



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Doctorado en Biotecnología

**ESTUDIO CLÍNICO Y BIOLÓGICO DE LA LEUCEMIA
MIELOMONOCÍTICA CRÓNICA**

TESIS DOCTORAL

PRESENTADA POR:

Esperanza Such Taboada

DIRIGIDA POR:

Prof. Miguel A. Sanz Alonso

Dr. Guillermo Sanz Santillana

Valencia 2012

MIGUEL A. SANZ ALONSO, Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Universidad de Valencia,

GUILLERMO SANZ SANTILLANA, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Valencia,

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral titulada: "ESTUDIO CLÍNICO Y BIOLÓGICO DE LA LEUCEMIA MIELOMONOCÍTICA CRÓNICA", ha sido realizada bajo nuestra dirección por **Esperanza Such Taboada**, Licenciada en Biología, y reúne, a nuestro juicio condiciones suficientes para su presentación y defensa ante el tribunal correspondiente para optar al grado de **Doctor**.

Fdo.: Prof. Miguel A. Sanz Alonso

Fdo.: Dr. Guillermo Sanz Santillana

Valencia, Octubre 2012

“Lo perfecto es enemigo de lo bueno”

(Voltaire, *La Béguéule*, 1772)

Gracias Jefe ;-)

A mis padres

A mis hermanos

A Matteo

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Desde estas líneas me gustaría agradecer a todas y cada una de las personas que han ayudado a que esta Tesis saliera adelante y que, de una manera u otra, han estado a mi lado a lo largo de estos años en el Servicio de Hematología del Hospital La Fe.

En primer lugar quería darle las gracias al Prof. Miguel Ángel Sanz, mi director de Tesis, mi Jefe y mi amigo, gracias por haber guiado mi carrera desde antes de que me licenciara, por haberme brindado un sin fin de oportunidades, entre ellas y junto a su gran amigo el Prof. Francesco Lo Coco, el haberme permitido aprender todo lo relacionado con el diagnóstico molecular en un lugar tan especial como Roma y del que me traje mi mayor "tesoro". Gracias Jefe por haberme permitido aprender tanto a tu lado y sobre todo por haberme transmitido la ilusión y la pasión por la hematología. Me siento muy afortunada por disfrutar de lo que hago y levantarme con ilusión cada día.

Al Dr. Guillermo Sanz, quien me introdujo en el mundo de los síndromes mielodisplásicos y la leucemia mielomonocítica crónica, gracias por contar conmigo siempre y por ser tan accesible y tan cercano. Ha sido un lujo ver trabajar a esa mente privilegiada y he aprendido muchísimo en todos los trabajos que hemos realizado juntos.

Gracias al Dr. José Cervera, que sin ser director de esta Tesis podría considerarse Coautor de la misma. Durante estos años no sólo me has enseñado todo lo que sabes sobre citogenética y hematología sino también a trabajar con esmero, dedicación y entusiasmo, a disfrutar y aprender de cada caso nuevo, a ilusionarnos con cada proyecto, a buscar siempre más y no parar nunca en el camino. Gracias por confiar en mí, por dejarme saltar la línea del "becario", ¡por ser mi VºBº! y por todos y cada uno de los momentos de cada día.

A mis compañeras de laboratorio, a la Dra. Ana Valencia, mi mejor compañera, a la que sigo echando de menos aunque sepa que es feliz en Italia. Cuántas risas juntas, cuántos viajes, cuántas horas! Tu me hiciste ver que terminar la Tesis, escribir miles de artículos y trabajar de citogenetista era posible. A Mª Ángeles Silla, mi compañera de mesa desde que llegué, mi confidente y amiga. No hay nada mejor que aprender de la experiencia, del sentido común y del buen hacer.

A la Dra. Malé Senent yo quiero ser como tú y disfrutar de lo que hago toda mi vida! Gracias por estar ahí.

A las nuevas investigadoras en hematología, las futuras doctoras Irene, Mariam, Inés y María, a mis amigas, gracias por el inmejorable ambiente de trabajo que tenemos, por considerarnos más amigas que compañeras, por la cantidad de comidas y cenas juntas, por disfrutar de esto cada día. No sé donde estaré el día de mañana pero lo que sí sé es que será muy difícil repetir este envidiable ambiente de trabajo. Todo un lujo!

No me puedo olvidar de nuestros grandes técnicos Bea, Ana, Iván, M^a Carmen y Ángela gracias por vuestro trabajo de cada día y por haber puesto vuestro granito de arena en esta Tesis.

Al servicio de Hematología de La Fe al completo, en especial al equipo de diagnóstico: Drs.: Mariluz Pérez-Sirvent, Federico Gómis, Malé Senent, José Cervera, Amparo Sempere, Lourdes Cordón, Eva Barragán y Federico Moscardó (que sin ser de diagnóstico pasaba muchas horas con nosotros), todos ellos, junto el resto del laboratorio, consiguen que seamos mejores cada día.

No me quiero olvidar de todos y cada uno de los miembros del Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos y de los Drs.: Ulrich Germing y Mario Gazzola, que han colaborado con sus casos a que esta Tesis sea posible. En especial quería agradecer a aquellas personas que desinteresadamente se han preocupado de mandarme muestras y datos siempre que los he pedido.

A las familias Sanz-Caballer y Such-Ballester al completo, mi familia valenciana, gracias por hacerme sentir como en casa. En especial a Jaime, que sin saber muy bien por qué, siempre que necesitaba algún consejo acababa marcando su teléfono y se resolvía o diluía el problema.

A mis amigos de allí por seguir considerándome una más después de 10 años fuera y a mis amigas de aquí porque sólo hicieron falta unos días para que fuera como toda la vida juntas.

Agradecer por supuesto a los mas importantes, mi familia. A mis padre que ya sabían que este día llegaría aunque yo no los creyera. ¡Quiero irme a Málaga con vosotros! y a mis hermanos, por seguir tan unidos en la distancia y hacer de esta familia la que espero construir algún día.

Por último, por ser el primero, a Matteo. Gracias por ponerle fecha final a esta Tesis, ¡aunque llegue con seis meses de retraso! Gracias por aguantarme cada tarde a tu lado, codo con codo trabajando, por todas mis quejas y desesperaciones que siempre conseguías que acabaran en risas. Por fin podrás decir que te has casado con una Doctora.

