* i *bandeig multicolor* i no s'han detectat alteracions críptiques balancejades en SMD+8¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Paulsson et al. l'any 2006, mitjançant *microarrays* de CGH, varen estudiar la presència d'alteracions balancejades en 10 neoplàsies mieloides amb +8 aïllada (3 SMD, 1 LMMC i 6 LAM). Es varen observar alteracions balancejades no descrites fins aquell moment en SMD en 4/10 casos analitzats, demostrant l'heterogeneïtat d'aquestes neoplàsies i postulant que la +8 com a única alteració pot no ser suficient per a la leucemogènesi¹²⁰. Posteriorment, aplicant la tècnica de SNP-array en 8 pacients amb +8 com a única alteració (3 LAM i 5 SMD), no es van aportar noves troballes¹⁵⁰.

L'any 2011 Bejar et al. mitjançant seqüenciació massiva i genotipatge basat en espectrometria de masses (*Mass-Spectrometric Genotyping*) van analitzar un total de 432 pacients amb SMD entre els quals es trobaven 24 casos de SMD +8. En tretze dels 24 pacients (54%) s'observava com a mínim una mutació en els gens a estudi. Entre les mutacions trobades en les SMD amb +8, les més freqüents van ser les mutacions en *TET2* (21%), en *ASXL1* (16%), en *IDH1/IDH2* (15%) i en *EZH2* (8%)³⁷.

TET2 és un gen implicat en el control de la metilació del ADN. Les mutacions en aquest gen produeixen una inactivació del mateix¹⁵¹. No està ben establert si les mutacions en *TET2* comporten impacte pronòstic en pacients amb SMD^{152,153}, però estudis recents suggereixen que poden predir una resposta favorable a tractament amb agents hipometilants¹⁰¹. *ASXL1* i *EZH2* són dos gens implicats en la metilació d'histones i en conseqüència la repressió de la transcripció gènica actuant com a possibles supressors tumorals^{151,154,155}. En les SMD +8, un estudi recent ha objectivat una freqüència superior a la descrita per Bejar et al. de la mutació de *ASXL1* (45%) en aquests pacients¹⁵⁶. Les mutacions de *ASXL1* i *EZH2* s'associen a una supervivència menor en les SMD relacionant-se amb una curta supervivència global^{37,41,59,154}. Els gens *IDH1/IDH2* codifiquen per dos enzims dependents de NADP+ que converteixen l'isocitrat a α -ketoglutarat (α KG). Les mutacions en aquests gens produeixen una pèrdua de la funció enzimàtica normal produint 2-hidroxiglutarat (2HG) en comptes de α KG¹⁵⁷. Aquests enzims *IDH1/IDH2* anòmals produeixen una hipermetilació del DNA i una pèrdua de funcionalitat del gen *TET2*, ja que és dependent de α KG¹⁵⁸. Caramazza et al., en una sèrie de 54 pacients amb SMD+8, van corroborar la presència de mutacions de *IDH1/IDH2* en un 15% dels casos¹⁵⁹. Hi ha estudis que apunten que les mutacions en *IDH1* són un factor independent de mal pronòstic en les SMD^{160,161} i altres estudis assenyalen que les mutacions tant de *IDH1* com de *IDH2* no comporten un pronòstic advers¹⁵³. Altres mutacions genètiques descrites en *RUNX1*, *SRSF2*, *KRAS*, *NRAS*, *JAK2* són menys freqüents^{36,37,156,162}. Cap d'aquestes mutacions són específiques de les SMD, i en aquests estudis la majoria de casos que presentaven mutacions genètiques eren LMMC, SMD d'alt risc o SMD amb elevat nombre de blasts (algunes eren LAM).

4.1.4 Mecanismes immunes

Diferents grups han realitzat treballs que posen de manifest l'activació del sistema immune en les SMD. Publicacions inicials apuntaven a una disminució en l'activitat funcional de les cèl·lules *Natural Killer* (NK) en els pacients amb SMD d'alt risc^{163,164}. Posteriorment, Chamuleau et al. van objectivar la presència de citotoxicitat contra les cèl·lules precursoras hematopoètiques neoplàsiques no regida pel complex major d'histocompatibilitat (MHC), en un estudi on comparaven una sèrie de 40 SMD de baix risc i de risc intermedi amb una altra sèrie de 10 controls sans, i van demostrar que les cèl·lules NK eren responsables, en part, d'aquesta citotoxicitat¹⁶⁵. Aquestes dades demostren la implicació de les NK en la patogènesi de les SMD.

Els macròfags, també estan implicats en el mecanisme immune d'aquestes neoplàsies¹⁶⁶. Aquests són, en condicions normals, un component essencial del microambient de la medul·la òssia i es mantenen en constant contacte amb les cèl·lules hematopoètiques, sent les principals cèl·lules fagocítiques i secretores de citocines en el moll de l'os¹. Maratheftis et al. van observar una sobreexpressió de les proteïnes de membrana "Toll-like" (TLR) en les cèl·lules mononucleades medul·lars en les SMD. També van correlacionar la sobreexpressió d'aquests receptors de membrana amb l'apoptosi cel·lular¹⁶⁷. Aquests receptors són especialment abundants a la membrana dels macròfags, de les cèl·lules dendrítiques i dels neutròfils, i regulen la immunitat innata, activant la secreció de citocines proinflamatòries. La secreció de $TNF\alpha$, $INF\gamma$ i IL6 es veu incrementada en les SMD de baix risc i disminuïda en les SMD d'alt risc. En canvi citocines immunosupressores com la IL-10 són més segregades en les SMD d'alt risc^{168,169}. El $TNF\alpha$ i el $INF\gamma$ produeixen l'estimulació de l'expressió de l'antigen FAS en les cèl·lules hematopoètiques CD34+, que en unir-se al seu lligand provoquen la mort cel·lular programada¹⁷⁰⁻¹⁷², i l'activació de la via de les p38 MAPK que també incrementa l'apoptosi cel·lular¹⁷³. Aquestes citocines, per tant, indueixen la supressió de l'hematopoesi en el moll de l'os.

Diferents treballs han demostrat que el 97% de les SMD presenten expansions de cèl·lules T oligoclonals, amb augment d'activació de limfòcits T $CD8+$ *naïve* i expansió de cèl·lules T $CD8+$ efectores amb fenotip citotòxic en resposta a la

presentació d'autoantígens i d'antígens tumorals^{165,174-179} Epling-Brunette et al. van objectivar que aquestes cèl·lules T CD8+ efectores expressaven els receptors de membrana CD244, activador de cèl·lules NK i macròfags, inductor de l'expressió de *granzyme B* i perforina i la producció ràpida de INF γ i NKG2D, i coestimulador de limfòcits T CD8+. Aquest mateix grup van demostrar que aquesta expansió de cèl·lules T CD8+ clonals no es correlaciona amb el cariotip o el subtipus de SMD¹⁷⁸. Tanmateix, existeix una variabilitat de les cèl·lules T CD4+ segons el grup de risc de SMD. Kordasti et al. varen objectivar un augment de citocines proinflamatòries i de cèl·lules T CD4+ "helper" productores de IL17 (Th17) en les SMD de baix risc¹⁸⁰, i en les SMD d'alt risc i en l'evolució a LAM, un augment de cèl·lules T CD4+ reguladores Foxp3+ (Treg)¹⁸¹. Aquests autors van detectar una correlació inversa entre les Th17 i les Treg entre els dos grups de SMD. I així mateix, en les SMD d'alt risc les Th17 serien inhibides per les Treg i en les SMD de baix risc el baix nombre de Treg permetria l'activació de Th17 amb secreció de IL-17 i la inducció d'un ambient proinflamatori¹⁸⁰. En un estudi *in vitro* recent, s'ha observat que l'estimulació amb IL-17 recombinant de cèl·lules mononucleades de pacients amb SMD produeix un increment de la producció de citocines reguladores TNF α i INF γ ¹⁸² Zou et al. van reportar que els pacients amb SMD que presenten depleció de cèl·lules T CD4+ tenen una millor resposta al tractament immunosupressor, i suggereixen que la disminució de cèl·lules T CD4+ és a expenses de Treg¹⁸³.

Encara que el paper que tenen les cèl·lules B en la patogènia de les SMD no està ben descrit, s'ha observat que els pacients amb SMD de baix risc presenten un increment de l'apoptosi de limfòcits B madurs juntament amb un nombre de cèl·lules progenitores B reduït¹⁸⁴⁻¹⁸⁶.

Aquestes troballes i la resposta hematològica al tractament immunosupressor en un 20 a un 45% dels SMD, suggereixen que la desregulació del sistema immunitari és una causa plausible de les citopènies en aquests pacients (Figura 12)^{90,174,187-191}.

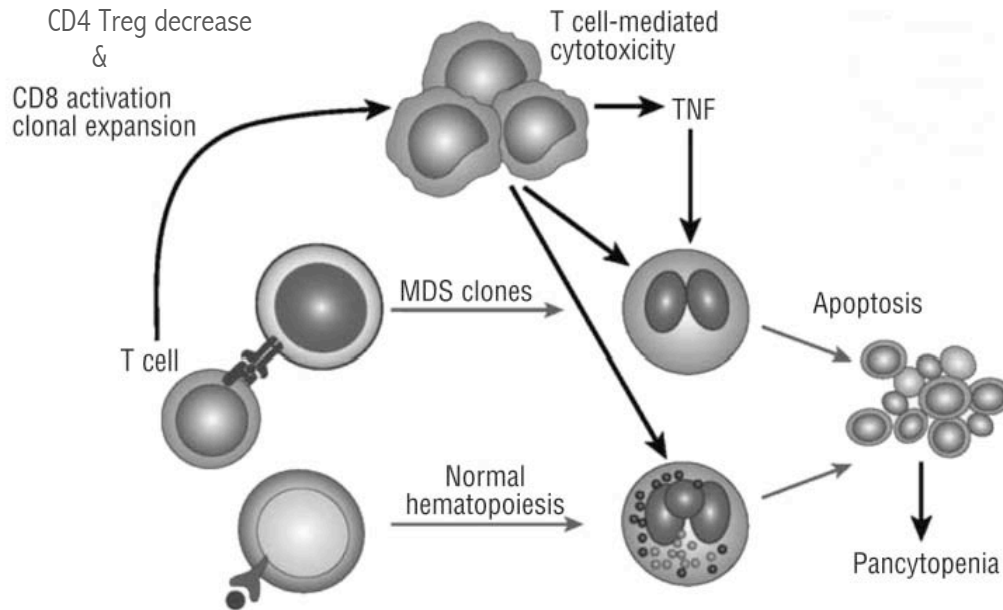


Figura 17. **Model d'interaccions immunes en les SMD.** Els clons patològics (SMD) sobreexpressen antígens o expressen nous antígens, i es produeix una expansió de cèl·lules T citotòxiques que produeixen un augment de citocines inflamatòries, $TNF\alpha$ i $INF\gamma$. Això, juntament amb la disminució de les Treg, promou un ambient proinflamatori que afavoreix l'apoptosi dels progenitors hematopoètics produint la supressió de l'hemopoiesi. (Adaptat de Barret i cols. 2009.)

En un estudi realitzat per Sloand et al. on van analitzar l'expressió de FAS en les cèl·lules $CD34+$ de 25 pacients amb SMD i diferents alteracions citogenètiques (monosomia 7, deleció 5q o trisomia 8), es va observar que les cèl·lules $CD34+$ dels pacients amb trisomia 8 presentaven més expressió de FAS respecte als pacients amb altres alteracions. Així doncs, i d'acord amb els autors, els pacients amb SMD+8 haurien de respondre millor a TIS que aquells pacients amb SMD en què l'apoptosi regida per FAS juga un paper menor¹⁹². Donat el paper, que ja hem descrit, de la immunitat en l'expressió del receptor FAS en les cèl·lules hematopoètiques, Sloand et al. van realitzar un nou estudi per determinar si realment l'apoptosi cel·lular en les SMD+8 era causada per mecanismes immunes, objectivant una expansió de limfòcits T $CD8+ \gamma\beta$ en tots els 34 pacients amb SMD+8 analitzats. Els autors suggerien que aquesta expansió de cèl·lules $CD8+$ citotòxiques es devia, probablement, a una reacció a antígens presentats per part del clon amb +8. En cocultius de cèl·lules

hematopoètiques i limfòcits T CD8+ $\gamma\beta$ es va detectar la inhibició específica del clon amb +8. En canvi, *in vivo*, el clon neoplàsic amb trisomia 8 presenta mecanismes de resistència a l'apoptosi regida per FAS. Aquesta afirmació es basa en què un 67% dels pacients amb SMD amb +8 com única alteració presentaven resposta estable a ATG amb normalització del nombre de cèl·lules T, reversió de les citopènies i independència transfusional després del tractament, però, en canvi, presentaven un increment estable de la clona amb trisomia 8 en la medul·la òssia¹⁹³.

En un estudi posterior del mateix grup es va observar, mitjançant PCR quantitativa, una sobreexpressió de *C-MYC* i *SURVIVINA* (inhibidor de l'apoptosi cel·lular). I en cultius de cèl·lules mononucleades de SMD+8 tractades amb radiació gamma, es va demostrar el poder inhibitori de l'apoptosi per part de *C-MYC* i *SURVIVINA*. Aquests resultats expliquen el mecanisme de supervivència per part de les cèl·lules amb +8 a l'expansió clonal específica de limfòcits T CD8+ citotòxics¹³⁴.

Més recentment, Sloand et al. han realitzat un estudi per analitzar si la mielosupressió guiada per cèl·lules T mitjançant la hiperexpressió de FAS es deu a una interacció específica amb antígens procedents de la clona neoplàsica amb +8. En aquesta anàlisi, mitjançant cultius cel·lulars, van objectivar que el percentatge de la clona neoplàsica amb +8 es correlacionava amb la producció de TNF α per part de les cèl·lules T WT-1 antigen específiques introduïdes en el cultiu. Per altra banda, van identificar cèl·lules T específiques per WT-1 en pacients amb SMD+8 mitjançant anàlisis amb tetràmers i assajos de detecció de citocines intracel·lulars, i van demostrar que la presència d'aquestes cèl·lules es correlacionava amb la resposta a TIS. Aquests resultats suggerien que WT-1 és un dels antígens desencadenants de la mielosupressió immune en les SMD+8¹³⁹.

Així doncs, en resum, els diferents estudis apunten que les SMD +8 expressen antígens tumorals específics que són responsables de l'activació de cèl·lules T autòlogues, causant un ambient inflamatori que indueix l'apoptosi cel·lular. Tot i així, s'ha demostrat que les cèl·lules neoplàsiques amb +8 de les SMD presenten mecanismes de resistència a aquesta apoptosi.

4.2 Tractament de les SMD amb trisomia 8 aïllada

Existeixen diferents alternatives terapèutiques per les SMD. A causa de l' heterogeneïtat en el curs evolutiu d'aquestes neoplàsies, els criteris per a la selecció del tractament es basa en categoritzar específicament els pacients segons el seu risc pronòstic. Les SMD+8 no en són una excepció. En elles també s'utilitzen els índex pronòstics per establir la categoria de risc i determinar el tractament més adequat. L'elecció del tractament en les SMD i +8 es realitza equivalentment al esquema del global de les SMD. (Apartat 2.1.6)

Tractament immunosupressor

El tractament immunosupressor es basa en l'ús de ATG sola o combinada amb CsA. En els pacients que responen a TIS es produeix una milloria en l'hemopoiesi i en conseqüència disminució de les citopènies. Els únics dos factors que s'han reportat amb un valor pronòstic independent a la resposta a TIS són l'edat <60 anys i la positivitat de l'antigen HLA-DR15. Tot i així, existeix una preponderància de pacients amb trisomia 8 i sexe femení entre els casos de SMD que responen a TIS^{190,194,195}.

En un estudi realitzat per Sloan et al. un 61% dels pacients amb SMD+8 van respondre al tractament immunosupressor. La resposta es basava en la millora de les citopènies, tot i que, va observar un augment de la clona amb +8 en l'estudi citogenètic d'aquests pacients. Com hem explicat en apartats anteriors, la resposta clínica observada estava associada a la desaparició de les expansions de cèl·lules T a causa del TIS¹⁹³. En un assaig clínic recent, s'ha observat que el TIS presenta una millor resposta hematològica que el tractament de suport, però que no té impacte pronòstic quant a supervivència global ni en la progressió a leucèmia aguda. A més a més, el TIS és un tractament que ocasiona una important toxicitat. En aquest estudi es va observar efectes adversos en el 45% dels pacients, sent els més freqüents les infeccions severes, complicacions inflamatòries, eventualitats trombotiques i hemorràgiques, febre post infusió i alteracions cardíques¹⁹¹. Així doncs, s'aconsella limitar aquests tractaments a casos en què han fracassat totes les altres opcions terapèutiques i presenten una elevada probabilitat de resposta a TIS⁵⁴.

HIPOTESI I

OBJECTIUS

Com hem dit anteriorment, les SMD són neoplàsies clonals de la cèl·lula mare hematopoètica pluripotent caracteritzades per una mielopoesi ineficaç, i un curs clínic variable. El seu diagnòstic és un dels més difícils entre els de les neoplàsies mieloides i depèn bàsicament de diferents dades morfològiques característiques i de l'existència d'alteracions citogenètiques recurrents. La trisomia 8, tot i ser l'alteració citogenètica més freqüent en forma de guany cromosòmic en les SMD, no es considera diagnòstica de SMD en absència de criteris morfològics concloents (OMS 2008). Per altra banda, la trisomia 8 té impacte pronòstic en les SMD i, actualment, forma part de les alteracions citogenètiques de risc intermedi segons el R-IPSS. La raó principal perquè aquesta alteració no és considerada amb suficient evidència per el diagnòstic de una SMD és perquè s'ha descrit que en persones sanes es pot observar la +8 de forma constitucional en mosaïcisme. En casos de SMD, si la +8 aïllada es demostrés constitucional, no tindria valor pronòstic. Dilucidar la incidència de la cT8M en les SMD significaria un canvi important en el valor diagnòstic de la trisomia 8 en aquestes neoplàsies i dilucidaria el valor pronòstic real.

Les hipòtesis plantejades eren que la trisomia 8 és majoritàriament una alteració adquirida en aquestes neoplàsies, sent, per tant, una alteració amb suficient valor diagnòstic de SMD, fins i tot, quan hi ha alteracions morfològiques suggestives però no concloents d'aquesta entitat. Que és una alteració amb un impacte pronòstic negatiu en les SMD i que les alteracions citogenètiques acompanyants a la +8 empitjoren aquest pronòstic.

Objectiu general:

La finalitat del treball és caracteritzar les SMD amb trisomia 8 a partir d'una anàlisi estadístic de pacients amb SMD amb trisomia 8 procedents del "*Registro Español de SMD*", i determinar l'impacte pronòstic de les alteracions addicionals.

Es pretén determinar si la trisomia 8 és una alteració constitucional o adquirida en les SMD, i així, finalment, establir el valor diagnòstic i pronòstic d'aquesta alteració.

Objectius concrets:

1. Realitzar una anàlisi estadístic descriptiu i comparatiu dels diferents grups de pacients amb SMD amb trisomia 8 segons el nombre d'alteracions citogenètiques afegides a partir de la revisió retrospectiva de casos del "*Registro Español de SMD*".
2. Analitzar el valor pronòstic de les alteracions citogenètiques addicionals a la trisomia 8 en les SMD amb aquesta alteració, a partir de les dades recollides de pacients del "*Registro Español de SMD*".
3. Determinar la incidència de la trisomia 8 de forma constitucional en els pacients amb SMD amb aquesta alteració, estudiant la presència de la trisomia 8 en cèl·lules no mieloides (limfòcits CD3+) i cèl·lules no hematològiques (mucosa oral), mitjançant l'anàlisi del cariotip constitucional procedent de cultius de SP estimulats amb fitohemaglutinina (PHA) i de la tècnica de FISH aplicada sobre limfòcits CD3+ i cèl·lules de la mucosa oral.
4. Definir el valor pronòstic i diagnòstic real de la trisomia 8 en les SMD.

MÈTODE I

RESULTATS

En l'apartat següent es descriuen el mètode i els resultats del projecte de tesi mitjançant la inclusió dels articles publicats fruit del treball realitzat.

Els articles inclosos son:

1) **Prognostic value of trisomy 8 as a single anomaly and the influence of additional cytogenetic aberrations in primary myelodysplastic syndromes.**

Saumell S, Florensa L, Luño E, Sanzo C, Cañizo C, Hernández JM, Cervera J, Gallart MA, Carbonell F, Collado R, Arenillas L, Pedro C, Bargay J, Nomdedeu B, Xicoy B, Vallespí T, Raya JM, Belloch L, Sanz GF, Solé F.

British Journal of Haematology 2012 Nov;159(3):311-21. Factor impacte: 4,959

2) **Trisomy 8, a cytogenetic abnormality in myelodysplastic syndromes, is constitutional or not?**

Saumell S, Solé F, Arenillas L, Montoro J, Valcárcel D, Pedro C, Sanzo C, Luño E, Giménez T, Arnan M, Pomares H, De Paz R, Arrizabalaga B, Jerez A, Martínez AB, Sánchez-Castro J, Rodríguez-Gambarte JD, Raya JM, Ríos E, Rodríguez-Rivera M, Espinet B, Florensa L.

PloS One. Acceptat per publicació el 7 de Maig del 2015. Factor impacte: 3,53

1- Article 1. Valor pronòstic de la trisomia 8 com a alteració única i la influència d' alteracions addicionals en les síndromes mielodisplàsiques primàries.

Aproximadament el 50% de les síndromes mielodisplàsiques presenten alteracions citogenètiques recurrents. Entre elles la trisomia 8 és el guany cromosòmic més freqüent. Tanmateix, les característiques de les SMD amb trisomia 8 aïllada no estan ben descrites, com tampoc ho està la influència pronòstica de les alteracions addicionals. L'objectiu d'aquest treball era descriure les característiques d'una sèrie de SMD+8 i valorar l'efecte pronòstic de les alteracions addicionals.

Pacients i Mètode:

Es van recollir les dades de 257 pacients diagnosticats de SMD amb +8 procedents de la base de dades del registre del Grup Espanyol de Síndromes Mielodisplàsiques on constaven 3677 pacients. Els casos amb més de 20% de blastes i les LMMC van ser exclosos, de manera que de 257 pacients 134 complien criteris de SMD segons l'OMS 2008. Es van classificar en diversos grups segons la complexitat del cariotip: 72 SMD amb +8 aïllada, 31 SMD amb +8 i una alteració addicional, 8 SMD amb +8 i dues alteracions addicionals i 23 SMD amb +8 i tres o més alteracions addicionals. Es van incloure les dades de sexe, edat, valors d'hemoglobina, recompte total de neutròfils i plaquetes, nombre de blasts a moll d'os, grup diagnòstic segons l'OMS del 2008 i el grup pronòstic segons IPSS.

Es va realitzar una anàlisi estadística per definir les característiques de les SMD+8, a partir d'una anàlisi univariada i després amb un model multivariat per determinar les variables pronòstiques rellevants. Es va utilitzar el grup de pacients amb SMD i cariotip normal del mateix registre per a comparar-lo amb el grup de SMD+8 en termes de supervivència global i temps de transformació a leucèmia aguda.

Resultats:

Grup de 72 pacients amb SMD amb +8 aïllada:

La sèrie de casos de SMD+8 incloïa 48 homes (66.7%) i 24 dones (33.3%) amb una mitjana d'edat de 72 anys. Segons els criteris de l'OMS 2008 els pacients es van classificar de la següent manera: 9 AR (12.5%), 7 ARSA (9.7%), 21 CRDM/CRDM-SA (29.2%), 18 AREB-1 (25%), 14 AREB-2 (19.4%) i 3 SMD-U (4.2%). Els pacients es van classificar en els següents grups de risc d'acord amb l'IPSS: 45 (69.2%) en intermedi 1, 16 (24.6%) en intermedi 2 i 4 (6.2%) en alt risc. El 62% dels pacients presenten més d'una citopènia en el moment del diagnòstic i la mitjana de recompte percentual de blasts en el moll de l'os va ser de 4. En 11 de 72 pacients la trisomia 8 era present en totes les metafases. No es van detectar diferències pronòstiques significatives entre aquests 11 pacients i els que tenien alguna metafase normal (mitjana de supervivència 64 vs. 29 mesos, respectivament $P=0.62$).

Amb una mitjana de seguiment de 16 mesos es va observar una mitjana de supervivència global per a les SMD+8 de 34.3 mesos i varen evolucionar a leucèmia aguda 13 pacients (18%) amb una probabilitat acumulada de transformació a leucèmia aguda del 17.5% als 2 anys. En l'anàlisi univariada la SG es veia influenciada per la xifra de plaquetes, el número de citopènies, el recompte percentual de blastes a moll d'os, el grup de risc segons l'IPSS i el subtipus diagnòstic segons la classificació de l'OMS 2008.

En l'anàlisi comparatiu entre les SMD+8 i les SMD amb cariotip normal es va observar una diferència estadísticament significativa en mitjana de SG entre els pacients amb més de 5% de blastes. Observant una mitjana de supervivència global inferior en el grup de pacients de SMD+8 respecte als de cariotip normal (9.5 vs 28.5 mesos). Això no passava entre els pacients amb menys de 5% de blastes.

En l'estudi multivariat es va observar que la xifra de plaquetes i el percentatge de blastes a moll d'os eren els paràmetres que tenien impacte pronòstic en les SMD+8, amb un pitjor pronòstic pel comptatge de plaquetes inferior a $100 \times 10^9/L$ i pel comptatge de més de 5% blastes medul·lars.

Anàlisi de la sèrie global de pacients:

Les alteracions més freqüents addicionades a la trisomia 8 en el grup de SMD i trisomia 8 amb una alteració acompanyant eren la deleció de 5q seguida de la delecció de 11q.

No es van veure diferències clíniques ni analítiques entre els grups amb una, dos o tres alteracions addicionals a la trisomia 8. La mitjana de supervivència pels pacients amb una, amb dues i amb tres o més alteracions varen ser 40, 23.4 i 5.8 mesos, respectivament. En l'anàlisi de supervivència no es van trobar diferències significatives entre les SMD amb +8 aïllada, les SMD amb +8 i una altra alteració i les SMD amb +8 i dues alteracions addicionals. Agrupant doncs aquests tres grups en un sol grup i comparant-lo amb el grup de SMD amb +8 i tres o més alteracions addicionals, es van trobar diferències estadísticament significatives en la mitjana de supervivència global entre els dos grups (mitjana SG: 34,3 vs 5,8 mesos, respectivament).

L'anàlisi multivariat va mostrar que el nivell d'hemoglobina (<100 g/l vs ≥ 100 g/l), el recompte plaquetar ($<100 \times 10^9/l$ vs $\geq 100 \times 10^9/l$), el número de blastes a moll d'os (5–20% vs. $<5\%$) i la complexitat del cariotip tenien un impacte pronòstic independent. Així doncs, l'addició d'alteracions cariotípiques representa un impacte pronòstic negatiu sobre aquestes neoplàsies.

Prognostic value of trisomy 8 as a single anomaly and the influence of additional cytogenetic aberrations in primary myelodysplastic syndromes

Sílvia Saumell,^{1,2} Lourdes Florensa,¹ Elisa Luño,³ Carmen Sanzo,³ Consuelo Cañizo,⁴ Jesus M. Hernández,⁴ José Cervera,⁵ Miguel A. Gallart,⁶ Félix Carbonell,⁷ Rosa Collado,⁷ Leonor Arenillas,¹ Carme Pedro,¹ Joan Bargay,⁸ Benet Nomdedeu,⁹ Blanca Xicoy,¹⁰ Teresa Vallespi,¹¹ José M. Raya,¹² Luis Belloch,⁵ Guillermo F. Sanz⁵ and Francesc Solé¹

¹Laboratori de Citologia Hematològica, Laboratori de Citogenètica Molecular, Serveis de Patologia i d'Hematologia Clínica, Hospital del Mar, GRETHNE, IMIM (Hospital del Mar Research Institute), Barcelona, ²Department of Medicine, Medicine Faculty, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, ³Servicio de Hematología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, ⁴Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, ⁵Servicio de Hematología, Hospital Universitario La Fe, Valencia, ⁶Servei d'Hematologia, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida, ⁷Servicio de Hematología, Hospital General de Valencia, Valencia, ⁸Servicio de Hematología, Hospital Son Llàtzer, Mallorca, ⁹Servei d'Hematologia, Hospital Clínic Barcelona, Barcelona, ¹⁰Servei d'Hematologia, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, ¹¹Servei d'Hematologia, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona and ¹²Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Canarias, La Laguna-Tenerife, Spain

Received 11 April 2012; accepted for publication 16 July 2012

Correspondence: Francesc Solé, Laboratori de Citogenètica Molecular, Servei de Patologia, Hospital del Mar, Passeig Marítim 25-29, 08003 Barcelona, Spain.
E-mail: fsolé@parcdesalutmar.cat

Spanish MDS Group (Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos; GESMD) and Spanish Haematological Cytogenetics Working Group

Summary

Trisomy 8 is the most common chromosomal gain in myelodysplastic syndromes (MDS), however, little is known about the features of MDS with isolated trisomy 8 and the influence of additional cytogenetic aberrations. We determined the characteristics and prognostic factors of 72 patients with trisomy 8 as a single anomaly and analysed also the impact of other aberrations added to trisomy 8 in another 62 patients. According to our study, MDS with isolated trisomy 8 was more frequent in men, with more than one cytopenia in most patients (62%) and having about 4% bone marrow blasts. The multivariate analysis demonstrated that platelet count and percentage bone marrow blasts had the strongest impact on overall survival (OS). The median OS for isolated trisomy 8, trisomy 8 plus one aberration (tr8 + 1), plus two (tr8 + 2) and plus three or more aberrations (tr8 + \geq 3) was 34.3, 40, 23.4 and 5.8 months, respectively ($P < 0.001$). Trisomy 8 confers a poorer prognosis than a normal karyotype in MDS patients with \geq 5% bone marrow blasts. This study supports the view that MDS with isolated trisomy 8 should be included in the intermediate cytogenetic risk group.

Keywords: trisomy 8, myelodysplastic syndromes, cytogenetic aberrations.

(Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica; GCECGH).

The myelodysplastic syndromes (MDS) are a heterogeneous group of myeloid stem cell neoplasms characterized by hypercellular bone marrow with myeloid lineage dysplasia and ineffective haematopoiesis leading to peripheral cytopenias. The overall survival (OS) and risk of leukaemic transformation in such patients are highly variable (Greenberg *et al*, 1997; Sole *et al*, 2005; Bernasconi *et al*, 2007; Malcovati *et al*, 2007; Brunning *et al*, 2008; Schanz *et al*, 2012). The diagnosis and classification of MDS are among the most difficult of the myeloid neoplasms (Valent *et al*, 2007; Brunning *et al*, 2008; Tefferi & Vardiman, 2009). Diagnostic problems arise when the clinical and laboratory findings suggest MDS but the morphological features are inconclusive. Conventional karyotyping is an essential tool in these cases because some specific cytogenetic abnormalities are considered presumptive evidence for MDS (Brunnering *et al*, 2008).

Trisomy 8 (tr8 or + 8) as a single anomaly is present in about 11% of *de novo* MDS with an abnormal karyotype (Paulsson & Johansson, 2007; Mitelman *et al*, 2011), and represents about 5% of all MDS. Although trisomy 8 is the most common cytogenetic chromosomal gain in MDS, the finding of trisomy 8 is not definitive evidence for the diagnosis of MDS in the absence of morphological criteria of dysplasia (Brunnering *et al*, 2008).

The outcome of MDS with trisomy 8 as a sole change varies greatly (Yunis *et al*, 1988; Nowell & Besa, 1989; Sole *et al*, 1992, 2000, 2005; Morel *et al*, 1993; Bernasconi *et al*, 2007; Schanz *et al*, 2011); but, according to the International Prognostic Scoring System (IPSS), isolated trisomy 8 is included in the intermediate cytogenetic risk group (Greenberg *et al*, 1997). On the other hand, there are very few studies that have analysed the impact of additional karyotypic abnormalities (Haase *et al*, 2007; Paulsson & Johansson, 2007).

The present study aimed to define the biological characteristics of *de novo* MDS with trisomy 8 as a sole change, to clarify the prognostic impact of trisomy 8 as a single anomaly, and finally, to elucidate the importance of the addition of other chromosomal aberrations in terms of OS and acute myeloid leukaemia (AML) transformation, of patients that are included on the registry of the Spanish MDS group (Grupo Español de SMD; GESMD).

Materials and methods

Patients

Between 1980 and 2011, 3677 patients from 106 Spanish centres had been diagnosed with MDS and subsequently had been recorded in the GESMD registry. A total of 257 cases

diagnosed with MDS with isolated + 8 or with trisomy 8 and other additional cytogenetic aberrations were collected from this registry. The diagnosis of the patients were reviewed and reclassified according to World Health Organization (WHO) classification of 2008 (Brunnering *et al*, 2008) as follows: Refractory cytopenia with unilineage dysplasia (RCUD), refractory anaemia with ring sideroblasts (RARS), refractory cytopenia with multilineage dysplasia (RCMD), refractory anaemia with excess of blasts type 1 (RAEB-1), refractory anaemia with excess of blasts type 2 (RAEB-2) and myelodysplastic syndrome-unclassified (MDS-U). Hence, 107 cases without sufficient criteria for MDS as well as patients with chronic myelomonocytic leukaemia (CMML) and cases with more than 20% bone marrow blasts were excluded from the study. Cytogenetic formulation was also reviewed; 16 cases with MDS and trisomy 8 had an incomplete International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) record (Shaffer *et al*, 2012) and were also excluded. After this revision the data of 134 patients could be used; 72 with trisomy 8 as a single anomaly and 62 with trisomy 8 plus other cytogenetic aberrations.

The thresholds used to assess the presence of cytopenias, as recommended in the IPSS, were haemoglobin <100 g/l, absolute neutrophil count (ANC) < $1.8 \times 10^9/l$ and platelet count < $100 \times 10^9/l$ (Greenberg *et al*, 1997; Brunning *et al*, 2008). Patients were stratified into low, intermediate-1, intermediate-2 and high-risk groups according to the IPSS criteria (Greenberg *et al*, 1997). Patients were also grouped in four categories of karyotype complexity: isolated trisomy 8 (tr8), trisomy 8 plus one additional abnormality (tr8 + 1), trisomy 8 plus two additional abnormalities (tr8 + 2) and trisomy 8 plus three or more additional abnormalities (tr8 + ≥ 3) (Table I).

Eight of 134 patients with trisomy 8 received chemotherapy treatment, however, seven of them had already transformed to AML. The remaining patients received supportive care. The study was conducted fulfilling the biomedical Helsinki Declaration of research guidelines.

In addition, patients in the GESMD registry database with *de novo* MDS with a normal karyotype were reviewed to meet the WHO classification (2008) criteria (Brunnering *et al*, 2008); 1676 of them could be used to compare with the series of cases with isolated trisomy 8 in terms of OS and time to AML evolution.

Cytogenetics

All the bone marrow chromosome studies were performed following chromosome-banding procedures and at least 20

Table I. Patients characteristics of MDS with trisomy 8.

	Median (Q1–Q3)	Number of patients, <i>n</i> (%)
Total number of patients		134
Age (years)	72 (66–79)	133
<60		14 (10.5)
≥ 60		119 (85.5)
Sex		134
Male		81 (60.4)
Female		53 (39.6)
Haemoglobin (g/l)	96 (83–111)	131
<100		76 (58)
≥ 100		55 (42)
ANC ($\times 10^9/l$)	2.2 (0.76–2.8)	128
<1.8		66 (51.6)
≥ 1.8		62 (48.4)
Platelet count ($\times 10^9/l$)	176 (58–255.8)	130
<100		53 (40.8)
≥ 100		77 (59.2)
BM blasts (%)	5 (1–8)	130
<5		71 (54.6)
5–10		42 (32.3)
11–19		17 (13.1)
Cytopenias		127
None		20 (15.8)
One		45 (35.4)
Two		39 (30.7)
Three		23 (18.1)
WHO 2008 subtype		134
RCUD		15 (11.2)
RARS		11 (8.2)
RCMD		39 (29.1)
RAEB-1		34 (25.4)
RAEB-2		27 (20.1)
MDS-U		8 (6)
Karyotype complexity		134
tr8 alone		72 (53.7)
tr8 + 1 abnormality		31 (23.1)
tr8 + 2 abnormalities		8 (6)
tr8 + ≥ 3 abnormalities		23 (17.2)
Percentage of metaphases with + 8		106
<100%		89 (83.1)
100%		17 (15.9)
IPSS risk group		119
Low		2 (1.6)
Intermediate-1		66 (55.5)
Intermediate-2		36 (30.3)
High		15 (12.6)

MDS, Myelodysplastic syndromes; ANC, absolute neutrophil count; BM, bone marrow; WHO, World Health Organization; RCUD, refractory cytopenia with uniilineage dysplasia; RARS, refractory anaemia with ringed sideroblasts; RCMD, refractory cytopenia with multilineage dysplasia; RAEB, refractory anaemia with excess of blasts; MDS-U, MDS unclassifiable; tr8, +8, trisomy 8; IPSS, International Prognostic Scoring System.

Q1: percentile 25; Q3: percentile 75.

metaphases were analysed. Abnormal clones were described in accordance with the 2009 ISCN (Shaffer *et al*, 2009). Based on these guidelines, a clone was defined by two cells showing the same gain of chromosomal material or the same structural aberration, or by at least three cells showing loss of the same chromosome. Karyotypic aberrations were counted using the consensus counting guidelines developed by International Working Group on MDS Cytogenetics (Chun *et al*, 2010). Complex karyotype was considered when there were three or more independent alterations in at least two cells. If two or more clones with two aberrations were present in the same patient, it was also considered as a complex karyotype. In addition, we divided cases with complex karyotype in two subgroups: MDS with three aberrations and MDS with more than three (Schanz *et al*, 2012).

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out in the overall series of patients and also in patients with MDS with isolated trisomy 8, to define the clinical and diagnostic characteristics of this group. Hence, the other karyotype complexity groups were also studied.

The following initial variables were analysed at univariate level for their possible association with the OS or evolution to AML: age, sex, haemoglobin level, ANC and platelet count, number of cytopenias and percentage of bone marrow blasts at diagnosis. The WHO 2008 classification (Brunning *et al*, 2008) and IPSS (Greenberg *et al*, 1997) were taken as models to establish all cut-off points. Finally, WHO 2008 classification groups and IPSS risk categories were also evaluated. OS and AML transformation analysis were performed by using the Kaplan–Meier method followed by the log-rank test (Kaplan & Meier, 1958; Mantel, 1966; Peto *et al*, 1976). OS was calculated in months from date of MDS diagnosis until date of death or last follow-up. The time to AML transformation was the number of months elapsed between MDS diagnosis and the development of AML. All univariate tests were two tailed and, after Bonferroni correction, *P*-values < 0.001 were considered as significant. Finally, Cox proportional hazards multivariate model was used to define the OS and to assess the relevant prognostic variables (Cox, 1972). For multivariate analysis, a *P*-value < 0.05 was considered significant.

The statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software, version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Patient characteristics

Among 3677 patients of the MDS registry of GESMD, 134 patients with trisomy 8 fulfilled the inclusion criteria for the current study according to the WHO 2008 classification

Table II. Patient characteristics according to the karyotype complexity.