ÍNDICE

GLOSARIO DE ABREVIATURAS	21
GLOSARIO DE GENES	25
1. INTRODUCCIÓN	29
1.1 Aproximación histórica	31
1.2 Epidemiología	34
1.3 Etiopatogenia	35
1.4 Clasificación de los SMD/SMPC	40
1.4.1 Clasificación FAB	40
1.4.2 Clasificación de la OMS	42
1.5 Caracterización	46
1.5.1 Manifestaciones clínicas	46
1.5.2 Morfología e histología	47
1.6 Citogenética	51
1.6.1 Groupe Français de Cytogénétique Hématologique	54
1.6.2 M. D. Anderson Cancer Centre (MDACC)	54
1.6.3 Registro de SMD de Düsseldorf	55
1.6.4 Grupo Español de Citogenética Hematológica	55
1.7 Biología Molecular	56
1.7.1 Implicaciones de los marcadores moleculares	56
1.7.1 PDGFRA y PDGFRB	58
1.7.2 FLT3	59
1.7.3 NPM1	60
1.7.4 c-FMS	61
1.7.5 JAK2	62
1.7.6 VEGFR1 (o KDR) y VEGFR2 (o FLT1)	63
1.7.7 c-CBL	65
1.7.8 IDH	66
1.8 Factores pronósticos	68
1.8.1 Índice de Bournemouth modificado	68
1.8.2 Índice español	69
1.8.3 Índice de Düsseldorf	69

1.8.4	<i>Índice del M.D. Anderson Cancer Center</i>	69
1.8.5	<i>Comparación de los principales índices pronósticos</i>	70
2.	HIPÓTESIS	73
3.	OBJETIVOS	77
4.	MATERIAL Y MÉTODOS	81
4.1	Pacientes.....	83
4.1.1	<i>Recogida de datos</i>	83
4.1.2	<i>Serie de estudio</i>	83
4.1.3	<i>Serie de validación</i>	84
4.2	Estudio citogenético.....	84
4.2.1	<i>Procesamiento de las muestras para el bandeo G</i>	84
4.2.2	<i>Análisis del cariotipo</i>	85
4.2.3	<i>Hibridación in situ Fluorescente (FISH)</i>	85
4.3	Estudio de las alteraciones moleculares.....	86
4.3.1	<i>Extracción de ácidos nucleicos</i>	86
4.3.2	<i>FLT3 y NPM1</i>	86
4.3.3	<i>JAK2</i>	87
4.3.4	<i>c-FMS, KDR, FLT1, c-CBL, IDH1 e IDH2</i>	87
4.4	Análisis estadístico.....	91
5.	RESULTADOS	93
5.1	Descripción de la serie.....	95
5.1.1	<i>Comparación entre LMMC-MD y LMMC-MP</i>	97
5.1.2	<i>Comparación entre LMMC-1 y LMMC-2</i>	97
5.2	Citogenética.....	97
5.2.1	<i>Descripción</i>	97
5.2.2	<i>Asociación de la citogenética con otras variables</i>	99
5.2.3	<i>Impacto de las alteraciones citogenéticas en la supervivencia</i>	100
5.2.4	<i>Propuesta de una clasificación de riesgo citogenético</i>	103
5.3	Alteraciones moleculares.....	114
5.3.1	<i>FLT3 y NPM1</i>	114
5.3.2	<i>JAK2</i>	115
5.3.3	<i>c-FMS, FLT1, KDR, c-CBL, IDH1 e IDH2</i>	115
5.3.4	<i>Reordenamiento de los genes PDGFRA y PDGFRB</i>	117

5.4	Factores pronósticos en LMMC	117
5.4.1	<i>Supervivencia global</i>	117
5.4.2	<i>Riesgo de Evolución a LMA</i>	120
5.4.3	<i>Propuesta de un nuevo índice pronóstico (CPSS)</i>	123
5.5	Serie validación.....	127
5.5.1	<i>Validación del nuevo índice pronóstico (CPSS)</i>	130
5.6	Comparación con otros sistemas pronósticos	133
6.	DISCUSIÓN	139
6.1	Factores clínico-biológicos y citogenéticos.....	140
6.2	Estudio de mutaciones.....	147
7.	CONCLUSIONES	151
8.	BIBLIOGRAFIA	155

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

Por orden alfabético:

AR	Anemia refractaria
AREB	Anemia refractaria con exceso de blastos
AREB-t	Anemia refractaria con exceso de blastos en transformación
ARSA	Anemia refractaria con sideroblastos en anillo
CFU	Unidades formadoras de colonias
CGH	Hibridación genómica comparada
CPSS	Índice pronóstico específico para LMMC
FAB	Franco-Americano-Británico
FISH	Hibridación in situ fluorescente
GESMD	Grupo Cooperativo Español de SMD
IPSS	International Prognostic Scoring System
ISCN	Sistema Internacional de Nomenclatura Cromosómica
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMC	Leucemia mieloide crónica
LMCa	Leucemia mieloide crónica atípica
LMMC	Leucemia mielomonocítica crónica
LMMC-MD	LMMC con características mielodisplásicas
LMMC-MP	LMMC con características mieloproliferativas
LMMJ	Leucemia mielomonocítica juvenil
MDACC	M.D. Anderson Cancer Center
MO	Médula ósea
OMS	Organización Mundial de la Salud
RESMD	Registro Español de SMD
SMD	Síndrome mielodisplásico

SMPC	Síndromes mieloproliferativos crónicos
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SP	Sangre periférica
UPD	Disomía uniparental
VEGF	Vascular endothelial growth factor

GLOSARIO DE GENES

GLOSARIO DE GENES

Por orden alfabético:

<i>ASXL1</i>	Additional sex combs like 1 (Drosophila)
<i>BCR-ABL1</i>	Breakpoint cluster region, c-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase
<i>c-CBL</i>	Cbl proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase
<i>c-FMS</i>	CSF1R, colony stimulating factor 1 receptor
<i>c-KIT</i>	V-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
<i>DNMT3A</i>	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha
<i>EZH2</i>	Enhancer of zeste homolog 2 (Drosophila)
<i>FGFR1</i>	Fibroblast growth factor receptor 1
<i>FLT1</i>	Fms-related tyrosine kinase 1
<i>FLT3</i>	Fms-related tyrosine kinase 3
<i>IDH1</i>	Isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble
<i>IDH2</i>	Isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial
<i>JAK2</i>	Janus kinase 2
<i>KDR</i>	Kinase insert domain receptor
<i>KRAS</i>	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
<i>MYC</i>	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog
<i>NPM1</i>	Nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)
<i>NRAS</i>	Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
<i>PDGFRA</i>	Platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide
<i>PDGFRB</i>	Platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide
<i>RUNX1</i>	Runt-related transcription factor 1
<i>TET2</i>	Tet methylcytosine dioxygenase 2
<i>UTX</i>	KDM6A, lysine (K)-specific demethylase 6

1. INTRODUCCIÓN

La leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) es un trastorno hematológico clonal poco frecuente que suele afectar a pacientes de edad avanzada y que tiene una expresión clínica y morfológica muy variable. Se caracteriza por un incremento de células de estirpe monocítica tanto en médula ósea como en sangre periférica. Su forma de presentación puede oscilar desde un cuadro de hematopoyesis ineficaz con una médula ósea hiper celular, citopenias en sangre periférica y rasgos displásicos en una o más de las líneas hematopoyéticas, hasta en un cuadro medular netamente mieloproliferativo acompañado con frecuencia de visceromegalias.