	Trisomy 8 (tr8) alone [1]		tr8 + 1 abnormality [2]		tr8 + 2 abnormalities [3]		tr8 + ≥ 3 abnormalities [4]	
	Median (Q1–Q3)	n (%)	Median (Q1–Q3)	n (%)	Median (Q1–Q3)	n (%)	Median (Q1–Q3)	n (%)
Age (years)	72 (59–85)	71	68 (63–79)	31	66 (51–81)	8	76 (68–79)	23
<60		8 (11.3)		2 (6.5)		3 (37.5)		1 (4.3)
≥ 60		63 (88.7)		29 (93.5)		5 (62.5)		22 (95.7)
Sex	–	72	–	31	–	8	–	23
Male		48 (66.7)		19 (61.3)		3 (37.5)		11 (47.8)
Female		24 (33.3)		12 (38.7)		5 (62.5)		12 (52.2)
Hb (g/l)	96 (23)*	71	94 (18.3)*	29	97 (21.8)*	8	92 (18.1)*	23
<100		41 (57.7)		19 (65.5)		3 (37.5)		13 (56.5)
≥ 100		30 (42.3)		10 (34.5)		5 (62.5)		10 (43.5)
ANC (×10 ⁹ /l)	2.1 (1–3.6)	69	1.56 (0.8–2.6)	29	1.6 (0.4–2.7)	8	1.1 (0.9–1.1)	22
<1.8		30 (43.5)		15 (51.7)		6 (75)		15 (68.2)
≥ 1.8		39 (56.5)		14 (48.3)		2 (25)		7 (31.8)
Platelet count (×10 ⁹ /l)	155 (67–291)	71	165.5 (78–261)	28	144 (88–260.7)	8	52 (27–99)	23
<100		26 (36.6)		8 (28.6)		1 (12.5)		18 (78.3)
≥ 100		45 (63.4)		20 (71.4)		7 (87.5)		5 (21.7)
BM blasts (%)	4 (1–8)	72	2.5 (1–6)	25	5.5 (2–10)	8	6 (2–11)	23
<5		40 (55.6)		18 (66.7)		3 (37.5)		10 (43.5)
5–10		27 (37.5)		4 (14.8)		4 (50)		7 (30.4)
11–19		5 (6.9)		5 (18.5)		1 (12.5)		6 (26.1)
Cytopenias		69		28		8		22
None		13 (18.8)		5 (16.1)		1 (12.5)		1 (4.3)
One		26 (37.7)		10 (32.3)		4 (50)		5 (21.7)
Two		20 (29)		9 (29)		3 (37.5)		7 (30.4)
Three		10 (14.5)		4 (12.9)		0 (0)		9 (39.1)
IPSS risk group		65		25		8		21
Low		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)
Intermediate-1		45 (69.2)		17 (68)		4 (50)		2 (9.5)
Intermediate-2		16 (24.6)		4 (16)		3 (37.5)		13 (61.9)
High		4 (6.2)		4 (16)		1 (12.5)		6 (28.6)
WHO 2008 subtype		72		31		8		23
RCUD		9 (12.5)		4 (12.9)		1 (12.5)		1 (4.3)
RARS		7 (9.7)		5 (16.1)		0 (0)		0 (0)
RCMD/RCMD-RS		21 (29.2)		8 (25.8)		1 (12.5)		9 (39.1)
RAEB-1		18 (25)		6 (19.4)		4 (50)		6 (26.1)
RAEB-2		14 (19.4)		5 (16.1)		1 (12.5)		7 (30.4)
MDS-U		3 (4.2)		3 (9.7)		1 (12.5)		0 (0)

ANC, absolute neutrophil count; BM, bone marrow; IPSS, International Prognostic System; WHO, World Health Organization; RCUD, refractory cytopenia with unilineage dysplasia; RARS, refractory anaemia with ringed sideroblasts; RAEB, refractory anaemia with excess of blasts; RCMD, refractory cytopenia with multilineage dysplasia; RCMD-RS, RCMD with ringed sideroblasts; MDS-U, MDS unclassifiable; tr8, trisomy 8.

Q1: percentile 25; Q3: percentile 75.

*This value corresponds to the mean and standard deviation, in brackets.

(Brunnering *et al*, 2008): 72 (53.7%) had trisomy 8 as a sole abnormality, 31 (23.1%) had one additional abnormality, 8 (6%) had two additional abnormalities and 23 (17.2%) had three or more additional abnormalities.

Trisomy 8 as a sole change

The 72 patients with trisomy 8 as a sole change were analysed as a whole. Forty-eight patients were male (66.7%) and 24 were female (33.3%), with median age of 72 years (range,

27–88). The median haemoglobin level, ANC and platelet count were 96 g/l (range, 44–149), 2.1 × 10⁹/l (range, 0.1–13.6) and 155 × 10⁹/l (range, 1–767), respectively. The median bone marrow blasts was 4% (range, 0–19). Most of the patients (80%) had one or more cytopenias: 57.7% had haemoglobin level <100 g/l, 43.5% had ANC <1.8 × 10⁹/l and 36.6% had a platelet count <100 × 10⁹/l. By WHO 2008 criteria (Brunnering *et al*, 2008), patients were classified as follows: 9 RA (12.5%), 7 RARS (9.7%), 21 RCMD/RCMD-RS (29.2%), 18 RAEB-1 (25%), 14 RAEB-2 (19.4%) and 3

Table III. Univariate analysis according to karyotype complexity.

	P-value					
	[1] vs. [2]	[1] vs. [3]	[1] vs. [4]	[2] vs. [3]	[2] vs. [4]	[3] vs. [4]
Age	0.357*	0.316*	0.348*	0.457*	0.189*	0.189*
Sex	0.659†	0.103†	0.072†	0.254‡	0.238†	1‡
Haemoglobin (g/l)	0.759§	0.602§	0.710§	0.452§	0.931§	0.421§
Absolute neutrophil count ($\times 10^9/l$)	0.292*	0.275*	0.005*	0.610*	0.086*	0.684*
Platelet count ($\times 10^9/l$)	0.850*	0.778*	<0.001*	0.935*	<0.001*	<0.001*
Bone marrow blasts (%)*	0.367*	0.540*	0.375*	0.270*	0.244*	0.888*
Cytopenias	1‡	0.708‡	0.008‡	0.718‡	0.054‡	0.06‡
IPSS risk group	0.133‡	0.556‡	<0.001‡	0.421‡	<0.001‡	0.08‡
WHO 2008 subtype	0.587‡	0.703‡	0.487‡	0.562‡	0.08‡	0.250‡

IPSS, International Prognostic System; WHO, World Health Organization.

[1] tr8; [2] tr8 + 1; [3] tr8 + 2; [4] tr8 + 3.

*Mann–Whitney *U*.

†Chi-square.

‡Fisher's exact test.

§*t*-student.

MDS-U (4.2%). According to IPSS almost all patients were included in the intermediate-1 or intermediate-2 groups. (Table II).

Only 11 out of 72 patients showed trisomy 8 in all metaphases. In terms of OS, no statistical differences were found between patients with all metaphases bearing +8 and patients with some normal metaphases (median OS, 64 months vs. 29 months, $P = 0.62$).

Trisomy 8 in overall series

The haemoglobin level, ANC, platelet count, number of cytopenias, proportion of bone marrow blasts, WHO subtypes and IPSS scores for the overall series were described in Table I.

Among cases with tr8 + 1, the most common abnormality added to trisomy 8 was del(5q) ($n = 9$, 29%) followed by del(11q) ($n = 3$, 9.6%), and only one case had an unrelated clone. Almost all cases of trisomy 8 with other abnormalities had also normal metaphases (83.1% of cases).

No statistical differences were found when comparing clinical or analytic characteristics among the isolated tr8, tr8 + 1 and tr8 + 2 groups. However, a lower ANC was seen with the addition of cytogenetic alterations to trisomy 8. Median platelet counts between the tr8 + ≥ 3 group and the other groups were statistically different ($P < 0.001$). (Table III).

Univariate analyses

The results after performing Kaplan–Meier analysis for overall survival and risk of leukaemic transformation in the whole series are shown in Table IVA. The median follow up was 16 months (range, 1–122) and the median OS was 29.6 months. Thirty-three patients (24.6%) evolved to AML during the follow-up.

At the beginning, the series was analysed as a whole. Among clinical parameters, age and gender did not have any impact on OS or on AML transformation. The ANC, platelet count, number of cytopenias and bone marrow blast percentage had a clear impact on OS ($P < 0.001$ for all the parameters) but not on AML transformation ($P = 0.314$, $P = 0.117$, $P = 0.242$ and $P = 0.099$, respectively). Platelet count $< 100 \times 10^9/l$ was a very unfavourable prognostic factor (median OS, 9 months). Patients with $\geq 5\%$ bone marrow blasts had worse prognosis than patients with blasts $< 5\%$ ($P < 0.001$). Hence, the OS and risk of AML transformation were also differentiated by the prognostic IPSS subgroups and WHO classification.

The data of patients with normal karyotype who were listed in the GESMD registry ($n = 1676$) were used to analyse the prognostic impact of bearing trisomy 8, in terms of OS and time to AML transformation. The median survival for the karyotype complexity groups (normal, tr8, tr8 + 1, tr8 + 2, tr8 + ≥ 3) was 99, 34.3, 40, 23.4 and 5.8 months respectively; with an OS statistically worse for tr8 + ≥ 3 patients ($P < 0.001$). For OS and AML transformation, no significant differences were found between tr8 and tr8 + 1 ($P = 0.34$) or between tr8 + 1 and tr8 + 2 ($P = 0.267$). Subsequently, another two groups were analysed: tr8, tr8 + 1 and tr8 + 2 vs. tr8 + ≥ 3 , which identified statistically significant differences in median OS (34.3 vs. 5.8, $P < 0.001$) (Fig 1).

Univariate analysis of prognostic factors for the 72 cases of MDS with isolated trisomy 8 was also performed separately. For these patients the median OS was 34.3 months and 13 patients (18%) evolved to AML. Our data indicate that in this subgroup, platelet count, number of cytopenias, bone marrow blast percentage, IPSS risk groups and WHO classifications showed a close association with OS and AML transformation. The worse prognosis was shown for low

Table IV. Results of univariate analyses of prognostic factors for overall survival and AML transformation in the (A) overall series and (B) MDS with trisomy 8 as a sole anomaly.

	Overall survival				AML transformation			
	<i>n</i> (%)	Median survival (months)	Patients alive at 5 years (%)	<i>P</i> -value	<i>n</i> (%)	Time to 25% probability (months)	Cumulative probability of AML evolution at 2 years (%)	<i>P</i> -value
(A)								
Age	116 (86.6)			0.773	33 (24.6)			0.767
<60 years	11	13.5	10		6 (18.2)	20	45.5	
≥ 60 years	105	5.4	14.3		27 (81.8)	19.6	20.9	
Sex	117 (87)			0.347	33 (24.6)			0.561
Male	69 (58.9)	16.5	14.5		18 (54.5)	14.8	23.2	
Female	48 (41.1)	39.7	14.6		15 (45.5)	34	22.9	
Haemoglobin	115 (85.8)			0.034	32 (23.8)			0.595
<100 g/l	67 (58.2)	13.9	11.9		18 (54.5)	16	23.8	
≥ 100 g/l	48 (41.7)	39.7	18.7		14 (31.6)	30.5	20.8	
ANC	112 (83.5)			<0.001	32 (23.8)			0.314
<1.8 × 10 ⁹ /l	58 (51.8)	13.9	10.3		19 (59.3)	20	25.8	
≥ 1.8 × 10 ⁹ /l	54 (48.2)	50.9	22.9		13 (40.6)	19.5	20.3	
Platelet count	114 (85.1)			<0.001	32 (23.8)			0.117
<100 × 10 ⁹ /l	45 (39.4)	9	4.4		16 (50)	14.8	33.3	
≥ 100 × 10 ⁹ /l	69 (60.63)	51.3	21.7		16 (50)	34.1	15.9	
Cytopenias	111 (82)			<0.001	32 (23.8)			0.242
None	18 (16.2)	81.6	27.7		2 (6.25)	79.4	0.05	
One	39 (35.1)	50.9	23.1		13 (40.6)	23.1	25.6	
Two	34 (30.6)	13.9	5.8		11 (34.3)	18.9	26.5	
Three	20 (18.1)	6.7	5		6 (18.7)	14.8	30	
BM blasts	114 (85.1)			<0.001	31 (23.1)			0.099
<5%	65 (57)	50.9	23.1		9 (29.1)	30.5	9.2	
5–10%	35 (30.7)	11.5	5.7		13 (41.9)	23.1	28.6	
11–20%	14 (12.2)	6.6	0		9 (29.1)	12.5	64.3	
IPSS risk group	107 (60.4)			<0.001	31 (23.1)			0.031
Low	0 (0)	0	0		0 (0)	0	0	
Intermediate-1	62 (57.9)	63.5	25.8		15 (32.5)	48.4	16.13	
Intermediate-2	33 (30.8)	9.2	3		9 (25.6)	30.5	24.2	
High	12 (11.2)	6.5	0		7 (14.9)	22.6	58.3	
WHO 2008 subtype	117 (87)			<0.001	33 (24.6)			0.186
RCUD	14 (12)	34.3	23.1		3 (9.1)	40	14.13	
RARS	9 (7.8)	81.6	60		1 (3)	79.4	11.1	
RCMD/RCMD-RS	36 (30.7)	31.9	16.6		5 (15.2)	19.5	11.1	
RAEB-1	28 (23.9)	10.5	7.1		14 (42.4)	23.1	50	
RAEB-2	23 (19.6)	9.9	0		10 (30.3)	14.8	34.17	
MDS-U	7 (6)	63.5	42.8		0 (0)	0	0	
Karyotype complexity	117 (87)			<0.001	33 (24.6)			0.407
tr8 alone	63 (53.8)	34.3	20.6		13 (39.4)	18.9	17.5	
tr8 + 1	26 (22.2)	40	11.5		9 (27.3)	20	26.9	
tr8 + 2	8 (6.8)	23.4	12.5		5 (15.2)	34.1	37.5	
tr8 + ≥ 3	20 (17.1)	5.8	0		6 (18.2)	12.5	30	
(B)								
Age	62 (86.1)			0.714				0.89
<60 years	5 (8.1)	13.53	20		1	12.8	20	
≥ 60 years	57 (91.9)	34.33	21.1		12	18.9	17.5	
Sex	63 (87.5)			0.122				0.311
Male	42 (66.6)	29.1	19.1		9	16	19	
Female	21 (33.4)	69.2	23.8		4	19	75	
Haemoglobin	63 (87.5)			0.038				0.498
<100 g/l	36 (57.1)	13.9	19.4		10	16	25	
≥ 100 g/l	27 (42.9)	63.5	22.2		3	30.5	7.4	

Table IV. (Continued)

	Overall survival			AML transformation				
	<i>n</i> (%)	Median survival (months)	Patients alive at 5 years (%)	<i>P</i> -value	<i>n</i> (%)	Time to 25% probability (months)	Cumulative probability of AML evolution at 2 years (%)	<i>P</i> -value
ANC	61 (84.7)			0.064				0.542
<1.8 × 10 ⁹ /l	27 (44.3)	20.6	18.5		6	19	18.5	
≥ 1.8 × 10 ⁹ /l	34 (55.7)	69.25	23.5		7	23	17.6	
Platelet count	63 (87.5)			<0.001				0.458
<100 × 10 ⁹ /l	22 (34.9)	9.6	9		7	19	27.3	
≥ 100 × 10 ⁹ /l	41 (65.1)	69.25	26.8		6	21.6	12.2	
Cytopenias	61 (84.7)			<0.001				0.239
None	12 (19.6)	86.4	25		0	–	0	
One	23 (37.7)	69.25	30.4		6	23	21.7	
Two	17 (27.9)	11.4	11.7		4	19	17.6	
Three	9 (14.7)	7.8	11.1		3	12.8	33.3	
BM blasts	63 (87.5)			<0.001				0.394
<5%	37 (58.7)	64.2	32.4		3	30.5	5.4	
5–10%	21 (33.3)	10.5	4.8		8	16	33.3	
11–20%	5 (7.9)	7.8	0		2	10.2	40	
IPSS risk group	59 (81.9)			<0.001				0.013
Low	0 (0)	0	0		0	0	0	
Intermediate-1	41 (69.5)	69.25	31.7		7	30.5	12.2	
Intermediate-2	14 (23.7)	8.2	0		5	10.2	35.7	
High	4 (6.8)	6.5	0		1	7.3	25	
WHO 2008 subtype	63 (87.5)			<0.001				0.813
RCUD	9 (12.7)	34.3	22.2		1	19	11.1	
RARS	6 (11.1)	86	50		0	0	0	
RCMD/RCMD-RS	19 (31.8)	86.4	31.2		2	30.5	5.3	
RAEB-1	13 (23.7)	9.5	6.6		7	23	46.15	
RAEB-2	13 (15.9)	9.9	0		3	16	23.1	
MDS-U	3 (4.8)	64.1	100		0	0	0	

AML, acute myeloid leukaemia; ANC, absolute neutrophil count; BM, bone marrow; IPSS, International Prognostic Scoring System WHO, World Health organization; RCUD, refractory cytopenia with unilineage dysplasia; RARS, refractory anaemia with ringed sideroblasts; RCMD, refractory cytopenia with multilineage dysplasia; RCMD-RS, RCMD with ringed sideroblasts; RAEB, refractory anaemia with excess of blasts; MDS-U, MDS unclassifiable; tr8, trisomy 8.

platelet count (median survival: 9.6 months) and the median survival for none, one, two or three cytopenias was 86.4, 69.2, 11.4, 7.8 months, respectively ($P < 0.001$) (Table IVB).

Finally, we compared MDS with trisomy 8 as a sole change with MDS with normal karyotype. We distinguished two groups of patients: one with <5% bone marrow blasts and other with ≥ 5%. The median OS for patients with <5% bone marrow blasts was 64.2 [95% confidence interval (CI), 31.5–96.7] vs. 82.3 (CI, 69.5–95) months, for MDS with isolated trisomy 8 and normal karyotype respectively ($P = 0.48$), whereas for the ≥ 5% bone marrow blasts group it was 9.5 (CI, 22.7–34.3) vs. 28.5 (CI, 7.1–12.1) months ($P < 0.001$), respectively (Fig 2).

Multivariate analyses

In patients with isolated trisomy 8 the following parameters showed prognostic impact regarding OS (Table V): platelet

count and bone marrow blast percentage. In fact, platelet count <100 × 10⁹/l and bone marrow blasts ≥ 5% were related with a poor prognosis. The platelet count was the variable with more extreme risk groups, with a Hazard Ratio (HR) of 3.4 ($P < 0.02$) for OS.

In multivariate analysis for the overall series of patients with trisomy 8 the variables haemoglobin level, platelet count, bone marrow blasts and karyotype complexity had an independent prognostic impact. In agreement with the results of univariate analysis, the addition of more aberrations to trisomy 8 was strongly associated with poor prognosis (tr8 + 2 and tr8 + ≥ 3 vs. tr8 and tr8 + 1) (HR 3.2; $P < 0.001$) (Table V).

Discussion

Trisomy 8 as a sole change is the most frequent numerical chromosome aberration in MDS (Paulsson & Johansson, 2007; Mitelman *et al*, 2011). However, the prognosis and

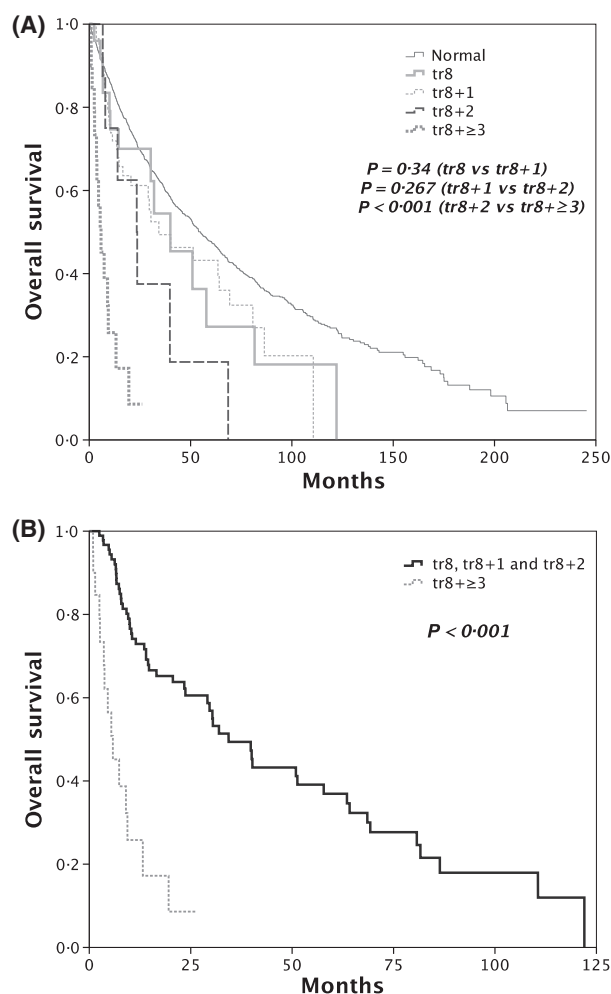


Fig 1. Overall survival curves according to defined cytogenetic subgroups (tr8, tr8 + 1, tr8 + 2 and tr8 + ≥ 3) by Kaplan–Meier analysis.

clinical impact of this aberration remain unclear (Haase *et al*, 2007; Paulsson & Johansson, 2007). Our group designed this study in a large series of patients, in order to clarify the significance of trisomy 8 as a sole change in MDS and to improve the knowledge of the prognostic value of additional aberrations.

Some previous studies have already analysed the prognostic impact of trisomy 8 as a sole change but all of them reported a small cohort of MDS with trisomy 8 and inside an overall MDS cytogenetic analysis (Morel *et al*, 1993; Toyama *et al*, 1993; Sole *et al*, 2000, 2005; Bernasconi *et al*, 2007; Haase *et al*, 2007; Pozdnyakova *et al*, 2008; Schanz *et al*, 2011, 2012). Some reports suggested that isolated trisomy 8 in MDS had a poor prognosis (Sole *et al*, 2000; Bernasconi *et al*, 2007) and other studies suggested an intermediate prognosis (Greenberg *et al*, 1997; Sole *et al*, 2005; Haase *et al*, 2007). Our study analysed the largest series of *de novo* MDS with trisomy 8, and contrary to other studies, we excluded CMML and cases in which the blasts ranged between 20% and 30%.

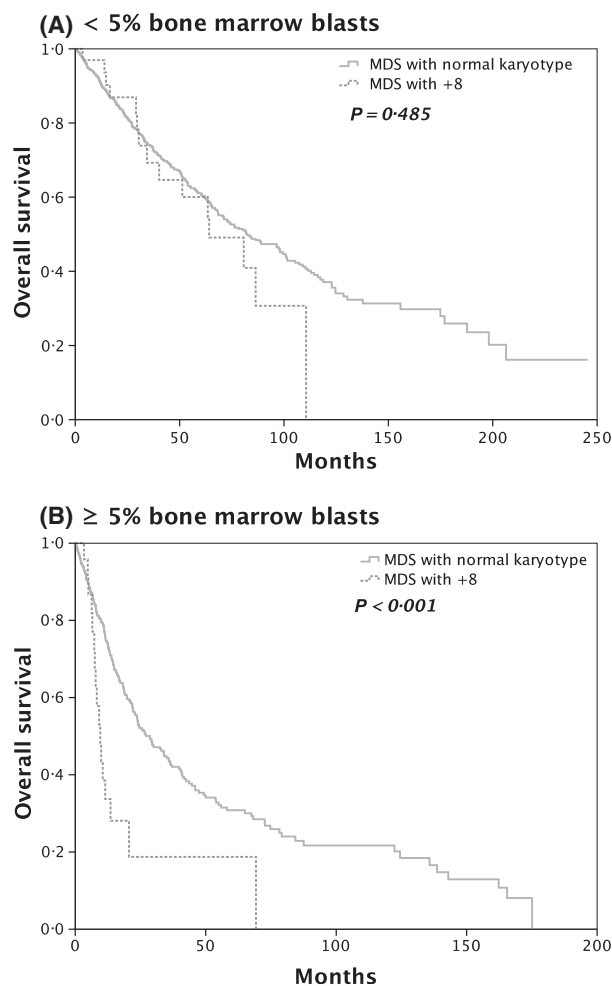


Fig 2. Overall survival curves according to MDS with normal karyotype and MDS with trisomy 8 as a single anomaly depending of bone marrow blasts count by Kaplan–Meier analysis.

The incidence of trisomy 8 among cases with abnormal karyotype was reported to be around 16% in MDS, and between 5% and 11% as a sole change (Greenberg *et al*, 1997; Sole *et al*, 2005; Bernasconi *et al*, 2007; Haase *et al*, 2007; Malcovati *et al*, 2007; Paulsson & Johansson, 2007; Mitelman *et al*, 2011; Schanz *et al*, 2011, 2012). In the GESMD registry, trisomy 8 was present in 7% of the overall series, but only 3.6% fulfilled the inclusion criteria in current study. When only MDS with abnormal karyotype were analysed, MDS with trisomy 8 represents 13% of them.

Among patients with trisomy 8 included in the present study more than a half had this aberration as a sole change (53.7%). Isolated trisomy 8 in MDS was more common over 60 years (88.7%) and twice as many men as women were found (ratio 2:1) supporting previous reports (Pedersen, 1997; Sole *et al*, 2005). Most of patients had one or more cytopenia (80%). Our results were in accordance with the new proposal for cytogenetic stratification recently published (Schanz *et al*, 2012). Both, degree and number of cytopenias

Table V. Results of multivariate analysis of prognostic factors for overall survival in MDS with trisomy 8 as a single anomaly and in the overall series.

Variable	Categories	MDS with + 8		Overall series	
		Hazard ratio (95% CI)	P-value	Hazard ratio (95% CI)	P-value
Haemoglobin	<100 g/l vs. \geq 100 g/l	2.2 (0.9–5.5)	0.09	1.9 (1.07–3.3)	0.027
Platelet count	<100 \times 10 ⁹ /l vs. \geq 100 \times 10 ⁹ /l	3.4 (1.2–9.1)	0.02	4.3 (2.3–7.9)	<0.001
BM blasts	5–20% vs. <5%	2.5 (1.2–5.03)	0.01	2.8 (1.5–4.9)	<0.001
Karyotype complexity	tr8 + \geq 2 vs. tr8 and tr8 + 1	–	–	3.2 (1.8–5.7)	<0.001
Sex	Male vs. female	1.8 (0.8–4.5)	0.17	1.6 (0.9–2.8)	0.108
Age	\geq 60 years vs. <60 years	2.7 (0.5–15.4)	0.24	2.3 (0.94–5.9)	0.067

MDS, Myelodysplastic syndromes; CI, confidence interval; BM, bone marrow; tr8, trisomy8; +8, isolated trisomy 8.

had impact on OS. Regarding AML risk transformation, our series did not include enough patients to establish conclusions. The worse prognosis for OS was shown for low platelet count and higher number of cytopenias. The bad prognosis of low platelet count had already been described (Kantarjian *et al*, 2008), and a recent report indicated that MDS patients with low or intermediate-1 IPSS risk score and severe thrombocytopenia (<30 \times 10⁹/l) had a very poor prognosis (Gonzalez-Porrás *et al*, 2011). For MDS with isolated trisomy 8, in our study, there was almost the same number of cases with <5% bone marrow blasts than with \geq 5%, with a shorter survival for patients with \geq 5% blasts. Using the WHO 2001 classification (Brunning *et al*, 2001), Haase *et al* (2007) reported that in MDS with trisomy 8 as a sole anomaly the main groups were RCMD/RCMD-RS and RAEB-2. The use of the WHO 2008 classification (Brunning *et al*, 2008) in the present study identified a similar number of patients in the RCMD/RCMD-RS, RAEB-1 and RAEB-2 groups. By IPSS cytogenetic prognostic subgroups, MDS with isolated trisomy 8 was categorized as expected: 69.5% in intermediate-1, 23.7% in intermediate-2 and 6.8% in high risk.

Significant differences were seen when the median survival time of the 1676 MDS with normal karyotype of the GESMD registry was compared with the 72 MDS with trisomy 8 as a sole change, with poorest prognosis for patients with trisomy 8 as a single anomaly (88 months vs. 34.3 months; $P = 0.001$). This data supports the idea of the negative impact of trisomy 8 in MDS. Although, trisomy 8 has been considered an alteration which confers an intermediate prognosis to MDS (Morel *et al*, 1993; Greenberg *et al*, 1997; Sole *et al*, 2005; Schanz *et al*, 2012), some studies have suggested that trisomy 8 confers a worse outcome than other cytogenetic alterations included in the intermediate IPSS risk group (Bernasconi *et al*, 2007). These results could explain the high incidence of trisomy 8 in cases with RAEB-1 and RAEB-2. The median OS reported for patients of intermediate IPSS cytogenetic subgroup ranged between 23 and 32 months, and for patients with trisomy 8 as a sole change between 11 and 25 months (Greenberg *et al*, 1997; Sole *et al*, 2005; Bernasconi *et al*, 2007; Haase *et al*, 2007; Schanz *et al*, 2012). Our results were not in accordance with these data; in

our study the median OS for patients with isolated trisomy 8 was 34.3 months. The worst outcome reported in the previous studies is explained by the presence of cases with more than 20% of blasts and CMML. Pozdnyakova *et al* (2008) reported an OS of 19 months for *de novo* MDS with isolated trisomy 8, but in their series, most of the patients had been treated with active experimental drugs. This difference was also maintained for risk of AML evolution. Referring to the previous reports, the frequency of patients who progress to AML varied from 8% to 63% (Morel *et al*, 1993; Sole *et al*, 2000, 2005; Paulsson *et al*, 2001; Bernasconi *et al*, 2007). In our series 18% of patients diagnosed of MDS with trisomy 8 progressed to AML, and the probability of AML transformation was 17.7% at 2 years.

The new proposals for cytogenetic categorization have regarded isolated trisomy 8, like previous IPSS classification, as an intermediate prognosis alteration (Schanz *et al*, 2012). These proposals published a median OS for MDS with +8 of 23 months and a median time to AML transformation of 38.6 months, but they also considered CMML and cases with more than 20% of blasts (Schanz *et al*, 2012).

According to our study, MDS patients with isolated trisomy 8 should be included in the intermediate cytogenetic risk group. We observed that patients with <5% bone marrow blast bearing isolated trisomy 8 had the same prognosis as patients with <5% blasts and a normal karyotype. However, when the bone marrow blasts count is \geq 5%, isolated trisomy 8 implies a worse prognosis than a normal karyotype. This last finding is the most interesting and relevant result of our study and should be confirmed in a larger series of patients.

Trisomy 8 in association with other abnormalities

Trisomy 8 occurs in association with other alterations in around 5% of MDS with abnormal karyotype (Haase *et al*, 2007; Paulsson & Johansson, 2007; Mitelman *et al*, 2011). Based on Mitelman database (Mitelman *et al*, 2011) the most common alterations in association to trisomy 8 were $-5/\text{del}$ (5q) often in complex karyotypes, t(1;7)(q10;p10), and del (20q) mainly in simple karyotypes. In our group of patients with tr8 + 1, the most common abnormality added to trisomy 8 was del(5q) followed by del(11q). Haase *et al* (2007)

found a better survival for patients with an additional abnormality to trisomy 8 than for patients with isolated trisomy 8 (median of: 44 months vs. 22 months) Probably, these results are explained by the high presence of del(5q), but we should not forget that CMML and >20% of blasts cases were included in that study. We did not find the same result; in fact, no difference between median OS of tr8 and tr8 + 1 was found ($P = 0.93$). In the tr8 + 2 group, it is interesting that no specific alteration added to trisomy 8 predominated and only one patient had del(7q) cytogenetic aberration. Furthermore, the small number of patients in the tr8 + 2 group must be considered to correctly interpret these results. That conclusion was in accordance with the recently published new proposals for MDS cytogenetic scoring system, which showed a worse prognosis for MDS with more than three abnormalities than for cases with three cytogenetic abnormalities (Schanz *et al*, 2012). Interestingly, in our series, patients with tr8 + 2 should also be included in the intermediate risk category and not in the high risk. In the multivariate analyses the prognosis was poorer for patients with complex karyotype with HR 3.2 (tr8 and tr8 + 1 vs. tr8 + 2 and tr8 + ≥ 3). These results must be confirmed with a larger series.

It is fair to say that most of our cases of trisomy 8 with other abnormalities had normal metaphases (93%). In MDS with trisomy 8, Mallo *et al* (2011) described the finding of normal metaphases in a smaller series of patients, but these authors also included cases with additional aberrations in their analysis. They reported that the percentage of aberrant metaphases had a clear impact on the outcome in MDS with trisomy 8, with a shorter survival for cases with clone size of 100% (Mallo *et al*, 2011). In contrast, we analysed only patients diagnosed with MDS with isolated trisomy 8, and no impact was found between cases where all metaphases were affected or those with some normal ones ($P = 0.62$).

With these data the following conclusions could be established: (i) MDS with isolated trisomy 8 is more common in men, most patients present with one or more cytopenias and have median bone marrow blasts of 4%, (ii) patients with

<5% bone marrow blasts and isolated trisomy 8 have the same prognosis as those with <5% and a normal karyotype, (iii) patients with $\geq 5\%$ bone marrow blast have a shorter survival if an isolated trisomy 8 is found than if they have a normal karyotype (iv) isolated trisomy 8 should be considered in the intermediate cytogenetic risk group, and finally (v) patients with one or two additional aberrations presented a similar OS than patients with isolated trisomy 8.

Acknowledgements

The authors thank the participating GESMD groups, as well as the technicians involved in all cytogenetic laboratories.

Funding

This work was supported in part by grants from Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain (FI07/00107, CA08/00141; PI07/1009 and PI 11/02010); Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC, FEDER) (RD06/0020/0031 and RD07/0020/2004); SGR 541/2009 ('Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca', Departament d'Innovació, Universitat i Empresa); Acció COST BM0801: European Genetic and Epigenetic Study on AML and MDS; and Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH) 2011 fellowship.

Supporting Information

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

Fig S1. The most frequent additional cytogenetic aberrations added to trisomy 8 in overall series.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

References

- Bernasconi, P., Klersy, C., Boni, M., Cavigliano, P. M., Calatroni, S., Giardini, I., Rocca, B., Zappatore, R., Caresana, M., Dambrosio, I., Lazzarino, M. & Bernasconi, C. (2007) World Health Organization classification in combination with cytogenetic markers improves the prognostic stratification of patients with de novo primary myelodysplastic syndromes. *British Journal of Haematology*, **137**, 193–205.
- 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.
- Brunning, R.D., Orazi, A., Germing, U., Le Beau, M.M., Porwit, A. & Baumann, I. (2008) Myelodysplastic syndromes. In: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (ed. by S.H. Swerdlow, E. Campo, N. Lee Harris, E.S. Jaffe, S.A. Pieri & H. Stein), pp. 87–107. IARC, Lyon.
- Chun, K., Hagemeijer, A., Iqbal, A. & Slovak, M.L. (2010) 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. *Leukemia Research*, **34**, 160–165.
- Cox, D.R. (1972) Regression models and life-tables. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B, Statistical Methodology*, **34**, 187–220.
- Gonzalez-Porras, J.R., Cordoba, I., Such, E., Nomededeu, B., Vallespi, T., Carbonell, F., Luno, E., Ardanaz, M., Ramos, F., Pedro, C., Gomez, V., de Paz, R., Sanchez-Barba, M., Sanz, G.F. & Del Canizo, A.C. (2011) Prognostic impact of severe thrombocytopenia in low-risk myelodysplastic syndrome. *Cancer*, **117**, 5529–5537.
- Greenberg, P., Cox, C., LeBeau, M.M., Fenau, 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.
- Haase, D., Germing, U., Schanz, J., Pfeilstöcker, M., Nosslinger, T., Hildebrandt, B., Kundgen, A., Lubbert, M., Kunzmann, R., Giagounidis, A.A., Aul, C., Trumper, L., Krieger, O., Stauder, R., Müller, 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.
- Kantarjian, H., O'Brien, S., Ravandi, F., Cortes, J., Shan, J., Bennett, J.M., List, A., Fenaux, P., Sanz, G., Issa, J.P., Freireich, E.J. & Garcia-Manero, G. (2008) Proposal for a new risk model in myelodysplastic syndrome that accounts for events not considered in the original International Prognostic Scoring System. *Cancer*, **113**, 1351–1361.
- Kaplan, E. & Meier, P. (1958) Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of American Statistical Association*, **53**, 457–481.
- Malcovati, L., Germing, U., Kuendgen, A., Della Porta, M.G., Pascutto, C., Invernizzi, R., Giagounidis, A., Hildebrandt, B., Bernasconi, P., Knipp, S., Strupp, C., Lazzarino, M., Aul, C. & Cazzola, M. (2007) Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *Journal of Clinical Oncology*, **25**, 3503–3510.
- Mallo, M., Luno, E., Sanzo, C., Cervera, J., Haase, D., Schanz, J., Garcia-Manero, G., del Canizo, C., Sanz, G.F. & Sole, F. (2011) Clinical impact of the clone size in MDS cases with monosomy 7 or 7q deletion, trisomy 8, 20q deletion and loss of Y chromosome. *Leukemia Research*, **35**, 834–836.
- Mantel, N. (1966) Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemotherapy Reports*, **50**, 163–170.
- Mitelman, F., Johansson, B. & Mertens, F.E. (2011) Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer. <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>.
- Morel, P., Hebbbar, M., Lai, J.L., Duhamel, A., Preudhomme, C., Wattel, E., Bauters, F. & Fenaux, P. (1993) 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*, **7**, 1315–1323.
- Nowell, P.C. & Besa, E.C. (1989) Prognostic significance of single chromosome abnormalities in preleukemic states. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, **42**, 1–7.
- Paulsson, K. & Johansson, B. (2007) Trisomy 8 as the sole chromosomal aberration in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Pathologie Biologie*, **55**, 37–48.
- Paulsson, K., Sall, T., Fioretos, T., Mitelman, F. & Johansson, B. (2001) The incidence of trisomy 8 as a sole chromosomal aberration in myeloid malignancies varies in relation to gender, age, prior iatrogenic genotoxic exposure, and morphology. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, **130**, 160–165.
- Pedersen, B. (1997) MDS and AML with trisomy 8 as the sole chromosome aberration show different sex ratios and prognostic profiles: a study of 115 published cases. *American Journal of Hematology*, **56**, 224–229.
- Peto, R., Pike, M.C., Armitage, P., Breslow, N.E., Cox, D.R., Howard, S.V., Mantel, N., McPherson, K., Peto, J. & Smith, P.G. (1976) Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation of each patient. I. Introduction and design. *British Journal of Cancer*, **34**, 585–612.
- Pozdnyakova, O., Miron, P.M., Tang, G., Walter, O., Raza, A., Woda, B. & Wang, S.A. (2008) Cytogenetic abnormalities in a series of 1,029 patients with primary myelodysplastic syndromes: a report from the US with a focus on some undefined single chromosomal abnormalities. *Cancer*, **113**, 3331–3340.
- Schanz, J., Steidl, C., Fonatsch, C., Pfeilstocker, M., Nosslinger, T., Tuechler, H., Valent, P., Hildebrandt, B., Giagounidis, A., Aul, C., Lubbert, M., Stauder, R., Krieger, O., Garcia-Manero, G., Kantarjian, H., Germing, U., Haase, D. & Estey, E. (2011) 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. *Journal of Clinical Oncology*, **29**, 1963–1970.
- Schanz, J., Tuechler, H., Sole, F., Mallo, M., Luno, E., Cervera, J., Granada, I., Hildebrandt, B., Slovak, M.L., Ohyashiki, K., Steidl, C., Fonatsch, C., Pfeilstocker, M., Nosslinger, T., Valent, P., Giagounidis, A., Aul, C., Lubbert, M., Stauder, R., Krieger, O., Garcia-Manero, G., Faderl, S., Pierce, S., Le Beau, M.M., Bennett, J.M., Greenberg, P., Germing, U. & Haase, D. (2012) New comprehensive cytogenetic scoring system for primary Myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *Journal of Clinical Oncology*, **30**, 820–829.
- Shaffer, L.G., Slovak, M.L. & Campbell, L.J. (2009) ISCN 2009: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. S. Karger AG, Basel, Switzerland.
- Sole, F., Prieto, F., Badia, L., Woessner, S., Florensa, L., Caballin, M.R., Coll, M.D., Besses, C. & Sans-Sabrafen, J. (1992) Cytogenetic studies in 112 cases of untreated myelodysplastic syndromes. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, **64**, 12–20.
- Sole, F., Espinet, B., Sanz, G.F., Cervera, J., Calasanz, M.J., Luno, E., Prieto, F., Granada, I., Hernandez, J.M., Cigudosa, J.C., Diez, J.L., Bureo, E., Marques, M.L., Arranz, E., Rios, R., Martinez Climent, J.A., Vallespi, T., Florensa, L. & Woessner, S. (2000) Incidence, characterization and prognostic significance of chromosomal abnormalities in 640 patients with primary myelodysplastic syndromes. Grupo Cooperativo Espanol de Citogenetica Hematologica. *British Journal of Haematology*, **108**, 346–356.
- Sole, F., Luno, E., Sanzo, C., Espinet, B., Sanz, G.F., Cervera, J., Calasanz, M.J., Cigudosa, J.C., Milla, F., Ribera, J.M., Bureo, E., Marquez, 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.
- Tefferi, A. & Vardiman, J.W. (2009) Myelodysplastic syndromes. *New England Journal of Medicine*, **361**, 1872–1885.
- Toyama, K., Ohyashiki, K., Yoshida, Y., Abe, T., Asano, S., Hirai, H., Hirashima, K., Hotta, T., Kuramoto, A., Kuriya, S., Miyazaki, T., Kakishita, E., Mizoguchi, H., Okada, M., Shirakawa, S., Takaku, F., Tomonaga, M., Uchino, H., Yasunaga, K. & Nomura, T. (1993) Clinical implications of chromosomal abnormalities in 401 patients with myelodysplastic syndromes: a multicentric study in Japan. *Leukemia*, **7**, 499–508.
- Valent, P., Horny, H.P., Bennett, J.M., Fonatsch, C., Germing, U., Greenberg, P., Haferlach, T., Haase, D., Kolb, H.J., Krieger, O., Loken, M., van de, L.A., Ogata, K., Orfao, A., Pfeilstocker, M., Ruter, B., Sperr, W.R., Stauder, R. & Wells, D.A. (2007) Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: consensus statements and report from a working conference. *Leukemia Research*, **31**, 727–736.
- Yunis, J.J., Lobell, M., Arnesen, M.A., Oken, M.M., Mayer, M.G., Rydell, R.E. & Brunning, R.D. (1988) Refined chromosome study helps define prognostic subgroups in most patients with primary myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukaemia. *British Journal of Haematology*, **68**, 189–194.