El sustrato biológico que subyace bajo esta heterogeneidad es desconocido en su mayor parte. Los estudios orientados en este sentido para desentrañar dicho sustrato biológico pueden ser claves para la aplicación terapéutica de nuevos fármacos, lo que constituye un desafío para los próximos años.

1.1 Aproximación histórica

La LMMC se clasificó inicialmente como un subtipo de síndrome mielodisplásico (SMD), ya que se trataba de un desorden hematopoyético caracterizado por un incremento en el recuento de monocitos, a menudo acompañado de anemia, trombopenia o ambas con una médula ósea hiper celular con alteraciones displásicas en la eritropoyesis, la granulopoyesis o la trombopoyesis. Además, una sustancial proporción de casos con LMMC presentan ciertos rasgos dado el “mieloproliferativos” junto a los rasgos displásicos.

Los SMD son un grupo heterogéneo de trastornos hematológicos caracterizados, en la mayoría de los pacientes, por citopenias en sangre periférica junto a una médula ósea hiper celular, aunque es hipocelular en alrededor del 25% de los casos. A principios del siglo XX se hacía hincapié en el carácter preleucémico de los SMD, es decir, su tendencia a desarrollar una leucemia aguda, habitualmente de estirpe mieloide, durante la evolución de la enfermedad. En estos pacientes existe un delicado balance entre un programa de muerte celular acelerado (apoptosis) y una proliferación de las células madre

hematopoyéticas leucémicas que permite, en una proporción no despreciable de los casos, una supervivencia prolongada. Sin embargo, la historia natural de estos síndromes comprende desde formas indolentes, con evolución estable durante muchos años, hasta formas que rápidamente evolucionan a leucemia aguda que oscilan entre un 6 y 40% en los SMD y un 15 y 20% en las LMMC.

Al tratarse los SMD de un grupo de enfermedades con unas manifestaciones clínicas y una evolución muy heterogénea, han sido referidos en la literatura con una terminología muy variada hasta que comenzó a emplearse de forma generalizada éste término. Así, en 1938, Rhoads y Barker aplicaron el término “anemia refractaria” a una entidad caracterizada por anemia en presencia de diseritropoyesis medular, refiriéndose tanto a casos primarios como a secundarios a otros procesos (Rhoads *et al.*, 1938). Posteriormente, en 1949, Hamilton-Paterson emplearía el término “anemia preleucémica” para referirse a algunos casos de anemia refractaria que habían acabado desarrollando una leucemia aguda. Otros autores utilizaron los términos preleucemia (Saarni *et al.*, 1973), leucemia aguda quiescente (smoldering) (Rheingold *et al.*, 1963), o leucemia mielomonocítica crónica (Geary CG *et al.*, 1975), entre otros. Sin embargo, no fue hasta 1976 cuando el grupo cooperativo Franco-Americano-Británico (FAB), durante la primera reunión para establecer la clasificación de las leucemias agudas (Bennett *et al.*, 1976) denominó “Síndromes Mielodisplásicos” a un grupo de enfermedades que tenían algunas características comunes con las leucemias agudas pero que, a diferencia de éstas, tenían un curso crónico o subagudo, habitualmente no necesitaban un tratamiento inmediato y afectaban mayoritariamente a pacientes mayores (Tabla 1). En ese momento se reconocieron dos categorías distintas: la anemia refractaria con exceso de blastos y la leucemia mielomonocítica crónica, y se puso de manifiesto que algunas evolucionaban a leucemia aguda coincidiendo con un aumento del número de blastos. El límite entre “síndromes mielodisplásicos” y leucemia aguda se marcó de forma arbitraria en un 30% de blastos en médula ósea.

Tabla 1. Cronología y terminología de los SMD (Vallespi *et al.*, 1998).

Término	Año	Autores
Anemia refractaria	1938	Rhoads & Barker
Anemia preleucémica	1949	Hamilton-Paterson
Preleucemia	1953	Block <i>et al.</i>
Anemia refractaria con sideroblastos en anillo	1956	Björkman
Anemia normoblástica refractaria	1959	Dacie <i>et al.</i>
Leucemia aguda quiescente	1963	Rheingold <i>et al.</i>
Mielosis eritrémica crónica	1965	Dameshek
Síndrome preleucémico	1973	Saarni and Linman
Leucemia mielomonocítica subaguda	1974	Sexauer <i>et al.</i>
Leucemia mielomonocítica crónica	1974	Miescher & Farquet
Síndromes mielodisplásicos	1976	Dreyfus
Subgrupos FAB	1982	Bennett <i>et al.</i>

En sucesivas revisiones en 1982 y en 1985 (Bennett *et al.*, 1976, 1982 y 1985), el grupo FAB fue proponiendo y refinando los criterios que definían las distintas variedades de SMD y que los deslindaban de la leucemia mieloide aguda (LMA). Así quedaron agrupados bajo el término SMD las cinco categorías que se han usado de forma generalizada en la práctica clínica hasta el momento: anemia refractaria (AR), anemia refractaria con sideroblastos en anillo (ARSA), LMMC, anemia refractaria con exceso de blastos (AREB) y anemia refractaria con exceso de blastos en transformación (AREB-t).

Sin duda, el mayor éxito de la clasificación FAB fue su aceptación universal para el diagnóstico de los SMD (Sanz *et al.*, 1989). No obstante, esta clasificación no estaba exenta de limitaciones, lo que motivó nuevas propuestas como la de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Jaffe *et al.*, 2001), recientemente revisada (Swerdlow *et al.*, 2008). Como se detallará más adelante, en esta nueva clasificación, la LMMC ha sido desgajada de los SMD e integrada

en una nueva categoría denominada Neoplasias Mielodisplásicas/ Mieloproliferativas.