2- Article 2. **La trisomia 8, alteració citogenètica en les síndromes mielodisplàsiques, és constitucional?**

En les SMD l'alteració citogenètica més freqüent en forma de guany cromosòmic és la trisomia 8, i s'inclou dins del grup d'alteracions citogenètiques de risc intermedi segons l'IPSS-R. Per altra banda, segons els criteris de l'OMS del 2008, la +8 no es considera presumptiva de SMD en casos sense criteris morfològics concloents, ja que s'ha referit de forma constitucional en mosaïcisme en persones sanes. Tot i així, no existeixen estudis que demostrin la naturalesa constitucional de la +8 en series amplies de pacients amb SMD+8. L'objectiu del nostre estudi era determinar la incidència de la trisomia 8 de forma constitucional en les SMD amb aquesta alteració, analitzant la presència de la mateixa en la línia germinal d'aquests pacients, i definir el valor diagnòstic de la +8 en les SMD.

Pacients i Mètode:

Es van analitzar mostres de SP i mucosa oral de 32 pacients afectes de diferents neoplàsies hematològiques procedents de diversos hospitals que pertanyen al GESMD. Segons el seu diagnòstic s'agrupaven en 22 SMD, 2 LMMC, 2 ARSA-T i 6 LAM. Cinc de les SMD i 2 de les leucèmies agudes tenien a moll de l'os alteracions citogenètiques afegides a la +8.

En tots els pacients es va realitzar un estudi citogenètic de sang perifèrica, a partir de cultius cel·lulars estimulats amb PHA, amb la tècnica de bandes G. Mitjançant les tècniques de centrifugació en gradient de densitats es van separar amb ficoll cèl·lules mononucleades i amb dextrà els granulòcits. Posteriorment, a partir de les cèl·lules mononucleades es van aïllar els limfòcits CD3+ mitjançant tècniques immunomagnètiques. Les cèl·lules de la mucosa oral provenien del raspall de la mateixa. Aquestes cèl·lules varen ser esteses sobre un porta-objectes. La tècnica d'hibridació *in situ* fluorescent, utilitzant la sonda centromèrica del cromosoma 8 (CEP8), es va aplicar sobre els limfòcits CD3+, granulòcits i cèl·lules de la mucosa oral. Es van analitzar 200 nuclis cel·lulars tant en els granulòcits com en els limfòcits CD3+ i un mínim de 30

cèl·lules de la mucosa oral, utilitzant el punt de tall de 5% com a llindar de positivitat, d'acord amb els estàndards del nostre laboratori.

Resultats:

Entre les 22 SMD amb +8 incloses en el treball, 17 tenien la trisomia 8 aïllada en el cariotip de moll d'os i cinc tenien també altres alteracions addicionals. L'anàlisi citogenètica de sang perifèrica estimulada amb PHA va demostrar la presència de +8 en més del 5% de les cèl·lules en 3 dels 22 pacients. En l'anàlisi dels granulòcits dos pacients no es van poder estudiar per neutropènia extrema. Aplicant la tècnica de FISH es va observar la +8 en 18 pacients en un percentatge entre 3 i 74%. Dos d'aquests casos no es van considerar positius per no arribar al nostre punt de tall. En les mostres de limfòcits CD3+ es va observar la trisomia 8 en 5 dels 22 pacients estudiats en un percentatge entre el 2 al 20%. En aquestes mostres, es va suposar que alguns dels nuclis amb tres senyals en l'estudi de FISH, corresponien a monòcits que no s'havien aïllat correctament en el moment de la separació cel·lular, ja que la puresa d'aquestes mostres de limfòcits CD3+ era entre el 76 i el 92%. En l'anàlisi de les cèl·lules de la mucosa oral no es va observar la +8 per FISH en cap cèl·lula de cap dels 20 pacients estudiats. Dues de les mostres de les mucoses no es van poder analitzar per una incorrecta hibridació *in situ* en el moment del diagnòstic.

Entre els deu pacients amb altres neoplàsies mieloides i amb +8, només en un dels casos amb LMMC es va demostrar la presència d'aquesta alteració tant en els limfòcits CD3+, granulòcits i mucosa oral en un percentatge significatiu (28% i 60%, respectivament).

Amb aquests resultats es conclou que s'ha de descartar la cT8M mitjançant la tècnica de FISH sobre limfòcits CD3+ i cèl·lules de teixit no hematològic com la mucosa oral. Un cop descartada la cT8M, la trisomia 8 hauria de ser considerada, presumptiva de SMD tot i no presentar trets morfològics decisius, com les altres alteracions citogenètiques recurrents.

RESEARCH ARTICLE

Trisomy 8, a Cytogenetic Abnormality in Myelodysplastic Syndromes, Is Constitutional or Not?

Sílvia Saumell^{1,2,3}, Francesc Solé⁴, Leonor Arenillas^{1,2}, Julia Montoro⁵, David Valcárcel⁵, Carme Pedro^{2,6}, Carmen Sanzo⁷, Elisa Luño⁷, Teresa Giménez⁸, Montserrat Arnan⁹, Helena Pomares⁹, Raquel De Paz¹⁰, Beatriz Arrizabalaga¹¹, Andrés Jerez¹², Ana B. Martínez¹², Judith Sánchez-Castro¹³, Juan D. Rodríguez-Gambarte¹⁴, José M. Raya¹⁵, Eduardo Ríos¹⁶, María Rodríguez-Rivera^{1,2}, Blanca Espinet^{1,2}, Lourdes Florensa^{1,2*}



OPEN ACCESS

Citation: Saumell S, Solé F, Arenillas L, Montoro J, Valcárcel D, Pedro C, et al. (2015) Trisomy 8, a Cytogenetic Abnormality in Myelodysplastic Syndromes, Is Constitutional or Not? PLoS ONE 10 (6): e0129375. doi:10.1371/journal.pone.0129375

Academic Editor: Ken Mills, Queen's University Belfast, UNITED KINGDOM

Received: February 20, 2015

Accepted: May 7, 2015

Published: June 12, 2015

Copyright: © 2015 Saumell et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This work was supported by Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain (FI07/00107, CA08/00141; PI07/1009 and PI 11/02010); Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC, FEDER) (RD06/0020/0031 and RD07/0020/2004; RD12/0036/0044); SGR 541/2009 ("Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca", Departament d'Innovació, Universitats i Empresa); Acció COST BM0801: European Genetic and Epigenetic Study on AML and MDS; Sociedad

1 Laboratori de Citologia Hematològica i Citogenètica Molecular, Servei de Patologia, Hospital del Mar, Barcelona, Spain, **2** GRETNHE, Cancer Research Program, IMIM (Hospital del Mar Medical Research Institute), Barcelona, Spain, **3** Department of Medicine, Medicine Faculty, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain, **4** Institut de Recerca Contra la Leucèmia Josep Carreras, Cytogenetics Platform, Badalona, Spain, **5** Servicio de Hematología, Hospital Vall d'Hebrón, Barcelona, Spain, **6** Servei de Hematologia Clínica, Hospital del Mar, Barcelona, Spain, **7** Servicio de Hematología, Hospital Central de Asturias, Oviedo, Spain, **8** Servei d'Hematologia, Hospital Universitari Joan XXIII, Tarragona, Spain, **9** Servei d'Hematologia, Hospital Duran i Reynals, Institut Català d'Oncologia, L'Hospitalet del Llobregat, Spain, **10** Servicio de Hematología, Hospital Universitario de La Paz, Madrid, Spain, **11** Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Cruces, Baracaldo, Spain, **12** Servicio de Hematología, Hospital Morales Meseguer, Murcia, Spain, **13** Servei d' Hematologia, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida, Spain, **14** Servicio de Hematología, Hospital Universitario Ramon y Cajal, Madrid, Spain, **15** Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Canarias, La Laguna, Tenerife, Spain, **16** Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Valme, Sevilla, Spain

* lflorensa@parcdesalutmar.cat

Abstract

Isolated trisomy 8 is not considered presumptive evidence of myelodysplastic syndrome (MDS) in cases without minimal morphological criteria. One reason given is that trisomy 8 (+8) can be found as a constitutional mosaicism (cT8M). We tried to clarify the incidence of cT8M in myeloid neoplasms, specifically in MDS, and the diagnostic value of isolated +8 in MDS. Twenty-two MDS and 10 other myeloid neoplasms carrying +8 were studied. Trisomy 8 was determined in peripheral blood by conventional cytogenetics (CC) and on granulocytes, CD3+ lymphocytes and oral mucosa cells by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). In peripheral blood CC, +8 was seen in 4/32 patients. By FISH, only one patient with chronic myelomonocytic leukemia showed +8 in all cell samples and was interpreted as a cT8M. In our series +8 was acquired in all MDS. Probably, once discarded cT8M by FISH from CD3+ lymphocytes and non-hematological cells, +8 should be considered with enough evidence to MDS.

Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH) 2011 and 2012 fellowships.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Myelodysplastic syndromes (MDS) are a heterogeneous group of acquired clonal hematopoietic stem cell disorders with increased risk of acute myeloid leukemia (AML) development. Diagnosis of MDS remains among the most challenging of the myeloid neoplasms and is based on the presence of cytopenia(s), dysplasia in one or more myeloid lineages and less than 20% bone marrow (BM) or peripheral blood (PB) blasts [1,2]. Around 50% of MDS cases presented clonal cytogenetic abnormalities [2]. Trisomy 8 (+8) is the most common chromosome gain in MDS and is present in 5–7% of them [3]. MDS patients with isolated +8 are included in the MDS intermediate cytogenetic risk group according to the new revised IPSS (IPSS-R) [4]. Nevertheless, in contrast to other recurring chromosomal alterations, the presence of +8 as the sole cytogenetic abnormality is not considered definitive evidence for MDS in the absence of morphological criteria [2]. Since trisomy 8 was found as a constitutional mosaicism (cT8M) in healthy people, it was not considered a tumour marker by some authors [5]. However, the incidence of cT8M referred is very low; Nielsen and Wohlert detected one case of cT8M among approximately 35000 live births [6], and Seghezzi et al. found two cases out of 40140 [7]. In addition, some studies suggested that +8 could be present as a cT8M in myeloid malignancies [7–10] and Maserati et al. reported that +8 is constitutional in 15–20% of MDS and acute leukemia [9]. We have analyzed the presence of +8 in granulocytes and CD3+ lymphocytes from PB, as well as in oral mucosa cells from patients diagnosed with MDS carrying +8, in order to clarify the incidence of cT8M in MDS and try to provide a precise diagnostic and prognostic value for isolated +8, especially in cases where there is a degree of doubt.

Methods

A total of 32 patients with +8 were studied from different Spanish hospitals belonging to the *Grupo español de síndromes mielodisplásicos* (GESMD): 22 diagnosed with MDS and 10 of other myeloid neoplasms. The latter group included four patients with myelodysplastic/ myeloproliferative neoplasm [two chronic myelomonocytic leukemia (CMML) and two refractory anemia with ring sideroblasts and thrombocytosis (RARS-T)] and six patients with AML. Five of the MDS and two of the AML patients had additional cytogenetic alterations to +8 on the bone marrow karyotype. One of the AML had a tetrasomy 8. Furthermore, we also studied 20 healthy controls (12 women and 8 men), with ages ranged between 20–60 years.

Blood Samples

Lymphocytes and granulocytes were isolated from 30mL of PB using standard cell separation protocols. CD3+ cells were isolated from mononuclear cells by immunomagnetic beads (MiltenyiBiotec, Germany). Afterwards, CD3+ cells, as well as granulocytes, were fixed with Carnoy fixative solution (3:1 methanol to acetic acid), and spread on independent slides for fluorescence *in situ* hybridization (FISH) studies. The decision to study CD3+ cells was based on the discarded involvement of them in MDS [11–16], their practical accessibility, and the recommendations of other authors for germline analysis in SNP and sequencing studies [17–19].

Oral Mucosa

The oral mucosa was scraped with a sterile cotton swab. Four smears were made by scattering mucosa cells of the swabs over slides. The samples were fixed 10 min in Carnoy solution. Once dried, slides were treated with acetic acid solution (3:2 acetic acid to methanol) at 45°C for 40 min, following with a 10 min digestion in 0.005% pepsin solution (Sigma Aldrich, St Louis, MO) at 37°C, and ending with a dehydration in 70%, 80% and 100% ethanol wash series.

Karyotype Analysis

Metaphase staining chromosome analysis using phytohemagglutinin (PHA) stimulated cultures of PB were carried out by G-banding technique. At least 15 metaphases were analyzed for each patient. The analysis and nomenclature of the chromosomes were based on International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) of 2013 [20].

Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH)

The centromeric 8 spectrum-orange DNA probe (CEP 8, Vysis, Downers Grove, IL) was applied to CD3+ lymphocytes, granulocytes and oral mucosa cells slides. The hybridization was performed overnight at 37°C. After washing, slides were counterstained with diaminophenylindole (DAPI II). The results of the hybridization were evaluated in a fluorescence microscope. If three signals of the same size and intensity were separated by at least one domain, +8 was considered. Following the European Cytogeneticists Association Specific Constitutional Guidelines [21], +8 mosaicism was assessed in 200 nuclei for CD3+ lymphocytes and granulocytes, and a minimum of 30 mucosa cells were analyzed. According to our laboratory, cutoff points for PB samples as well as for oral mucosa cells were 5%.

The study was carried out in accordance with the biomedical Helsinki Declaration of research guidelines and was approved by the *Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) Parc de Salut Mar*. All participants provided their written informed consent to participate in the study.

Statistical analysis

Overall survival (OS) and time to AML transformation of patients with MDS and +8 were calculated. They were defined to be the time from the MDS diagnosis to death or last follow-up and to development of AML, respectively. Kaplan-Meier method was used to evaluate OS and AML transformation. Data analysis was performed using the R software package (version 3.1.1; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Results

The patient characteristics are shown in [Table 1](#). Among 22 patients diagnosed with MDS and +8, 17 cases had isolated +8 on BM karyotype at diagnosis, and five had also other additional alterations. Cytogenetic analysis of PB PHA-stimulated cultures revealed +8 in 3 out of 22 patients in 5% to 65% of cells. Using FISH, trisomy 8 was observed in 3% to 74% of granulocytes from all 18 patients studied (4 patients were not studied for extremely neutropenia). Two of them were not considered positive for not reaching our cut off. For CD3+ cells samples, trisomy 8 was seen in 5 out of 22 patients. However, only 4 of them showed trisomy 8 over 5% (6% to 20%). Probably, those cells with +8 detected in CD3+ isolated samples were monocytes due to contamination during cellular isolation (CD3+ cell purity being 76 to 91.1%). None of the oral mucosa cell slides from 20 patients that could be analyzed showed +8, the other two cases could not be analyzed for unsuccessful hybridization.

Among the ten patients with other myeloid neoplasms carrying +8, neither patients with RARS-T nor AML ones presented +8 on CD3+ lymphocytes and oral mucosa cells, while one of CMML patients showed trisomy 8 on both of them (CD3+ lymphocytes and oral mucosa cells).

For the healthy controls, the median of CD3+ cells with trisomy 8 was 1.3% and no cell from mucosa samples showed trisomy 8.

Table 1. Patient Characteristics.

WHO	BONE MARROW KARYOTYPE	PB KARYOTYPE (PHA)	FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION					
			CD3 + LYMPHOCYTES		GRANULOCYTES	MUCOSA		
			% cells with +8	% of purity	% cells with +8	% cells with +8	N° of cells analyzed	
MDS								
1	RA	46,XX,del(5)(q13q33)[10]/47,sl,+8[3]/48,sld1,+22[4]/47,XX,+8[5]/46,XX[4]	46,XX[20]	0	96	20	0	46
2	RA	47,XY,+8[4]/46,XY[12]	46,XY[15]	0	96	3	0	100
3	RCUD	47,XX,+8[11]/46,XX[9]	46,XX[20]	0	88	74	0	75
4	RCMD	47,XX,+8[10]/46,XX[10]	47,XX,+8[5]/46,XX[15]	6	91.1	-	0	100
5	RCMD	47,XY,del(5)(q15q33),+8[20]	46,XY[15]	0	95	-	0	100
6	RCMD	47,XY,+8[10]/46,XY[10]	46,XY[15]	7	86	69	0	100
7	RCMD	47,XY,+8[7]/46,XY[13]	46,XY[15]	0	85	-	0	100
8	RCMD	47,XY,+8[15]/46,XY[5]	48,XY,+8,+21[1]/46,XY[19]	20	86	63	0	100
9	RCMD	47,XY,+8[16]/46,XY[4]	46,XY[20]	0	90	30	0	73
10	RCMD	47,XX,+8[20]/48,sl,+8[1]/46,XX[7]	46,XX[15]	0	92	31	-	-
11	RCMD	47,XX,+8[5]/46,XX[15]	46,XX[20]	0	89	-	0	41
12	RCMD	47,XY,+8[8]/46,XY[12]	46,XY[20]	0	80	13	0	50
13	RCMD	47,XX,+8[5]/46,XX[26]	46,XX[15]	0	82	3	0	100
14	RCMD	47,XY,+8[13]/46,XY[7]	46,XY[20]	0	78	17	0	70
15	RCMD	47,XX,+8[20]	46,XX[20]	2	92	60	-	-
16	RCMD	46,XX,del(5)(q14)[15]/47,XX,+8[2]	46,XX[15]	0	87	5	0	30
17	RCMD	47,XY,+8[8]/46,XY[15]	46,XY[20]	0	93	24	0	100
18	RAEB-1	47,XX,+8[9]/47,sl,i(17)(q10)[9]	No metaphases	0	90	73	0	76
19	RAEB-2	47,XY,+8[7]/46,XY[13]	46,XY[20]	0	93	43	0	53
20	RAEB-2	47,XX,+8[2]/46,XX[18]	46,XX[20]	0	89	6	0	72
21	RAEB-2	45,X,-Y[8]/46,X,-Y,+8[5]	46,X,-Y,+8[13]/46,XY[7]	0	96.7	47	0	54
22	MDS-U	47,XY,+8[19]/46,XY[1]	46,XY[20]	10	76	67	0	65
MDS/MPN								
23	RARS-T	47,XX,+8[4]/46,XX[23]	46,XX[15]	0	93	-	0	31
24	RARS-T	47,XY,+8[3]/46,XY[17]	46,XY[15]	0	87	8	0	36
25	CMML	47,XY,+8[20]	46,XY[15]	8	84.7	-	0	80
26	CMML	47,XY,+8[15]/46,XY[5]	47,XY,+8[2]/46,XY[48]	28	93	-	60	100
AML								
27	AML-MDRC	47,XY,+8[2]/46,XY[2]	46,XY[15]	0	92	7	0	41
28	AML NOS	No metaphases (FISH+8, 70%)	46,XX[15]	0	89	-	-	-
29	AML-MDRC	47,XY,+8[20]	46,XY[15]	0	95	58	0	83
30	APL	47,XX,+8,t(15;17)(q22;q12)[15]/46,XX[5]	46,XX[15]	0	93	-	0	100
31	AML NOS	48,XY,+8,+8[18]	46,XY[15]	0	93.8	-	0	100
32	AML-MDRC	46,XY,-5,del(7)(q11q35),+8,der(17)t(5;17)(p11;p11)[20]	No metaphases	0	84.8	-	0	100

Abbreviations: +8, trisomy 8; PB, peripheral blood; PHA, phytohemagglutinin; RA, refractory anemia; RCUD, refractory cytopenia with unilineage dysplasia; RCMD, refractory cytopenia with multilineage dysplasia; RAEB, RA with excess of blasts; MDS-U, myelodysplastic syndrome unclassified; RARS-T, RA with ringed sideroblasts and thrombocytosis; CMML, chronic myelomonocytic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; AML-MDRC, AML with myelodysplasia-related changes; AML NOS, AML not otherwise specified; APL, acute promyelocytic leukemia. In bold patient with constitutional trisomy 8 mosaicism.

doi:10.1371/journal.pone.0129375.t001

Outcome analysis

The data of twenty-one patients with MDS and +8 were available for Kaplan-Meier analysis. Twelve patients died and five evolved to AML with a median follow up of 38.2 months (range, 2.6 to 92.3 months). The median OS and median time to AML transformation for MDS with isolated +8 were 85.9 and 2.8 months, respectively. No statistically significant differences in median OS were found between MDS with isolated +8 and MDS with +8 and another additional aberration.

Discussion

MDS are associated with clonal cytogenetic abnormalities in around 50% of patients [2] being trisomy 8 the most common chromosome gain. According to the IPSS-R, isolated trisomy 8 is included in the intermediate cytogenetic risk group [4]. The current analysis with 22 patients diagnosed of MDS with isolated +8 and selected to be alive at the inclusion moment showed a longer overall survival (median, 85.9 months) than expected. However, in our previous study of 72 MDS with isolated +8 patients from GESMDregistry, the median overall survival was 34.3 months [3], demonstrating the intermediate risk conferred by trisomy 8 to MDS and in agreement with IPSS-R. In contrast to other recurring chromosomal alterations, isolated +8 is not considered presumptive evidence of MDS when minimal morphological criteria are lacking [2]. This is in part because +8 may be derived from a constitutional 8 mosaicism. Furthermore, the incidence of cT8M among general population is very low [6,7]. In accordance, none of our healthy controls showed trisomy 8 by FISH. In 2002, Maserati *et al.* reported that +8 in myelodysplasia and acute leukemia is constitutional in 15–20% [9]. They had analyzed 13 cases of different myeloid neoplasms (including seven MDS) and 1 case of acute lymphoblastic leukemia and reported a cT8M in two of them after applying conventional cytogenetics from PB PHA-stimulated cultures. Nevertheless, in that study the cT8M was confirmed on a skin fibroblasts culture in only one MDS patient. Some other previous studies to determine lineage involvement in MDS, demonstrated that +8 was only found in myeloid lineage (granulocytes, monocytes and erythroblasts) [11–16]. These studies did not analyze non-hematopoietic cells because of their different aim. We evaluated the presence of +8 in 32 patients with different myeloid neoplasms (22 MDS, 2 RARS-T, 2 CMML and 6 AML). In all but one patient, we observed the +8 in myeloid cells and ruled it out in CD3+ lymphocytes and mucosa cells by FISH. Regarding the remaining patient, with +8 in both lymphocytes and mucosa cells, we could consider this alteration as constitutional. We believe that G-banding cytogenetics from PB PHA-stimulated cultures is not useful to discard cT8M, because myeloid cells present in these samples may also divide, giving a false positive result. In fact in our series, karyotype of PB showed +8 in 3 MDS patients but none of them presented +8 in oral mucosa samples. Hence, we consider it mandatory to apply FISH on isolated CD3+ lymphocytes as well as on non-hematological cells as oral mucosa ones for mosaicism studies. In the present project, the study of mucosa cells helps to rule out the germinal nature of trisomy 8 in those cases with residual positive CD3+ cells from samples with low purity. Non-use of the FISH technique on non-hematological cells probably explains the higher cT8M incidence reported from Maserati analyses in a short series with only 7 MDS patients [9]. Moreover, it is interesting to point out that the CMML patient with constitutional +8 had been diagnosed with a Behçet syndrome. Curiously the association between the presence of a cT8M and increased risk of developing Behçet syndrome [22] as well as a high risk of developing myeloid neoplasms [7,8,23], have already been referred.

Another argument used against the value of +8 to diagnose MDS is the possible presence of +8 as a seemingly clonal aberration in aplastic anemia (AA), which may disappear after

immunosuppressive treatment [24]. Also Maciejewsky et al. have described a clonal evolution to MDS as a late complication of AA [25]. Thus, +8 in the absence of unequivocal dysplasia, would not be of help to differentiate hypocellular MDS from AA, entities that have been suggested to share similar pathogenic process for bone marrow hypocellularity [26]. Furthermore, a significant response rate of MDS with +8 to immunosuppressive therapy is well known [27].

In summary, our study confirms that cT8M should be ruled out using FISH on CD3+ lymphocytes and on non-hematological cells such as oral mucosa ones in MDS, and to the best of our knowledge, is the first study performed under these conditions. Besides this, our results suggest that trisomy 8 is acquired in almost all MDS, and probably, isolated +8 should be considered with enough evidence to diagnose MDS in normo and hypercellular bone marrow cases. Studies with longer series are needed for more decisive conclusions.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SS FS LF. Performed the experiments: SS MR. Analyzed the data: SS FS LF. Contributed reagents/materials/analysis tools: MR BE. Wrote the paper: SS LF. Reviewed the manuscript: FS DV LA JMR BE. Provided patient samples and clinical data: LA JM DV CP CS EL TG MA HP RDP BA AJ ABM JS JDR JMR ER.

References

1. Tefferi A, Vardiman JW. Myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*. 2009; 361:1872–85.
2. Brunning R, Orazi A, Germing U, Le Beau MM, Porwit A, Baumann I, et al. Myelodysplastic syndromes/neoplasms overview. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. editors. *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. World Health Organization. Lyon: IARC, 2008, p. 88–93.
3. Saumell S, Florensa L, Luño E, Sanzo C, Cañizo C, Hernández JM, et al. Prognostic value of trisomy 8 as a single anomaly and the influence of additional cytogenetic aberrations in primary myelodysplastic syndromes. *B J Haemat*. 2012; 159:311–21.
4. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, et al. Revised international prognostic scoring system (IPSS-R) for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012; 120:2454–65.
5. Hasle H, Clausen N, Pedersen B, Bendix-Hansen K. Myelodysplastic syndrome in a child with constitutional trisomy 8 mosaicism and normal phenotype. *Cancer Genet and Cytogenet*. 1995; 79:79–81. PMID: [7850757](#)
6. Nielsen J, Wohler M. Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in arhus, denmark. *Hum Genet*. 1991; 87:81–3.
7. Seghezzi L, Maserati E, Minelli A, Dellavecchia C, Addis P, Locatelli F, et al. Constitutional trisomy 8 as first mutation in multistep carcinogenesis: clinical, cytogenetic, and molecular data on three cases. *Genes Chromosom Cancer*. 1996; 17:94–101. PMID: [8913726](#)
8. Ganmore I, Smoocha G, Izraeli S. Constitutional aneuploidy and cancer predisposition. *Hum Mol Genet*. 2009; 18(R1):R84–93. doi: [10.1093/hmg/ddp084](#) PMID: [19297405](#)
9. Maserati E, Aprili F, Vinante F, Locatelli F, Amendola G, Zatterale A, et al. Trisomy 8 in myelodysplasia and acute leukemia is constitutional in 15–20% of cases. *Genes Chromosom Cancer*. 2002; 33:93–7. PMID: [11746991](#)
10. Ripperger T, Tauscher M, Pralich I, Pabst B, Teigler-Schlegel A, Yeoh A, et al. Constitutional trisomy 8p11.21- q11.21 mosaicism: a germline alteration predisposing to myeloid leukaemia. *B J Haemat*. 2011; 155:209–17.
11. Kibbelaar RE, van Kamp H, Dreef EJ, de Groot-Swings G, Kluin-Nelemans JC, Beverstock GC, et al. Combined immunophenotyping and DNA in situ hybridization to study lineage involvement in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1992; 79:1823–8.
12. Anastasi J, Feng J, Le Beau MM, Larson RA, Rowley JD, Vardiman JW. Cytogenetic clonality in myelodysplastic syndromes studied with fluorescence in situ hybridization: lineage, response to growth factor therapy, and clone expansion. *Blood*. 1993; 81:1580–5. PMID: [8453104](#)
13. Soenen V, Fenaux P, Flactif M, Lepelley P, Lai JL, Cosson A, et al. Combined immunophenotyping and in situ hybridization (FICTION): a rapid method to study cell lineage involvement in myelodysplastic syndromes. *B J Haemat*. 1995; 90:701–6.

14. Fagioli F, Cuneo A, Bardi A, Carli MG, Bigoni R, Balsamo R, et al. Heterogeneity of lineage involvement by trisomy 8 in myelodysplastic syndrome. a multiparameter analysis combining conventional cytogenetics, dna in situ hybridization, and bone marrow culture studies. *Cancer Genet Cytogenet.* 1995; 82:116–22. PMID: [7664240](#)
15. Bernell P, Jacobsson B, Nordgren A, Hast J. Clonal cell lineage involvement in myelodysplastic syndromes studied by fluorescence in situ hybridization and morphology. *Leukemia.* 1996; 10:662–8. PMID: [8618444](#)
16. Saitoh K, Miura I, Takahashi N, Miura AB. Fluorescence in situ hybridization of progenitor cells obtained by fluorescence-activated cell sorting for the detection of cells affected by chromosome abnormality trisomy 8 in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood.* 1998; 92:2886–92. PMID: [9763574](#)
17. Tiu RV, Gondek LP, O'Keefe CL, Elson P, Huh J, Mohamedali A, et al. Prognostic impact of SNP array karyotyping in myelodysplastic syndromes and related myeloid malignancies. *Blood.* 2011; 117:4552–60. doi: [10.1182/blood-2010-07-295857](#) PMID: [21285439](#)
18. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Sato-Otsubo A, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature.* 2011; 478:64–9. doi: [10.1038/nature10496](#) PMID: [21909114](#)
19. Mallo M, Del Rey M, Ibañez M, Calasanz MJ, Arenillas L, Larrayoz MJ, et al. Response to lenalidomide in myelodysplastic syndromes with del(5q): influence of cytogenetics and mutations. *B J Haemat.* 2013; 162:74–86.
20. Shaffer L, McGowan-Jordan J, Schmid M. An international system for human cytogenetic nomenclature (2013). Basel: S Karger; 2013.
21. Hastings R, Howell R, Bricarelli FD, Kristoffersson U, Cavani S. Specific constitutional cytogenetic guidelines. *European cytogeneticists association newsletter no. 30.* European Cytogeneticists Guidelines. E.C.A. 2012; 30:11–9.
22. Becker K, Fitzgerald O, Green AJ, Keogan M, Newbury-Ecob R, Greenhalgh L, et al. Constitutional trisomy 8 and Behçet syndrome. *Am J Med Genet.* 2009; 149A:982–6. doi: [10.1002/ajmg.a.32756](#) PMID: [19353586](#)
23. Danesino C, Pasquali F, Dellavecchia C, Maserati E, Mineli A, Seghezzi L. Constitutional trisomy 8 mosaicism: mechanism of origin, phenotype variability, and risk of malignancies. *Am J Med Genet.* 1998; 80:540. PMID: [9880228](#)
24. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the world health organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 2009; 114:937–51. doi: [10.1182/blood-2009-03-209262](#) PMID: [19357394](#)
25. Maciejewski JP, Risitano A, Sloand EM, Nunez O, Young NO. Distinct clinical outcomes for cytogenetic abnormalities evolving from aplastic anemia. *Blood.* 2002; 99:3129–35.
26. Barrett J, Sauntharajah Y, Molldrem J. Myelodysplastic syndrome and aplastic anemia: distinct entities or diseases linked by a common pathophysiology?. *Semin Hematol.* 2000; 37:15–29.
27. Sloand EM, Mainwaring L, Fuhrer M, Ramkissoon S, Risitano AM, Keyvanafar K, et al. Preferential suppression of trisomy 8 compared with normal hematopoietic cell growth by autologous lymphocytes in patients with trisomy 8 myelodysplastic syndrome. *Blood.* 2005; 106:841–51.

Discussió

Les SMD són una de les neoplàsies clonals de més difícil diagnòstic dins de les neoplàsies mieloides. Això es deu a la seva heterogeneïtat tant en la forma de presentar-se com en el pronòstic clínic. Tot i que, els mecanismes fisiopatològics no estan ben descrits, existeixen classificacions i estratificacions pronòstiques d'aquestes malalties fonamentades en aspectes clínics, analítics i citogenètics. Les alteracions citogenètiques en les SMD són essencials en l'estratificació pronòstica d'aquestes neoplàsies i també són determinants en el diagnòstic dels casos on no hi ha criteris morfològics concloents. La troballa en la citogenètica convencional de moll de l'os de la trisomia 8 no és considerada com a presumptiva de SMD, però, en canvi, en els casos amb criteris morfològics de SMD implica un pronòstic intermedi segons l'IPSS-R. Existeixen treballs on s'han analitzat les SMD+8 però sempre dins d'una sèrie global de SMD i no s'ha analitzat l'impacte de les alteracions acompanyants^{30,95,98,121-123,125,126}. Per altra banda, la publicació de la constitucionalitat de la trisomia 8 en un 15-20% de les SMD en una sèrie de 7 pacients¹¹⁸ ha implicat, en part, que la trisomia 8 no sigui considerada com a diagnòstica en els casos sense criteris morfològics concloents. En aquesta tesi s'ha caracteritzat les SMD+8 i s'ha pogut dilucidar la implicació de la trisomia 8 en les SMD amb aquesta alteració i l'impacte de l'addició d'altres alteracions addicionals. A més a més, també s'han establert recomanacions davant la detecció de la trisomia 8 en el moment del diagnòstic d'aquestes neoplàsies.

Així doncs, segons els nostres objectius vam realitzar els treballs anteriorment presentats. Seguidament s'analitzarà cadascun d'ells comparant els resultats amb la bibliografia fins al moment publicada, i intentant treure conclusions amb significat aplicable en la pràctica diagnòstica i clínica.

Treball 1.

Per assolir el primer dels objectius, caracteritzar les SMD amb +8 aïllada i dilucidar l'impacte pronòstic de les alteracions addicionals, es va realitzar una anàlisi descriptiva dels pacients amb SMD amb trisomia 8 procedents del "Registre Español de SMD".

Caracterització de les SMD amb trisomia 8 aïllada

La trisomia 8 és l'alteració en forma de guany cromosòmic més freqüent en les SMD. Entre els casos amb cariotip alterat, la incidència reportada d'aquesta alteració és d'un 16%, i es presenta entre un 5 i 11% com a única alteració citogenètica^{31,92,95,98,119,121,123,124}. En el nostre estudi la incidència va ser menor, objectivant-se en un 13% dels casos de SMD amb cariotip alterat, representant un 3,6% de la sèrie global. És interessant remarcar que en la majoria de treballs s'indica la incidència de la +8 entre els casos amb cariotip alterat, veient doncs que la incidència real, en el global de les SMD, és inferior. Més de la meitat de casos de SMD amb +8, aquesta alteració, es presenta aïllada, sent, aquest subgrup, objecte d'estudi per diversos grups de treball. Així doncs, l'impacte pronòstic de la trisomia 8 com a única alteració ja ha sigut analitzada prèviament, però en estudis amb pocs pacients dins l'anàlisi d'una cohort global de SMD, i sense realitzar una anàlisi descriptiu d'aquest subgrup de pacients. En el nostre primer treball vàrem poder analitzar 72 pacients diagnosticats de SMD amb trisomia 8 com a única alteració citogenètica. La majoria de pacients eren majors de 60 anys (88.7%) i predominaven dues vegades més els homes que les dones, tal com ja es referia en treballs previs^{121,196}. Els pacients es classificaven en proporcions similars entre els grups de CRDM, AREB-1 i AREB-2 de la classificació de l'OMS 2008. Com estava previst, la majoria de casos es classificaven en els grups de risc intermedi segons l'IPSS, només un 6.8% dels pacients ho van fer en el grup d'alt risc a causa de la presència d'alt recompte de blasts. Tot i que la trisomia 8 és considerada com una alteració que implica un pronòstic intermedi en les SMD, amb una supervivència mitjana entre 11 i 25 mesos, aquesta afirmació es basa en estudis on s'inclouen casos de LMMC i LAM^{31,95,121-123}. El nostre grup de 72 pacients, tots amb SMD, va presentar una mitjana de supervivència global de 34,3 mesos. Un treball del 2008 que incloïa també únicament pacients amb SMD amb +8 segons els

critèris de la classificació de l'OMS 2008, va reportar una mitjana de supervivència global de 19 mesos, però en aquest estudi els pacients havien rebut tractaments actius experimentals, a diferència de la nostra sèrie que havien rebut només tractament de suport¹²⁶. Per tant, sembla que, les SMD+8 presenten una millor supervivència global a la descrita fins ara. Per determinar millor l'impacte pronòstic de la +8 vam comparar les SMD+8 amb els casos de SMD amb cariotip normal del mateix registre, i vàrem veure que presentaven, de forma estadísticament significativa, una pitjor supervivència global (88 vs 34,3 mesos, respectivament). Aquest pitjor pronòstic conferit per la trisomia 8 es dona sobretot en aquells casos on el recompte de blasts és igual o superior a 5%. A més, un 18% de la nostra sèrie de casos amb SMD amb +8 aïllada va progressar a leucèmia aguda, sent la probabilitat de transformació de 17.7% al cap de 2 anys. Aquestes dades confirmen l'impacte negatiu de la +8 en les SMD. El nostre estudi reafirma que les SMD amb +8 aïllada s'han d'incloure en el grup de risc citogenètic intermedi, com consta en l'actual IPSS-R^{95,97}.

En l'anàlisi dels factors pronòstics d'aquest grup de pacients amb SMD amb +8 aïllada, tant el nombre de citopènies com el grau de les mateixes van tenir impacte negatiu en la supervivència global. Per altra banda, Mallo et al. van reportar que el percentatge de metafases alterades en el cariotip de MO té implicació pronòstica en pacients amb SMD+8, observant un pitjor pronòstic en els casos en què la clona patològica es detectava en el 100% de les metafases. Aquest treball incloïa casos amb SMD amb +8 sola i amb alteracions addicionals⁸⁵. En el nostre treball vàrem estudiar la implicació de la clona patològica en el grup de SMD+8 sense observar diferències significatives en la supervivència segons si la trisomia 8 s'observava de forma parcial o en totes les metafases estudiades. Per tant, en les SMD+8, tenir totes les metafases afectes no implica pitjor pronòstic.

Impacte pronòstic de les alteracions addicionals

Segons la revisió d'estudis previs, la trisomia 8 es troba associada a altres alteracions citogenètiques en un 5% de les SMD amb cariotip alterat. Les alteracions descrites més freqüents adicionades a la trisomia 8 són la -5/del(5q) sovint en cariotips complexes, t(1;7)(q10;p10) i del(20q)^{119,123}. En el

nostre estudi vam observar que aquelles SMD amb +8 i una altra alteració la més freqüent va ser la del(5q) i seguidament la del(11q).

En termes de supervivència global, s'ha descrit que les SMD amb del(5q) acompanyada d'una altra alteració addicional presenten una evolució i un pronòstic similar⁸⁵. Una sèrie de SMD amb +8 més una altra alteració van ser analitzades per Haase et al. comparant-les amb SMD+8, i varen trobar una millor supervivència en aquells casos en que la trisomia 8 s'acompanyava d'una altre alteració (mitjana de 44 vs 22 mesos)¹²³. Nosaltres no vam trobar els mateixos resultats, de fet, en la nostra sèrie de pacients no es van observar diferències estadísticament significatives entre els dos grups. Seria interessant saber concretament quines eren les alteracions addicionals en la sèrie de Haase et al. Una valoració possible seria que hi hagués una alta incidència de del(5q) com a alteració addicional, cosa que conferiria una millor supervivència global en aquest grup. En la nostra sèrie, la del(5q) era la més freqüent però només es trobava en un 9.29% dels casos, així doncs, cap alteració addicional a la +8 predominava. Per altra banda, no hem d'oblidar que en el nostre treball vàrem analitzar una sèrie més homogènia de casos, ja que vam excloure les LMMC i els casos amb més de 20% de blasts.

Els casos de SMD amb +8 i dues alteracions més, son considerades com a cariotip complex. En la proposta de *score* de risc citogenètic en SMD publicades l'any 2012 varen demostrar que els casos que tenien tres alteracions citogenètiques tenien un millor pronòstic que els casos amb més de tres alteracions⁹⁵. De forma concordant, els nostres casos de SMD amb +8 i dues alteracions afegides també anaven millor que els casos amb tres alteracions addicionals, podent concloure que s'haurien de classificar en el grup de risc intermedi i no en alt risc.

Treball 2.

En el segon treball amb mostres de pacients amb SMD i +8 preteníem determinar la incidència de la cT8M mitjançant l'anàlisi de la presència de la +8 en la línia germinal. Donat el valor pronòstic i la rellevància diagnòstica que implica la presència de la +8 en la línia germinal d'aquests pacients.