1.2 Epidemiología

No hay datos fiables sobre la incidencia de la LMMC ya que, en la mayoría de los estudios, se agrupa junto con las leucemias mieloides crónicas o junto a los SMD. El análisis de las principales series en las que se analiza la incidencia de los distintos subgrupos de los SMD según la clasificación FAB y, concretamente en aquellas que no están sesgadas por el recuento de leucocitos (aunque incluyen pacientes entre 20 - 30% blastos), sugiere que la LMMC representa una proporción en torno al 18% de los SMD (Tabla 2). Los SMD tienen una incidencia estimada de 12,8 casos por 100.000 habitantes/año, por tanto la incidencia estimada de LMMC sería en torno a 3,9 casos por 100.000 habitantes/año (Swerdlow *et al.*, 2008). La LMMC afecta en mayor proporción al sexo masculino (1,8:1) y la mediana de edad al diagnóstico se sitúa en torno a los 72 años (Germing *et al.*, 2004).

Tabla 2. Distribución de frecuencia de los subtipos de SMD según la FAB.

Estudio	Nº	Distribución (%)				
		AR	ARSA	AREB	AREB-t	LMMC
Sanz <i>et al.</i> , 1989	370	23	16	32	10	19
Greenberg <i>et al.</i> , 1997	816	36	15	26	28	15
Pfeilstöcker <i>et al.</i> , 1999	386	33	10	21	12	24
Solé <i>et al.</i> , 2005	968	27	16	28	11	18
Haase <i>et al.</i> , 2007	2124	28	12	20	15	14
TOTAL	1412	30	13	23	15	18

En los últimos años parece observarse un progresivo incremento de los casos diagnosticados, sin duda influenciado por diversos factores como el incremento de la edad media de la población, mejora de las técnicas de cribado

y diagnóstico, aumento de las mielodisplasias secundarias a tratamientos y posibles factores ambientales no bien establecidos (Swerdlow *et al.*, 2008).

1.3 Etiopatogenia

La etiología de la LMMC es desconocida y su patogenia comprende alteraciones en las rutas de regulación de la proliferación, diferenciación y apoptosis de las células hematopoyéticas progenitoras mieloides. Se caracteriza por una médula ósea hipercelular debida a la proliferación de una o más de las líneas de la serie mieloide. Con frecuencia, la proliferación de una o varias de estas líneas es eficaz y da lugar a un mayor número de células circulantes. Sin embargo, estas células pueden ser morfológica y funcionalmente displásicas. Simultáneamente, una o más de las otras líneas celulares puede exhibir una proliferación ineficaz, por lo que también pueden presentarse citopenias. Los síntomas clínicos se deben a las complicaciones producidas por las citopenias, la producción de células displásicas que no funcionan normalmente, la infiltración leucémica en los diferentes órganos o síntomas generales como fiebre o malestar (Bain B.J. 1999).

Diversos estudios han demostrado que, al igual que en los SMD, la patogenia de la LMMC se explica por un trastorno clonal de la célula madre hematopoyética caracterizados por una maduración defectuosa y, en estadios avanzados, una proliferación descontrolada (Okamoto *et al.*, 1998). Como en otros trastornos neoplásicos, en la patogénesis de la LMMC cabe suponer la existencia de múltiples lesiones sucesivas que conducen a la aparición de un clon anormal. Tras un daño inicial de los progenitores hematopoyéticos inducido por sustancias químicas, radiaciones, drogas citotóxicas o mutaciones endógenas espontáneas, la suma de sucesivas alteraciones pueden afectar a estas células, confiriéndoles una ventaja proliferativa. Las alteraciones de carácter mielodisplásico se originan en las células precursoras pluripotenciales, que normalmente dan lugar a las células de la serie roja, neutrófilos polimorfonucleares, monocitos y plaquetas. Cuando se producen una disrupción de la jerarquía de la maduración mieloide resulta en un trastorno hematopoyético caracterizado por un exceso o una deficiencia en las células efectoras maduras.

Estos cambios pueden incluir alteraciones clonales en la función de algunos genes (pérdida o ganancia de función) debidas a mutaciones individuales, alteraciones cromosómicas (balanceadas o no balanceadas) o fenómenos epigenéticos, como el silenciamiento de la expresión génica por hipermetilación aberrante, que pueden afectar a oncogenes, genes relacionados con el ciclo celular o factores de transcripción, así como a genes supresores de tumores. Generalmente se requiere la pérdida de función de ambos alelos de un gen supresor de tumores para que su efecto leucemogénico se manifieste. Sin embargo, la haploinsuficiencia (pérdida de función de una sola copia del gen) resulta en una reducción de los productos del gen, y también puede tener un papel patogénico. Existen crecientes evidencias de que este último mecanismo es fundamental en determinados SMD con deleciones 5q, 7q y 20q y en genes como *c-CBL* o *TET2* en la patogénesis de la LMMC (Langemeijer *et al.*, 2009; Kosmider *et al.*, 2009; Tefferi *et al.*, 2009).

Se sabe que un incremento de la apoptosis intramedular parece contribuir a la hematopoyesis ineficaz de los SMD (Yoshida *et al.*, 1999), y podría explicar, al menos en parte, la aparente paradoja de la coexistencia de citopenias en sangre periférica con una celularidad medular aumentada. Así, se ha demostrado que la actividad de las caspasas 1 y 3, efectores finales de la apoptosis, está aumentada en las células de médula ósea de los pacientes con SMD de bajo riesgo (Parker *et al.*, 2001), pero que el incremento de la apoptosis que se produce en las fases iniciales de los SMD declina conforme progresan a fases más avanzadas. En la actualidad, sin embargo, se desconoce si este incremento de los procesos apoptóticos guarda relación con la patogenia de la enfermedad o si, por el contrario, no es más que una respuesta compensatoria indirecta a la hiperproliferación anormal.

Por otro lado, las alteraciones de carácter mieloproliferativo de la LMMC son evidentes al estudiar el patrón *in vitro* de crecimiento de unidades formadoras de colonias (CFU). A diferencia de los otros subtipos de SMD, y de forma similar a los síndromes mieloproliferativos crónicos (SMPC), la LMMC se caracteriza por un aumento de formación de CFU granulo-monocíticas y macrofágicas (Greenberg *et al.*, 1996) en ausencia de suplemento exógeno de factores de crecimiento hematopoyético, lo que sugiere la existencia de factores de crecimiento autocrinos secretados por los monocitos leucémicos. Así, hay

estudios donde se demuestra que el factor estimulante de colonias granulomonocíticas, producido por mecanismos tanto autocrinos como paracrinos, es determinante en el crecimiento de las células en algunos pacientes con LMMC (Ramshaw *et al.*, 2002), señalando el potencial terapéutico de las estrategias orientadas al bloqueo de esta citoquina.