Incidència de la trisomia 8 constitucional en les SMD amb aquesta alteració.

Maserati et al. varen reportar que la trisomia 8 era constitucional en un 15-20% de les SMD i leucèmies agudes amb aquesta alteració¹¹⁸. Si aquesta incidència fos real, representaria que en una proporció molt alta de pacients amb SMD amb +8, aquesta alteració no s'adquireix amb la malaltia. Aquesta idea és poc concordant amb la incidència detectada de cT8M en la població general, 1 o 2 casos entre 40.000 naixements^{111,113}.

L'estudi de 2002 de Maserati et al. té bastantes limitacions, les més destacades són la mida mostral i l'heterogeneïtat de la sèrie de pacients. S'analitzaven 13 casos de neoplàsies mieloides entre les quals únicament 7 casos eren SMD. En aquest estudi basaven les seves conclusions a partir dels resultats de l'estudi citogenètic de SP estimulada amb PHA. Només en un dels casos on la trisomia 8 es va considerar constitucional es va verificar la presència d'aquesta alteració en fibroblasts (línia germinal)¹¹⁸. En el nostre segon treball vàrem descartar la constitucionalitat de la trisomia 8 en 22 casos de SMD amb +8, mitjançant l'anàlisi de presència de la +8 per FISH en limfòcits T (reportats com a no clonals en les SMD) i en mucosa oral com a teixit no hematològic. Amb aquests resultats no podem posar una xifra d'incidència de cT8M en aquestes neoplàsies, però sí que podem afirmar amb bastant seguretat que aquesta incidència és menor al 15-20% que van reportar Maserati et al. El baix nombre de pacients de la nostra sèrie, per la dificultat de reclutament, no ens permet descartar que la trisomia 8 es pugui trobar de manera constitucional en algun cas de SMD. Tot i així, els nostres resultats suggereixen que la trisomia 8 és adquirida en la majoria dels casos de SMD amb +8 i que la incidència de la c8TM en les SMD és molt baixa. Estudis amb un nombre més gran de casos són necessaris per determinar la incidència real de la cT8M.

Valor diagnòstic i pronòstic de la trisomia 8 en les SMD.

Com hem comentat anteriorment, en casos amb citopènies a sang perifèrica sense alteracions morfològiques concloents de SMD, la presència de la trisomia 8 no es considera diagnòstica. Amb el nostre treball suggerim que això es deu, en part, a què aquesta alteració es pot trobar en forma constitucional en persones sanes. Per altra banda, en casos de SMD, la trisomia 8 aïllada no es pot utilitzar com alteració citogenètica amb valor pronòstic si es demostra la cT8M. En el nostre treball, la detecció de la trisomia 8 per citogenètica convencional de SP en 3 casos i l'absència d'aquesta alteració en limfòcits T i en teixit no hematològic en l'anàlisi mitjançant la tècnica de FISH, permeten concloure que, la citogenètica convencional de SP no és útil per descartar la constitucionalitat de la trisomia 8. És necessari aplicar la FISH en dos teixits no implicats en la malaltia.

Un altre motiu pel qual la +8 no es considera diagnòstica de SMD és perquè s'han trobat casos de +8 en anèmies aplàsiques (AA). L'anèmia aplàsica cursa amb citopènies a sang perifèrica i moll hipocel·lular sense displàsia en les sèries mieloides ni blastes. S'han descrit casos de AA amb evolució a SMD com a complicació tardana¹⁹⁷. A més a més, en ambdues patologies s'han descrit casos de desaparició de l'alteració citogenètica després de tractament immunosupressor. Per tant, alguns autors suggereixen una patogènia similar en l'origen de les citopènies entre les AA i les SMD hipocel·lulars⁸⁸. Però en aquells casos amb cel·lularitat normal o augmentada el diagnòstic de AA no hauria de considerar-se.

Per tant, un cop descartada la presència de la trisomia 8 en la línia germinal mitjançant FISH, aquesta alteració pot utilitzar-se com a marcador clonal, tenint valor pronòstic i considerant-se diagnòstica de SMD en casos de citopènies amb cel·lularitat normal o augmentada a MO. Quedant en dubte en els casos de molls hipocel·lulars sense dismòrfies en les sèries mieloides ni blastes. Caldria més estudis per determinar l'origen comú de les AA i les SMD hipoplàsiques.

CONCLUSIONS

1. En les SMD amb +8 aïllada predominen els pacients majors de 60 anys i hi han dues vegades més homes que dones. La majoria de pacients pertanyen als grups de CRDM, AREB-1 i AREB-2 de la classificació de l'OMS en proporcions similars i al grup de risc intermedi segons el l'IPSS.
2. Els pacients amb SMD amb +8 aïllada presenten una mitjana de supervivència inferior respecte als pacients amb SMD amb cariotip normal de manera estadísticament significativa (34,3 vs 88 mesos respectivament).
3. Els pacients amb SMD amb menys de 5% de blasts tenen un pronòstic similar tan si presenten una +8 aïllada com un cariotip normal. Si la xifra de blasts és del 5% o més els pacients amb +8 tenen pitjor pronòstic que els de cariotip normal amb una mitjana de supervivència global de 9.5 vs 28.5 mesos, respectivament.
4. En les SMD amb +8 aïllada, el número de metafases afectes no implica diferències pronòstiques.
5. La trisomia 8 aïllada forma part de les alteracions citogenètiques de risc intermedi en les SMD, d'acord amb el R-IPSS.
6. No hi ha diferències estadísticament significatives, en termes de supervivència global, entre les SMD amb +8 aïllada i les que presenten una o dues alteracions addicionals, mentre que les que s'acompanyen de tres o més alteracions addicionals presenten pitjor pronòstic.
7. Els nostres resultats suggereixen que la trisomia 8 és adquirida en la majoria dels pacients amb SMD i +8, i que, provablement, la incidència de la c8TM en les SMD és molt baixa. Estudis amb un nombre més gran de casos són necessaris per determinar la incidència real de la cT8M.

8. Davant de SMD amb +8 aïllada s'ha de descartar cT8M aplicant la tècnica de hibridació *in situ* fluorescent a limfòcits CD3+ i a un teixit no hematopoètic com cèl·lules de la mucosa oral. La citogenètica convencional de sang perifèrica a partir de cultius estimulats amb fitohemaglutinina no és una tècnica útil.
9. Descartada la cT8M, la trisomia 8 hauria de ser considerada com una alteració citogenètica amb suficient valor diagnòstic de SMD, especialment en casos de citopènies i criteris morfològics insuficients.
10. Descartar la cT8M permet utilitzar la trisomia 8 aïllada com alteració citogenètica amb valor pronòstic.

BIBLIOGRAFIA

1. Woessner S, Florensa L. La citología óptica en el diagnóstico hematológico. 5th ed. Madrid: Acción Médica; 2006.
2. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell*. 2008;132(4):631–44.
3. Bulycheva E, Rauner M, Medyouf H, et al. Myelodysplasia is in the niche: novel concepts and emerging therapies. *Leukemia*. 2015;29(2):259–68.
4. Boulais PE, Frenette PS. Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood*. 2015;125(17):2621–9.
5. Hoffman R, Furie B, Benz EJ, et al. Hematology: Basic Principles and Practice. 5th ed. Hoffman R, editor. Elsevier Science Health Science Division; 2008.
6. Gottgens B. Regulatory network control of blood stem cells. *Blood*. 2015;125(17):2614–20.
7. Krumsiek J, Marr C, Schroeder T, et al. Hierarchical Differentiation of Myeloid Progenitors Is Encoded in the Transcription Factor Network. Pesce M, editor. *PLoS One*. 2011;6(8):e22649.
8. Van Lochem EG, van der Velden VHJ, Wind HK, et al. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry B Clin Cytom*. 2004;60:1–13.
9. Matarraz Sudón S. Caracterización inmunofenotípica de síndromes mielodisplàsicos [Tesis doctoral]. Universidad de Salamanca.; 2009.
10. Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, et al. Flow cytometric analysis of human bone marrow: I. Normal erythroid development. *Blood*. 1987;69(1):255–63.
11. Vardiman JW, Thiele J, Arber D a, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: Rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-51.
12. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al., editors. World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC; 2008.
13. Raza a, Gezer S, Mundle S, et al. Apoptosis in bone marrow biopsy samples involving stromal and hematopoietic cells in 50 patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1995;86(1):268–76.

14. Germing U, Strupp C, Kündgen A, et al. No increase in age-specific incidence of myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2004;89(8):905–10.
15. Phekoo KJ, Richards MA, Møller H, et al. The incidence and outcome of myeloid malignancies in 2,112 adult patients in southeast England. *Haematologica*. 2006;91(10):1400–4.
16. Neukirchen J, Schoonen WM, Strupp C, et al. Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes: data from the Düsseldorf MDS-registry. *Leuk Res*. 2011;35(12):1591–6.
17. Rollison DE, Howlader N, Smith MT, et al. Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001-2004, using data from the NAACCR and SEER programs. *Blood*. 2008;112(1):45–52.
18. Osca-Gelis G, Puig-Vives M, Saez M, et al. Population-based incidence of myeloid malignancies: fifteen years of epidemiological data in the province of Girona, Spain. *Haematologica*. 2013;98(8):e95–7.
19. Cogle CR, Craig BM, Rollison DE, et al. Incidence of the myelodysplastic syndromes using a novel claims-based algorithm: High number of uncaptured cases by cancer registries. *Blood*. 2011;117(26):7121–5.
20. Strom SS, Gu Y, Gruschkus SK, et al. Risk factors of myelodysplastic syndromes: a case–control study. *Leukemia*. 2005;19(11):1912–8.
21. Alter BP, Giri N, Savage S a, et al. Malignancies and survival patterns in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndromes cohort study. *Br J Haematol*. 2010;150(2):179–88.
22. Corey SJ, Minden MD, Barber DL, et al. Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(2):118–29.
23. Raza A, Galili N. The genetic basis of phenotypic heterogeneity in myelodysplastic syndromes. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(12):849–59.
24. Bellamy WT. Vascular endothelial cell growth factor is an autocrine promoter of abnormal localized immature myeloid precursors and leukemia progenitor formation in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2001 Mar 1;97(5):1427–34.
25. Stirewalt DL, Mhyre AJ, Marcondes M, et al. Tumour necrosis factor-induced gene expression in human marrow stroma: Clues to the pathophysiology of MDS? *Br J Haematol*. 2008;140(4):444–53.
26. Marcondes A, Ramakrishnan A, Deeg H. Myeloid Malignancies and the Marrow Microenvironment: Some Recent Studies in Patients with MDS. *Curr Cancer Ther Rev*. 2009;5(4):310–4.

27. Claessens Y-E. In vitro proliferation and differentiation of erythroid progenitors from patients with myelodysplastic syndromes: evidence for Fas-dependent apoptosis. *Blood*. 2002;99(5):1594–601.
28. Campioni D, Secchiero P, Corallini F, et al. Evidence for a role of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in the anemia of myelodysplastic syndromes. *Am J Pathol*. 2005;166(2):557–63.
29. Reddy PL, Shetty VT, Dutt D, et al. Increased incidence of mitochondrial cytochrome c-oxidase gene mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 2002;116(3):564–75.
30. Morel P, Hebbar M, Lai JL, 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(9):1315–23.
31. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997;89(6):2079–88.
32. Gondek LP, Tiu R, O’Keefe CL, et al. Chromosomal lesions and uniparental disomy detected by SNP arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-derived AML. *Blood*. 2008;111(3):1534–42.
33. Heinrichs S, Kulkarni R V, Bueso-Ramos CE, et al. Accurate detection of uniparental disomy and microdeletions by SNP array analysis in myelodysplastic syndromes with normal cytogenetics. *Leukemia*. 2009;23(9):1605–13.
34. Liu JM. Ribosomes and marrow failure: coincidental association or molecular paradigm? *Blood*. 2006;107(12):4583–8.
35. Pellagatti A, Hellström-Lindberg E, Giagounidis A, et al. Haploinsufficiency of RPS14 in 5q- syndrome is associated with deregulation of ribosomal- and translation-related genes. *Br J Haematol*. 2008;142(1):57–64.
36. Harada H, Harada Y, Niimi H, et al. High incidence of somatic mutations in the AML1/RUNX1 gene in myelodysplastic syndrome and low blast percentage myeloid leukemia with myelodysplasia. *Blood*. 2004;103(6):2316–24.
37. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, et al. Clinical Effect of Point Mutations in Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med*. 2011;364(26):2496–506.
38. Ko M, Huang Y, Jankowska AM, et al. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature*. 2010;468(7325):839–43.

39. Walter MJ, Ding L, Shen D, et al. Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2011;25(7):1153–8.
40. Ernst T, Chase AJ, Score J, et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet*. 2010;42(8):722–6.
41. Thol F, Friesen I, Damm F, et al. Prognostic significance of ASXL1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2011;29(18):2499–506.
42. Rhyasen GW, Starczynowski DT. Deregulation of microRNAs in myelodysplastic syndrome. *Leukemia*. 2012;26(1):13–22.
43. Colla S, Ong DST, Ogoti Y, et al. Telomere Dysfunction Drives Aberrant Hematopoietic Differentiation and Myelodysplastic Syndrome. *Cancer Cell*. 2015;27(5):644–57.
44. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 2011;478(7367):64–9.
45. Papaemmanuil E, Cazzola M, Boulwood J, et al. Somatic SF3B1 Mutation in Myelodysplasia with Ring Sideroblasts. *N Engl J Med*. 2011;365(15):1384–95.
46. Thol F, Kade S, Schlarmann C, et al. Frequency and prognostic impact of mutations in SRSF2, U2AF1, and ZRSR2 in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012;119(15):3578–84.
47. Shirai CL, Ley JN, White BS, et al. Mutant U2AF1 Expression Alters Hematopoiesis and Pre-mRNA Splicing In Vivo. *Cancer Cell*. 2015;27(5):631–43.
48. Kim E, Ilagan JO, Liang Y, et al. SRSF2 Mutations Contribute to Myelodysplasia by Mutant-Specific Effects on Exon Recognition. *Cancer Cell*. 2015;27(5):617–30.
49. Gañán-Gómez I, Wei Y, Starczynowski DT, et al. Deregulation of innate immune and inflammatory signaling in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2015;29(7):1458–69.
50. Kim M, Hwang S, Park K, et al. Increased Expression of Interferon Signaling Genes in the Bone Marrow Microenvironment of Myelodysplastic Syndromes. *PLoS One*. 2015;10(3):e0120602.
51. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2015;126(1):9–16.

52. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 1982;51(2):189–99.
53. Valent P, Horny HP, Bennett JM, 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(6):727–36.
54. 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).
55. Couronné L, Bastard C, Bernard O a. TET2 and DNMT3A Mutations in Human T-Cell Lymphoma. *N Engl J Med.* 2012;366(1):95–6.
56. Busque L, Patel JP, Figueroa ME, et al. Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. *Nat Genet.* 2012;44(11):1179–81.
57. Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, et al. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature.* 2014;506(7488):328–33.
58. Bejar R, Stevenson KE, Caughey B a., et al. Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol.* 2012;30(27):3376–82.
59. Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* 2014;28(2):241–7.
60. Cazzola M, Della Porta MG, Malcovati L. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. *Blood.* 2013;122(25):4021–34.
61. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, et al. CME Article Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2013;122(22):3616–27.
62. Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M, editors. *ISCN (2013): An International System for human Cytogenetic Nomenclature.* Basel: S. Karger Publishers; 2013.
63. Speicher MR, Carter NP. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet.* 2005;6(10):782–92.
64. Maciejewski JP, Mufti GJ. Whole genome scanning as a cytogenetic tool in hematologic malignancies. *Blood.* 2008;112(4):965–74.

65. Gresham D, Dunham MJ, Botstein D. Comparing whole genomes using DNA microarrays. *Nat Rev Genet.* 2008;9(4):291–302.
66. Schaaf CP, Wiszniewska J, Beaudet AL. Copy number and SNP arrays in clinical diagnostics. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2011;12(1):25–51.
67. Tiu R V, Gondek LP, O’Keefe CL, et al. Prognostic impact of SNP array karyotyping in myelodysplastic syndromes and related myeloid malignancies. *Blood.* 2011;117(17):4552–60.
68. Rajcan-Separovic E. Chromosome microarrays in human reproduction. *Hum Reprod Update.* 2012;18(5):555–67.
69. Sanger F, Nicklen S, Coulson a R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci.* 1977;74(12):5463–7.
70. Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach.* 2nd ed. Sunderland(MA): Sinauer Associates; 2000.
71. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet.* 2010;11(1):31–46.
72. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al., editors. *World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.* Lyon: IARC Press; 2001.
73. Germing U, Strupp C, Kuendgen A, et al. Prospective validation of the WHO proposals for the classification of myelodysplastic syndromes. *Haematologica.* 2006;91(12):1596–604.
74. Acín P, Florensa L, Andreu LL, et al. Cytoplasmic abnormalities of erythroblasts as a marker for ringed sideroblasts in myelodysplastic syndromes. *European journal of haematology.* 1995;276–8.
75. Broseus J, Florensa L, Zipperer E, et al. Clinical features and course of refractory anemia with ring sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Haematologica.* 2012 Jul 1;97(7):1036–41.
76. Broséus J, Alpermann T, Wulfert M, et al. Age, JAK2V617F and SF3B1 mutations are the main predicting factors for survival in refractory anaemia with ring sideroblasts and marked thrombocytosis. *Leukemia.* 2013;27(9):1826–31.
77. Visconte V, Rogers HJ, Singh J, et al. SF3B1 haploinsufficiency leads to formation of ring sideroblasts in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2012;120(16):3173–86.
78. Van den Berghe H, Cassiman JJ, David G, et al. Distinct haematological disorder with deletion of long arm of no. 5 chromosome. *Nature.* 1974;251(5474):437–8.

79. Ebert BL, Pretz J, Bosco J, et al. Identification of RPS14 as a 5q-syndrome gene by RNA interference screen. *Nature*. 2008;451(7176):335–9.
80. Dutt S, Narla A, Lin K, et al. Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. *Blood*. 2011;117(9):2567–76.
81. Peller S, Frenkel J, Lapidot T, et al. The onset of p53-dependent apoptosis plays a role in terminal differentiation of human normoblasts. *Oncogene*. 2003 Jul 24;22(30):4648–55.
82. Schneider RK, Ademà V, Heckl D, et al. Role of Casein Kinase 1A1 in the Biology and Targeted Therapy of del(5q) MDS. *Cancer Cell*. 2014;26(4):509–20.
83. Starczynowski DT, Kuchenbauer F, Argiropoulos B, et al. Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q- syndrome phenotype. *Nat Med*. Nature Publishing Group; 2010;16(1):49–58.
84. Fernandez-Mercado M, Burns A, Pellagatti A, et al. Targeted re-sequencing analysis of 25 genes commonly mutated in myeloid disorders in del(5q) myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2013;98(12):1856–64.
85. Mallo M, Cervera J, Schanz J, et al. Impact of adjunct cytogenetic abnormalities for prognostic stratification in patients with myelodysplastic syndrome and deletion 5q. *Leukemia*. 2011;25(1):110–20.
86. Giagounidis a a N, Germing U, Haase S, et al. Clinical, morphological, cytogenetic, and prognostic features of patients with myelodysplastic syndromes and del(5q) including band q31. *Leukemia*. 2004;18(1):113–9.
87. List A, Dewald G, Bennett J, et al. Lenalidomide in the Myelodysplastic Syndrome with Chromosome 5q Deletion. *N Engl J Med*. 2006;355(14):1456–65.
88. Barrett J, Sauntharajah Y, Molldrem J. Myelodysplastic syndrome and aplastic anemia: distinct entities or diseases linked by a common pathophysiology? *Semin Hematol*. 2000;37(1):15–29.
89. Young NS, Calado RT, Scheinberg P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. *Blood*. 2006;108(8):2509–19.
90. Lim ZY, Killick S, Germing U, et al. Low IPSS score and bone marrow hypocellularity in MDS patients predict hematological responses to antithymocyte globulin. *Leukemia*. 2007;21(7):1436–41.