Recientemente, gracias a las nuevas técnicas de cribado genético como los chips de polimorfismos (SNP, Single Nucleotide Polymorphism), chips de hibridación genómica comparada (CGH), secuenciación de exones, y secuenciación masiva, entre otros, han permitido detectar diversas anomalías moleculares no conocidas en neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas como las mutaciones en *TET2*, *ASXL1*, *CBL*, *IDH1/IDH2* (Tefferi *et al.*, 2010) *EZH2*, *UTX*, y *DNMT3A* (Jankowska *et al.*, 2011). Diversos estudios han demostrado la existencia de estas mutaciones en LMMC y el impacto pronóstico que tienen (Gelsi-Boyer *et al.*, 2010; Kuo *et al.*, 2009; Kohlmann *et al.*, 2010). Algunos de estos nuevos marcadores parecen estar alterados en la LMMC con mayor frecuencia de lo que lo están en otras neoplasias mieloides. Así, por ejemplo, las mutaciones de *ASXL1* están presentes en más del 40% de los pacientes con LMMC, *TET2* presenta una incidencia de entre el 30 y el 50% según las series (Kosminder *et al.*, 2009, Langemeijer *et al.*, 2009), las mutaciones de *CBL* que afectan a alrededor de un 15% de las LMMC (Kohlmann *et al.*, 2010). Además, de otros genes como *UTX*, *DNMT3A*, y *EZH2*, recientemente descritos, en los que se han descubierto nuevas mutaciones en el 8%, 10%, y 5.5% de los pacientes, respectivamente (Jankowska *et al.*, 2011). Sin embargo para muchos de estos marcadores, la verdadera frecuencia y su impacto pronóstico en la LMMC requiere todavía de estudios adicionales con series más amplias.

Las mutaciones en el gen *TET2* (miembro de la familia de oncogenes 2) han sido identificadas en distintas neoplasias mieloides (Delhommeau *et al.*, 2009) y se ha visto que se encuentran repartidas a lo largo de varios exones. En su mayoría, son mutaciones que modifican la pauta de lectura produciendo generalmente una traducción truncada. De acuerdo con un estudio reciente, la aparición de mutaciones en *TET2* podría estar vinculada a una actividad enzimática anómala que favorecería la tumorigénesis mieloide (Ko *et al.*, 2010). Por el momento, en la LMMC las frecuencias descritas son bastante altas,

habiéndose reportado un 15% y un 22% en los estudios de Tefferi *et al.*, (2009) y Delhommeau *et al.*, (2009), respectivamente, mientras que la incidencia sería del 35% y del 50% en las series publicadas por Jankowska *et al.*, (2009) y Kosmider *et al.*, (2009a), respectivamente. Se ha sugerido que las mutaciones en este gen podrían asociarse a la desregulación de la estirpe monocítica. Kosmider *et al.*, (2009a) describió un impacto pronóstico adverso de las mutaciones *TET2* en los pacientes con LMMC, a diferencia de lo publicado hasta el momento, que sugería que en otros subtipos de SMD las mutaciones en *TET2* tienen un impacto favorable (Kosmider *et al.*, 2009b). Recientemente, Smith *et al.*, (2010) ha publicado los resultados obtenidos tras la secuenciación masiva de 320 pacientes SMD y 35 pacientes con LMMC. El tasa de mutaciones en *TET2* fue de 46% en los pacientes con LMMC frente al 12% de los pacientes con SMD ($P < .001$). Según estos autores, el estado mutacional de *TET2* no tiene impacto pronóstico ya que no encontraron que tuviera correlación con el estadio del IPSS en este estudio (Smith *et al.*, 2010). Por todo ello, está todavía por determinar si las mutaciones en el gen *TET2* tienen valor pronóstico en los pacientes con LMMC.

Por otro lado, el gen *c-CBL* (casitas B-cell lymphoma) que codifica a la proteína CBL tiene función de ubiquitinación de diferentes tirosinas quinasa. En pacientes con LMA, se identificaron casos esporádicos con alteraciones en esta proteína debidos a errores en los procesos de splicing alternativo en los exones 8 y 9 (Caligiuri *et al.*, 2007; Sargin *et al.*, 2007). Desvelando que estas alteraciones estaban producidas por mutaciones localizadas en el dominio de unión entre la tirosina quinasa y el dominio de RING. Este dominio de unión es esencial para la interacción entre ambos y garantiza la función reguladora negativa de CBL. Posteriormente, se han descrito nuevas mutaciones sin sentido (Caligiuri *et al.*, 2007; Dunbar *et al.*, 2008; Reindl *et al.*, 2009) y mutaciones puntuales en distintos tipos de neoplasias mieloproliferativas y LMMC (Dunbar *et al.*, 2008; Sanada *et al.*, 2009). Se ha reportado una incidencia tan dispar de esta mutación como el 5% (Makishima *et al.*, 2009) y el 18% (Kohlmann *et al.*, 2010), no habiéndose esclarecido aún el impacto pronóstico.

El gen *ASXL1* (additional sex-comb like 1) ha sido otro de los nuevos genes que se han encontrado alterados recientemente en LMMC. Pertenece a

una familia de tres miembros que codifican proteínas poco caracterizadas que se encargan de regular la estructura de la cromatina. Además, recientemente se ha sugerido la posibilidad de que puedan tener un papel como supresores de tumores. En diversas neoplasias mieloides, incluyendo SMD, neoplasias mieloproliferativas o LMA de novo, las mutaciones que se han identificado se localizan en exón 12 (Carbuccia *et al.*, 2009; Gelsi-Boyer *et al.*, 2009). Todo parece indicar que estas mutaciones afectan a la regulación de la transcripción y a la señalización mediada por RAS (Tefferi, *et al.*, 2010). Su frecuencia se ha establecido en torno al 40%, destacando una mayor frecuencia en los casos LMMC con características mieloproliferativas (LMMC-MP) comparados con los casos de LMMC con características mielodisplásicas (LMMC-MD) y los que se transformaron a LMA. (62% vs. 22% y 28%, respectivamente, $P = .022$; Gelsi-Boyer *et al.*, 2009). Poco después, Fisher *et al.*, (2010) analizando ratones knock-out deficientes en *ASXL1* observó que se producían anomalías en la diferenciación de progenitores linfoides y mieloides.

Uno de los genes que se han encontrado alterados recientemente en neoplasias mieloides es *IDH1* e *IDH2* (Green & Beer, 2010). Kosmider *et al.*, (2010) ha descrito la aparición de mutaciones en el *IDH1/IDH2* en 9% de los pacientes ($n=88$), localizándose todas ellas en *IDH2*. En dos de estos pacientes se encontraron a su vez mutaciones en el gen *TET2*, por ello se apunta a la posibilidad de que exista una asociación específica entre las mutaciones de *IDH2* y de *TET2* en los pacientes con LMMC (Kosmider *et al.*, 2010).

Aunque el impacto pronóstico de muchas de estas alteraciones genéticas en la LMMC tiene que ser aclarado, la detección de estos marcadores moleculares ya puede contribuir a una mejor caracterización de esta entidad (Tabla 3).

Tabla 3. Frecuencia de las mutaciones encontradas en LMMC.

Gen Mutado	Frecuencia (%)	Referencias	Pronóstico
JAK2 V617F	9/116 (7.8)	Levine <i>et al.</i> (2005)	Asociado a LMMC-MP
	8/78 (10.2)	Pich <i>et al.</i> (2009)	
	8/81 (9.9)	Kohlman <i>et al.</i> (2010)	
NPM1	3/60 (5)	Caudill <i>et al.</i> (2006)	No Conocido
RAS	25/65 (38.5)	Onida <i>et al.</i> (2002)	Asociado a LMMC-MP > riesgo de progresión
	22/84 (26.2)	Loh <i>et al.</i> (2005)	
	NRAS: 18/81 (22.2)	Kohlman <i>et al.</i> (2010)	
	KRAS: 10/81 (12.3)	Kohlman <i>et al.</i> (2010)	
RUNX 1	9/29 (31)	Gelsi-Boyer <i>et al.</i> (2008)	> riesgo de progresión
	30/81 (37)	Kuo <i>et al.</i> (2009)	
	7/81 (8.6)	Kohlman <i>et al.</i> (2010)	
FLT3	3/38 (8)	Braun <i>et al.</i> (2011)	No Conocido
CBL	2/38 (5.3)	Makishima <i>et al.</i> (2009)	> Supervivencia global
	15/81 (18.5)	Kohlman <i>et al.</i> (2010)	
TET2	6/17 (35.3)	Jankowska <i>et al.</i> (2009)	Controversia sobre: > Supervivencia global
	3/15 (20)	Tefferi <i>et al.</i> (2009)	
	36/81 (44.4)	Kohlman <i>et al.</i> (2010)	
IDH	7/88 (7.9)	Kosmider <i>et al.</i> , (2009a)	No Conocido
ASXL1	17/39 (43.6)	Gelsi-Boyer <i>et al.</i> (2009)	Asociado a LMMC-MP < Supervivencia global
	3/29 (10.3)	Gelsi-Boyer <i>et al.</i> (2008)	

1.4 Clasificación de los SMD/SMPC

1.4.1 Clasificación FAB

El establecimiento de unos criterios diagnósticos se realizó por primera vez entre 1974-1975, cuando el Grupo FAB trabajó en refinar la nomenclatura y la clasificación de las leucemias agudas. Desde que en 1982 este grupo estableciera la primera clasificación de los SMD, a pesar de sus limitaciones, constituyó el primer consenso para el diagnóstico y guía para el tratamiento de estas enfermedades que aún sigue utilizándose (Tabla 4).

Tabla 4. Clasificación FAB de los SMD.

Subtipo	Blastos SP (%)	Blastos MO (%)	Monocitos SP	Sideroblastos anillados MO (%)
AR	< 1	< 5	< $1 \times 10^9/L$	< 15
ARS	< 1	< 5	< $1 \times 10^9/L$	≥ 15
AREB	< 5	5 - 20	< $1 \times 10^9/L$	Indiferente
AREB-t	≥ 5	21 - 30	< $1 \times 10^9/L$	Indiferente
LMMC	< 5	0 - 20	> $1 \times 10^9/L$	Indiferente

SP, Sangre periférica; MO, Médula ósea.

En la clasificación propuesta por la FAB en 1982, la LMMC quedó definida por la presencia de $>1 \times 10^9/L$ monocitos en sangre periférica, frecuentemente asociada con un incremento de granulocitos inmaduros, con o sin rasgos de disgranulopoyesis (hipogranulación y/o formas Pelger). El porcentaje de blastos en sangre periférica debía ser menor al 5% y, en médula ósea, podía mostrar un aumento de precursores monocíticos (promonocitos) con un porcentaje de blastos inferior al 20%.

A pesar de que la clasificación FAB ha sido la más usada en los últimos años, ésta tiene una serie de limitaciones. Esta clasificación sólo incluye datos morfológicos, lo que no permite diagnosticar con certeza ciertas entidades (Rosati *et al.*, 1996) y, por otro lado, su aportación pronóstica es inferior a la que proporcionan los esquemas integrados que incorporan otros parámetros clínicos y sobre todo citogenéticos (Germing *et al.*, 2000).

1.4.1.1 SMD vs. SMPC

Tanto clínica como morfológicamente, la LMMC comprende al menos dos subgrupos bien diferenciados: uno con características más próximas a los SMD y otro a los SMPC. Basándose en el recuento leucocitario en sangre periférica, el grupo FAB en 1994 publicó una nueva propuesta donde se distinguían dos subtipos de LMMC: el subtipo mielodisplásico (LMMC-MD), caracterizado por un recuento leucocitario $<13 \times 10^9/L$, y el subtipo mieloproliferativo (LMMC-MP), con

una cifra de leucocitos $\geq 13 \times 10^9/L$ (Bennett *et al.*, 2004). El subgrupo de LMMC-MD representaría entre el 35% y el 51% de los casos según las series (Elliot *et al.*, 2006). Entre los dos grupos es posible encontrar algunas diferencias, como una mayor prevalencia en varones, esplenomegalia y niveles más elevados de LDH en el grupo de LMMC-MP (Bennett *et al.*, 1994). Sin embargo, exceptuando el recuento leucocitario, los valores en sangre periférica son similares, al igual que el porcentaje de blastos en médula ósea y las tasas de supervivencia y de evolución a LMA que, aun siendo más elevadas en los pacientes con LMMC-MD, no alcanzan significación estadística. Del mismo modo, Germing *et al.* (1998) demostraron que, aunque algunos datos sugieren que se trata de dos entidades clínicamente distintas, su separación no proporciona ninguna información pronóstica relevante.

Por tanto, si ambos trastornos representan diferentes fases de una misma enfermedad, o si, por el contrario, se trata de dos entidades con diferente etiología y patogenia, está todavía por aclarar.