91. Della Porta MG, Malcovati L, Boveri E, et al. Clinical relevance of bone marrow fibrosis and CD34-positive cell clusters in primary myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2009;27(5):754–62.
92. Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, et al. Time-Dependent Prognostic Scoring System for Predicting Survival and Leukemic Evolution in Myelodysplastic Syndromes. *J Clin Oncol*. 2007;25(23):3503–10.
93. Gonzalez-Porras JR, Cordoba I, Such E, et al. Prognostic impact of severe thrombocytopenia in low-risk myelodysplastic syndrome. *Cancer*. 2011;117(24):5529–37.
94. Cordoba I, Gonzalez-Porras JR, Such E, et al. The degree of neutropenia has a prognostic impact in low risk myelodysplastic syndrome. *Leuk Res*. 2012;36(3):287–92.
95. Schanz J, Tüchler H, Solé F, et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol*. 2012;30(8):820–9.
96. Greenberg PL. Molecular and genetic features of myelodysplastic syndromes. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2012;215–22.
97. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012;120(12):2454–65.
98. Schanz J, Steidl C, Fonatsch C, et al. 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 May 20;29(15):1963–70.
99. Jädersten M, Saft L, Smith A, et al. TP53 mutations in low-risk myelodysplastic syndromes with del(5q) predict disease progression. *J Clin Oncol*. 2011;29(15):1971–9.
100. Mallo M, del Rey M, Ibáñez M, et al. Response to lenalidomide in myelodysplastic syndromes with del(5q): Influence of cytogenetics and mutations. *Br J Haematol*. 2013;162:74–86.
101. Itzykson R, Kosmider O, Cluzeau T, et al. Impact of TET2 mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias. *Leukemia*. 2011;25(7):1147–52.
102. Sierra J, Pérez WS, Rozman C, et al. Bone marrow transplantation from HLA-identical siblings as treatment for myelodysplasia. *Blood*. 2002;100(6):1997–2004.

103. Alberts B, Bray D, Lewis J, et al. *Biología molecular de la célula*. 3a ed. Barcelona: Omega; 1996.
104. Nusbaum C, Mikkelsen TS, Zody MC, et al. DNA sequence and analysis of human chromosome 8. *Nature*. 2006;439(7074):331–5.
105. Gilbert F. Chromosome 8. *Genet Test*. 2001;5(4):345–54.
106. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins. *Patología estructural y funcional*. 6a ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A.U; 1999.
107. Huret J-L, Ahmad M, Arsaban M, et al. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology in 2013. *Nucleic Acids Res*. 2013 Jan 1;41(D1):D920–4.
108. Karadima G, Bugge M, Nicolaidis P, et al. Origin of nondisjunction in trisomy 8 and trisomy 8 mosaicism. *Eur J Hum Genet*. 1998;6(5):432–8.
109. Baidas S, Chen T-J, Kolev V, et al. Constitutional trisomy 8 mosaicism due to meiosis II non-disjunction in a phenotypically normal woman with hematologic abnormalities. *Am J Med Genet*. 2004;124A(4):383–7.
110. Jackson-Cook C. Constitutional and Acquired Autosomal Aneuploidy. *Clin Lab Med*. 2011;31(4):481–511.
111. Nielsen J, Wohler M. Sex chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark. *Birth Defects Orig Artic Ser*. 1990;26(4):209–23.
112. Cassidy SB, McGee BJ, van Eys J, et al. Trisomy 8 syndrome. *Pediatrics*. 1975;56(5):826-31.
113. Seghezzi L, Maserati E, Minelli A, et al. Constitutional trisomy 8 as first mutation in multistep carcinogenesis: Clinical, cytogenetic, and molecular data on three cases. *Genes Chromosom Cancer*. 1996;17(2):94–101.
114. Becker K, FitzGerald O, Green AJ, et al. Constitutional trisomy 8 and Behçet syndrome. *Am J Med Genet Part A*. 2009;149A(5):982–6.
115. Ganmore I, Smooha G, Izraeli S. Constitutional aneuploidy and cancer predisposition. *Hum Mol Genet*. 2009;18(R1):R84–93.
116. Zhang R, Hao L, Wang L, et al. Gene expression analysis of induced pluripotent stem cells from aneuploid chromosomal syndromes. *BMC Genomics*. BioMed Central Ltd; 2013;14(Suppl 5):S8.
117. Danesino C, Pasquali F, Dellavecchia C, et al. Constitutional trisomy 8 mosaicism: Mechanism of origin, phenotype variability, and risk of malignancies. *Am J Med Genet*. 1998;80(5):540–540.

118. Maserati E, Aprili F, Vinante F, et al. Trisomy 8 in myelodysplasia and acute leukemia is constitutional in 15-20% of cases. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2002;33(1):93–7.
119. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer (2013). , <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>.
120. Paulsson K, Heidenblad M, Strömbeck B, et al. High-resolution genome-wide array-based comparative genome hybridization reveals cryptic chromosome changes in AML and MDS cases with trisomy 8 as the sole cytogenetic aberration. *Leukemia*. 2006 May;20(5):840–6.
121. Solé F, Luño E, Sanzo C, et al. Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2005;90(9):1168–78.
122. Bernasconi P, Klersy C, Boni M, 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(3):193–205.
123. Haase D, Germing U, Schanz J, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: Evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood*. 2007;110(13):4385–95.
124. Paulsson K, Johansson B. Trisomy 8 as the sole chromosomal aberration in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Pathol Biol (Paris)*. 2007;55(1):37–48.
125. Toyama K, Ohyashiki K, Yoshida Y, et al. Clinical implications of chromosomal abnormalities in 401 patients with myelodysplastic syndromes: a multicentric study in Japan. *Leukemia*. 1993;7(4):499–508.
126. Pozdnyakova O, Miron PM, Tang G, 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(12):3331–40.
127. Mehrotra B, George TI, Kavanau K, et al. Cytogenetically aberrant cells in the stem cell compartment (CD34+lin-) in acute myeloid leukemia. *Blood*. 1995;86(3):1139–47.
128. Abruzzese E, Buss D, Rainer R, et al. Study of clonality in myelodysplastic syndromes: Detection of trisomy 8 in bone marrow cell smears by fluorescence in situ hybridization. *Leuk Res*. 1996;20(7):551–7.
129. Saitoh K, Miura I, Takahashi N, et al. Fluorescence in situ hybridization of progenitor cells obtained by fluorescence-activated cell sorting for the

- detection of cells affected by chromosome abnormality trisomy 8 in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1998;92(8):2886–92.
130. Fagioli F, Cuneo A, Bardi A, et al. Heterogeneity of lineage involvement by trisomy 8 in myelodysplastic syndrome. A multiparameter analysis combining conventional cytogenetics, DNA in situ hybridization, and bone marrow culture studies. *Cancer genetics and cytogenetics*. 1995;116–22.
 131. Nilsson L, Astrand-Grundström I, Anderson K, et al. Involvement and functional impairment of the CD34(+)CD38(-)Thy-1(+) hematopoietic stem cell pool in myelodysplastic syndromes with trisomy 8. *Blood*. 2002;100(1):259–67.
 132. Mertens F, Johansson M, Mitelman F. The pathogenetic significance of acquired trisomy 8 is not reducible to amplification of a single chromosome band. *Cancer genetics and cytogenetics*. 1995;176–7.
 133. Chen G, Zeng W, Miyazato A, et al. Distinctive gene expression profiles of CD34 cells from patients with myelodysplastic syndrome characterized by specific chromosomal abnormalities. *Blood*. 2004;104(13):4210–8.
 134. Sloan EM, Pfannes L, Chen G, et al. CD34 cells from patients with trisomy 8 myelodysplastic syndrome (MDS) express early apoptotic markers but avoid programmed cell death by up-regulation of antiapoptotic proteins. *Blood*. 2007;109(6):2399–405.
 135. Schmidt E V. The role of c-myc in cellular growth control. *Oncogene*. 1999;18(19):2988–96.
 136. Schuhmacher M, Staeger MS, Pajic A, et al. Control of cell growth by c-Myc in the absence of cell division. *Curr Biol*. 1999;9(21):1255–8.
 137. Fukuda S, Foster RG, Porter SB, et al. The antiapoptosis protein survivin is associated with cell cycle entry of normal cord blood CD34+ cells and modulates cell cycle and proliferation of mouse hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 2002;100(7):2463–71.
 138. Pellagatti a, Cazzola M, Giagounidis A, et al. Deregulated gene expression pathways in myelodysplastic syndrome hematopoietic stem cells. *Leukemia*. 2010;24(4):756–64.
 139. Sloan EM, Melenhorst JJ, Tucker ZCG, et al. T-cell immune responses to Wilms tumor 1 protein in myelodysplasia responsive to immunosuppressive therapy. *Blood*. 2011;117(9):2691–9.
 140. Ito K, Oji Y, Tatsumi N, et al. Antiapoptotic function of 17AA(+)/WT1 (Wilms' tumor gene) isoforms on the intrinsic apoptosis pathway. *Oncogene*. 2006;25(30):4217–29.

141. Zeng W, Chen G, Kajigaya S, et al. Gene expression profiling in CD34 cells to identify differences between aplastic anemia patients and healthy volunteers. *Blood*. 2004;103(1):325–32.
142. Virtaneva K, Wright F a, Tanner SM, et al. Expression profiling reveals fundamental biological differences in acute myeloid leukemia with isolated trisomy 8 and normal cytogenetics. *Proc Natl Acad Sci*. 2001;98(3):1124–9.
143. Schoch C, Kohlmann A, Dugas M, et al. Impact of trisomy 8 on expression of genes located on chromosome 8 in different AML subgroups. *Genes Chromosom Cancer*. 2006;45(12):1164–8.
144. Becker H, Maharry K, Mrózek K, et al. Prognostic gene mutations and distinct gene- and microRNA-expression signatures in acute myeloid leukemia with a sole trisomy 8. *Leukemia*. 2014;28(8):1754–8.
145. Squire J, Weksberg R. Genomic imprinting in tumours. *Semin Cancer Biol*. 1996;7(1):41–7.
146. Jelinic P, Shaw P. Loss of imprinting and cancer. *J Pathol*. 2007;211(3):261–8.
147. Diaz MO, Le Beau MM, Harden A, et al. Trisomy 8 in human hematologic neoplasia and the c-myc and c-mos oncogenes. *Leuk Res*. 1985;9(12):1437–42.
148. Paulsson K, Fioretos T, Strömbeck B, et al. Trisomy 8 as the sole chromosomal aberration in myelocytic malignancies: A multicolor and locus-specific fluorescence in situ hybridization study. *Cancer Genet Cytogenet*. 2003;140(1):66–9.
149. Heller a. Trisomy 8 as the sole chromosomal aberration in myelocytic malignancies: a comprehensive molecular cytogenetic analysis reveals no cryptic aberrations. *Cancer Genet Cytogenet*. 2003;146(1):81–3.
150. Hahm C, Mun YC, Seong CM, et al. Single nucleotide polymorphism array-based karyotyping in acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome with trisomy 8 as the sole chromosomal abnormality. *Acta Haematol*. 2013;129(3):154–8.
151. Issa JPJ. The myelodysplastic syndrome as a prototypical epigenetic disease. *Blood*. 2013; 121(19):3811–7.
152. Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Cheok M, et al. TET2 mutation is an independent favorable prognostic factor in myelodysplastic syndromes (MDSs). *Blood*. 2009;114(15):3285–91.

153. Lin T-L, Nagata Y, Kao H-W, et al. Clonal leukemic evolution in myelodysplastic syndromes with TET2 and IDH1/2 mutations. *Haematologica*. 2014;99(1):28–36.
154. Nikoloski G, Langemeijer SMC, Kuiper RP, et al. Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet*. 2010;42(8):665–7.
155. Abdel-Wahab O, Adli M, LaFave LM, et al. ASXL1 mutations promote myeloid transformation through loss of PRC2-mediated gene repression. *Cancer Cell*. 2012;22(2):180–93.
156. Chen T-C, Hou H, Chou W-C, et al. Dynamics of ASXL1 mutation and other associated genetic alterations during disease progression in patients with primary myelodysplastic syndrome. *Blood Cancer J*. 2014 Jan 17;4(1):e177.
157. Ward PS, Patel J, Wise DR, et al. The Common Feature of Leukemia-Associated IDH1 and IDH2 Mutations Is a Neomorphic Enzyme Activity Converting α -Ketoglutarate to 2-Hydroxyglutarate. *Cancer Cell*. Elsevier Ltd; 2010;17(3):225–34.
158. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 Mutations Result in a Hypermethylation Phenotype, Disrupt TET2 Function, and Impair Hematopoietic Differentiation. *Cancer Cell*. 2010;18(6):553–67.
159. Caramazza D, Lasho TL, Finke CM, et al. IDH mutations and trisomy 8 in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.* 2010;2120–2.
160. Thol F, Weissinger EM, Krauter J, et al. IDH1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes are associated with an unfavorable prognosis. *Haematologica*. 2010;95(10):1668–74.
161. Patnaik MM, Hanson C a, Hodnefield JM, et al. Differential prognostic effect of IDH1 versus IDH2 mutations in myelodysplastic syndromes: a Mayo Clinic Study of 277 patients. *Leukemia*. Nature Publishing Group; 2012;101–5.
162. Rocquain J, Carbuccia N, Trouplin V, et al. Combined mutations of ASXL1, CBL, FLT3, IDH1, IDH2, JAK2, KRAS, NPM1, NRAS, RUNX1, TET2 and WT1 genes in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *BMC Cancer*. 2010;10(1):401.
163. Epling-Burnette PK, Bai F, Painter JS, et al. Reduced natural killer (NK) function associated with high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) and reduced expression of activating NK receptors. *Blood*. 2007;109(11):4816–24.

164. Kiladjian J-J, Bourgeois E, Lobe I, et al. Cytolytic function and survival of natural killer cells are severely altered in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2006;20(3):463–70.
165. Chamuleau MED, Westers TM, Unen LVD, et al. Immune mediated autologous cytotoxicity against hematopoietic precursor cells in patients with myelodysplastic syndrome. *Haematologica*. 2009;94(4):496–506.
166. Kitagawa M, Kamiyama R, Kasuga T. Increase in number of bone marrow macrophages in patients with myelodysplastic syndromes. *European journal of haematology*. 1993; 56–8.
167. Maratheftis CI, Andreakos E, Moutsopoulos HM, et al. Toll-like Receptor-4 Is Up-Regulated in Hematopoietic Progenitor Cells and Contributes to Increased Apoptosis in Myelodysplastic Syndromes. *Clin Cancer Res*. 2007;13(4):1154–60.
168. Kornblau SM, McCue D, Singh N, et al. Recurrent expression signatures of cytokines and chemokines are present and are independently prognostic in acute myelogenous leukemia and myelodysplasia. *Blood*. 2010;116(20):4251–61.
169. Feng X, Scheinberg P, Wu CO, et al. Cytokine signature profiles in acquired aplastic anemia and myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2011;96(4):602–6.
170. Selleri C, Sato T, Anderson S, et al. Interferon- γ and tumor necrosis factor- α suppress both early and late stages of hematopoiesis and induce programmed cell death. *J Cell Physiol*. 1995;165(3):538–46.
171. Maciejewski J, Selleri C, Anderson S, et al. Fas antigen expression on CD34+ human marrow cells is induced by interferon gamma and tumor necrosis factor alpha and potentiates cytokine-mediated hematopoietic suppression in vitro. *Blood*. 1995;85(11):3183–90.
172. Itoh N, Yonehara S, Ishii A, et al. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*. 1991;66(2):233–43.
173. Navas T, Zhou L, Estes M, et al. Inhibition of p38 α MAPK disrupts the pathological loop of proinflammatory factor production in the myelodysplastic syndrome bone marrow microenvironment. *Leuk Lymphoma*. 2008;49(10):1963–75.
174. Molldrem JJ, Jiang YZ, Stetler-Stevenson M, et al. Haematological response of patients with myelodysplastic syndrome to antithymocyte globulin is associated with a loss of lymphocyte-mediated inhibition of CFU-GM and alterations in T-cell receptor V β profiles. *Br J Haematol*. 1998;102(5):1314–22.

175. Epperson DE, Nakamura R, Sauntharajah Y, et al. Oligoclonal T cell expansion in myelodysplastic syndrome: Evidence for an autoimmune process. *Leuk Res.* 2001;25(12):1075–83.
176. Melenhorst JJ, Eniafe R, Follmann D, et al. Molecular and flow cytometric characterization of the CD4 and CD8 T-cell repertoire in patients with myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol.* 2002;119(1):97–105.
177. Wlodarski MW, Gondek LP, Nearman ZP, et al. Molecular strategies for detection and quantitation of clonal cytotoxic T-cell responses in aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. *Blood.* 2006;108(8):2632–41.
178. Epling-Burnette PK, Painter JS, Rollison DE, et al. Prevalence and clinical association of clonal T-cell expansions in Myelodysplastic Syndrome. *Leukemia.* 2007;21(4):659–67.
179. Kiladjian J-J, Visentin G, Vey E, et al. Activation of cytotoxic T-cell receptor T lymphocytes in response to specific stimulation in myelodysplastic syndromes. *Haematologica.* 2008;93(3):381–9.
180. Kordasti SY, Afzali B, Lim Z, et al. IL-17-producing CD4 + T cells, pro-inflammatory cytokines and apoptosis are increased in low risk myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol.* 2009;145(1):64–72.
181. Kordasti SY, Ingram W, Hayden J, et al. CD4+CD25high Foxp3+ regulatory T cells in myelodysplastic syndrome (MDS). *Blood.* 2007;110(3):847–50.
182. Zhang Z, Li X, Guo J, et al. Interleukin-17 enhances the production of interferon- γ and tumour necrosis factor- α by bone marrow T lymphocytes from patients with lower risk myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol.* 2013;90(5):375–84.
183. Zou JX, Rollison DE, Boulware D, et al. Altered naive and memory CD4+ T-cell homeostasis and immunosenescence characterize younger patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia.* Nature Publishing Group; 2009;23(7):1288–96.
184. Amin HM. Increased apoptosis in bone marrow B lymphocytes but not T lymphocytes in myelodysplastic syndrome. *Blood.* 2003;102(5):1866–8.
185. Sternberg A. Evidence for reduced B-cell progenitors in early (low-risk) myelodysplastic syndrome. *Blood.* 2005;106(9):2982–91.
186. Ribeiro E, Sudón SM, Santiago M de, et al. Maturation-associated immunophenotypic abnormalities in bone marrow B-lymphocytes in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res.* 2006;30(1):9–16.

187. Biesma DH, van den Tweel JG, Verdonck LF. Immunosuppressive therapy for hypoplastic myelodysplastic syndrome. *Cancer*. 1997;79(8):1548–51.
188. Molldrem JJ, Leifer E, Bahceci E, et al. Antithymocyte globulin for treatment of the bone marrow failure associated with myelodysplastic syndromes. *Ann Intern Med*. 2002;137(3):156–63.
189. Yazji S, Giles FJ, Tsimberidou A-M, et al. Antithymocyte globulin (ATG)-based therapy in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2003;17(11):2101–6.
190. Sloand EM, Wu CO, Greenberg P, et al. Factors Affecting Response and Survival in Patients With Myelodysplasia Treated With Immunosuppressive Therapy. *J Clin Oncol*. 2008;26(15):2505–11.
191. Passweg JR, Giagounidis A a N, Simcock M, et al. Immunosuppressive Therapy for Patients With Myelodysplastic Syndrome: A Prospective Randomized Multicenter Phase III Trial Comparing Antithymocyte Globulin Plus Cyclosporine With Best Supportive Care--SAKK 33/99. *J Clin Oncol*. 2011;29(3):303–9.
192. Sloand EM, Kim S, Fuhrer M, et al. Fas-mediated apoptosis is important in regulating cell replication and death in trisomy 8 hematopoietic cells but not in cells with other cytogenetic abnormalities. *Blood*. 2002;100(13):4427–32.
193. Sloand EM, Mainwaring L, Fuhrer M, et al. Preferential suppression of trisomy 8 compared with normal hematopoietic cell growth by autologous lymphocytes in patients with trisomy 8 myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2005;106(3):841–51.
194. Sauntharajah Y, Nakamura R, Nam J-M, et al. HLA-DR15 (DR2) is overrepresented in myelodysplastic syndrome and aplastic anemia and predicts a response to immunosuppression in myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2002;100(5):1570–4.
195. Sauntharajah Y, Nakamura R, Wesley R, et al. A simple method to predict response to immunosuppressive therapy in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2003;102(8):3025–7.
196. Pedersen B. MDS and AML with trisomy 8 as the sole chromosome aberration show different sex ratios and prognostic profiles: a study of 115 published cases. *Am J Hematol*. 1997;56(4):224–9.
197. Maciejewski JP. Distinct clinical outcomes for cytogenetic abnormalities evolving from aplastic anemia. *Blood*. 2002;99(9):3129–35.