1.4.2 Clasificación de la OMS

La clasificación de tumores de tejidos hematopoyéticos y linfoides de la OMS fue un proyecto en colaboración entre la Asociación Europea de Hematopatología y la Sociedad Americana de Hematopatología. Ésta fue la primera clasificación con un consenso firme sobre enfermedades hematológicas. Este proyecto nació en una reunión celebrada en 1997 donde la OMS propuso una nueva clasificación de las enfermedades hematológicas en la que se incluían los SMD (Harris *et al.*, 1999). El objetivo de la revisión era incorporar la nueva información científica y clínica con el fin de perfeccionar los criterios diagnósticos de las neoplasias hematológicas descritas previamente e introducir nuevas entidades ya reconocidas. Su propósito era poner en relieve cambios importantes en la revisión de clasificación de la OMS de las neoplasias y establecer las razones de esos cambios.

Posteriormente, esta propuesta de clasificación fue publicada, liderada por ES Jaffe, en el libro oficial de la OMS en el año 2001 (Jaffe *et al.*, 2001), y más recientemente, revisada a finales de 2008 (Swerdlow *et al.*, 2008). Esta clasificación refleja un cambio de paradigma de los modelos anteriores en que, por primera vez, la información genética se incorporó en la clasificación junto con

características morfológicas, inmunofenotípicas y clínicas. No es de extrañar, por tanto, que ya la primera edición de esta clasificación fuera precedida de un comentario en que se hacía referencia a la necesidad futura de nuevas actualizaciones debido a la gran velocidad con la que se producen cambios en el conocimiento sobre la información genética y biológica.

1.4.2.1 Modificaciones de la OMS 2001 a la clasificación FAB

En la clasificación de la OMS 2001 se recomendó reclasificar la LMMC separada de los SMD como una categoría independiente. Este nuevo grupo denominado “Neoplasias mielodisplásicas /mieloproliferativas” estaba formado por la LMMC, la leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ), la leucemia mieloide crónica atípica (LMCa) y las neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas inclasificables.

Aunque algunos autores creían que la LMMC, la LMMJ y la LMCa eran meras variaciones de una misma enfermedad, existían suficientes diferencias tanto clínicas, como morfológicas y biológicas para justificar su reconocimiento como entidades nosológicas distintas. Por lo que respecta a la controversia sobre si estas entidades se debían clasificar como trastornos mieloproliferativos o mielodisplásicos (Michaux *et al.*, 1993), la propuesta del grupo FAB de establecer un punto de corte en un número absoluto de leucocitos de $13 \times 10^9/L$ (Bennett *et al.*, 1994), carecía de evidencias convincentes de que tal división fuese clínica o biológicamente relevante. La propuesta de la OMS 2001 de reconocer que en ocasiones se produce una superposición entre los SMD y SMPC ofrecía una visión menos restrictiva de estos trastornos, y permitía a quienes atienden a este tipo de pacientes considerarlos en el contexto de aquel componente que predominara en cada caso.

En cuanto a la LMMC, se distinguían dos subtipos, LMMC-1 y LMMC-2, de acuerdo a un punto de corte del porcentaje de blastos (incluyendo promonocitos) en el 10% y el 5% en médula ósea y en sangre periférica, respectivamente. Esta división se basó en el reconocimiento de que los estudios sobre LMMC identificaban el porcentaje de blastos como uno de los factores más importantes para la supervivencia. Se consideró que un mayor número de blastos podría ayudar a identificar aquellos pacientes con un peor pronóstico y

un mayor riesgo de evolución a leucemia aguda. Sin embargo, en el momento de proponer esta clasificación no existía ningún estudio formal que validara esta subdivisión de la enfermedad y no sería hasta varios años más tarde cuando el grupo de Germing *et al.* (2004) lo corroboraría en una cohorte de 288 pacientes con LMMC incluidos en el Registro de SMD de Düsseldorf. Años más tarde confirmaría la propuesta de la OMS con una serie de 349 pacientes. En esta serie, la separación en los dos grupos propuestos por la OMS, LMMC-1 y LMMC-2, demostró tener diferencias significativas en términos tanto de supervivencia global, con una mediana de 20 meses para el subtipo LMMC-1 y de 15 meses para LMMC-2 ($P < .005$); como de evolución a leucemia aguda, a los dos años el riesgo de evolución a LMA fue del 14% en los pacientes con LMMC-1 frente a un 24% en el grupo de pacientes con LMMC-2. Después de 5 años los valores aumentaban a un 18% para LMMC-1 y un 63% para LMMC-2 ($P = .001$). A su vez, no encontraron diferencias en los parámetros clínicos, morfológicos, hematológicos ni citogenéticos. De este modo, el porcentaje de blastos en la LMMC quedaba confirmado como una variable de peso para estratificar el pronóstico de este grupo de pacientes heterogéneos (Germing *et al.*, 2007).

1.4.2.2 Modificaciones de la OMS 2008 a la OMS 2001

En la clasificación de la OMS 2008 se incluyó una nueva modificación en la que los pacientes que presentaban reordenamientos de los genes *PDGFRA* o *PDGFRB* pasaban a formar parte de un nuevo grupo independiente denominado “Neoplasias mieloides/linfoides con eosinofilia asociados a reordenamientos en los genes *PDGFRA*, *PDGFRB* y *FGFR1*”. La base de la clasificación OMS es la estratificación de las neoplasias de acuerdo a su linaje: mieloide, linfoide e histiocitos/células dendríticas. Las alteraciones genéticas tales como los reordenamientos de *FGFR1*, *PDGFRA* y *PDGFRB* suponían un problema para su clasificación ya que están presentes tanto en neoplasias mieloides como linfoides asociadas con eosinofilia. Por esta razón, estos reordenamientos, principalmente de *PDGFRB*, fueron reconocidos inicialmente como un subgrupo de LMMC con eosinofilia dado que se habían descrito algunos casos aislados hasta el año 2001 (Golub *et al.*, 1994; Baranger *et al.*, 1994; Wlodarska *et al.*, 1995). Posteriormente, al aumentar el número de casos descritos, se comprobó

que estos genes estaban frecuentemente envueltos en translocaciones crípticas en casos de leucemia eosinofílica crónica y en un sustancial número de casos de síndromes hipereosinofílicos idiopáticos (Cools *et al.*, 2003). Del mismo modo, FGFR1 también se vio implicado en casos mieloproliferativos con marcada eosinofilia (Macdonald *et al.*, 2002). Por ello, dado que también se han encontrado alterados en otros tipos de neoplasias linfoides (Wlodarska *et al.*, 1997; Steer *et al.*, 2002) y, para evitar la confusión que produciría el incluirlos como una categoría dentro de la leucemia eosinofílica crónica o de los SMPC, se prefirió ignorar los casos de componente linfoide o de LMMC con estos reordenamientos y, apoyados por las implicaciones terapéuticas específicas de la sensibilidad a la terapia con Imatinib, estos casos se asignaron a este nuevo grupo caracterizados por reordenamientos específicos de estos genes.

Sin embargo, teniendo en cuenta la gran variedad de síndromes mieloproliferativos morfológicamente limítrofes con la LMMC, la situación continúa siendo compleja en la clasificación OMS 2008. El diagnóstico diferencial de la LMMC con la leucemia mieloide crónica (LMC) puede hacerse fácilmente basándose en estudios citogenéticos o moleculares, por la ausencia del llamado cromosoma Filadelfia [t(9;22)(q34;q11)] y/o del reordenamiento BCR/ABL. Más dificultoso es el diagnóstico diferencial con la leucemia mieloide crónica atípica (LMCa), una entidad poco definida y que se diferenciaría morfológicamente de la LMMC-MP por la presencia de un mayor porcentaje de precursores mieloides inmaduros en sangre periférica, una menor proporción de monocitos circulantes y rasgos displásicos más acusados (Bennett *et al.*, 1994). A pesar de ello, un buen número de LMCa cumplirían los criterios diagnósticos de LMMC. Algunos estudios han comparado las anomalías genéticas y biológicas en las variantes mielodisplásica y mieloproliferativa de la LMMC y la LMCa, pero no se han evidenciado diferencias significativas en las características o incidencia de las anomalías citogenéticas, mutaciones de oncogenes o patrones de crecimiento de colonias in vitro (Oscier D *et al.*, 1997, Michaux JL *et al.*, 1993).

En la Tabla 5 se detalla la nueva clasificación de la OMS 2008 para las neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas.

Tabla 5. Clasificación de las neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas de la OMS 2008 (Swerdlow *et al.*, 2008).

Neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas		
Subtipo	Sangre periférica	Médula ósea
Leucemia mielomonocítica crónica I	monocitos $>1 \times 10^9/L$ <5% blastos	<10% blastos BCR-ABL1 negativo <i>PDGFRA</i> y <i>PDGFRB</i> negativo
Leucemia mielomonocítica crónica II	monocitos $>1 \times 10^9/L$ 5-19% blastos	10-19% blastos BCR-ABL1 negativo <i>PDGFRA</i> y <i>PDGFRB</i> negativo
Leucemia mieloides crónica atípica BCR-ABL1 negativo	Leucocitos $\geq 13 \times 10^9/L$ <20% blastos	<20% blastos BCR-ABL1 negativo <i>PDGFRA</i> y <i>PDGFRB</i> negativo Precursores neutrófilos $\geq 10\%$ Basófilos $>2\%$ Monocitos $>10\%$.
Leucemia mielomonocítica juvenil	monocitos $>1 \times 10^9/L$ <20% blastos	<20% blastos BCR-ABL1 negativo
Neoplasias Mielodisplásicas/ mieloproliferativas inclasificables.	Leucocitos $\geq 13 \times 10^9/L$ o Plaquetas $\geq 450 \times 10^9/L$ <20% blastos	Morfología de SMD <20% blastos BCR-ABL1, del(5q), t(3;3)(q21;q26) o inv(3)(q21q26), <i>PDGFRA</i> , <i>PDGFRB</i> y <i>FGFR1</i> negativo

1.5 Caracterización

1.5.1 Manifestaciones clínicas

La mayoría de los pacientes con LMMC, al diagnóstico presentan leucocitosis con características propias de un cuadro mieloproliferativo crónico atípico. Sin embargo, algunos pacientes presentan una cifra de leucocitos

normal o ligeramente disminuida con una neutropenia y/o trombopenia variable, que los asemeja a los SMD, y que pueden dar lugar a infecciones y complicaciones hemorrágicas. Los signos de presentación clínica más comunes suele ser: astenia, pérdida de peso, fiebre y sudoración nocturna. Los hallazgos clínicos secundarios a la infiltración de órganos (hepatomegalia, esplenomegalia, hipertrofia gingival) que pueden presentarse al diagnóstico o durante el curso de la enfermedad son más frecuentes (más del 50%) en aquellos con una presentación mieloproliferativa (Vardiman *et al.*, 2002; Anastasi, 2007). Además, la frecuencia de derrames serosos, aunque baja, representa un hallazgo muy característico de la LMMC, puede causar morbilidad significativa y es de difícil tratamiento.

1.5.2 Morfología e histología

El estudio citomorfológico de la sangre periférica y la médula ósea, complementado con el estudio citogenético, constituye la herramienta básica para el diagnóstico de la LMMC ya que no existe ningún marcador biológico que defina inequívocamente esta entidad. Los criterios actuales de la OMS para el diagnóstico de la LMMC incluyen la consideración del número de citopenias, el tipo y grado de displasia, el porcentaje de blastos en sangre periférica y médula ósea y un incremento mantenido en el tiempo del valor absoluto de monocitos en sangre.

La evaluación de las características morfológicas de la LMMC se realiza en extensiones de sangre periférica y de médula ósea teñidas normalmente con Wright-Giemsa o May-Grünwald-Giemsa, que permiten diferenciar las distintas estructuras celulares, incluyendo los gránulos citoplasmáticos.

1.5.2.1 Sangre periférica

En la sangre se estudian las anomalías tanto numéricas como morfológicas de las series mieloide, eritroide y plaquetar. Se debe realizar un recuento diferencial de al menos 200 células, siempre que el número de leucocitos lo permita.

La presencia de una monocitosis mantenida es el rasgo característico de la LMMC. Por definición los monocitos son siempre mayores a $1 \times 10^9/L$, que casi

siempre se corresponden con cifras superiores al 10% del recuento leucocitario y, normalmente, los valores oscilan entre 2 y $5 \times 10^9/L$ sin exceder de $80 \times 10^9/L$. Los monocitos generalmente son maduros, con una morfología que se encuentra dentro de los límites normales, aunque pueden presentarse como monocitos anormales con alteraciones en la forma del núcleo, en el patrón de cromatina o en la granulación nuclear. Estas células, a diferencia de los monoblastos y promonocitos, no presentan nucleolo, tienen pliegues nucleares y el citoplasma es menos basófilo. Pueden encontrarse monoblastos y promonocitos, pero si la suma de ambos tipos celulares es superior al 20% el diagnóstico debe ser de leucemia aguda en lugar de LMMC. Por otro lado, los cambios en la sangre periférica son variables. Aproximadamente la mitad de los pacientes presentan leucocitosis con neutrofilia. En el resto, la cifra de leucocitos puede ser normal o ligeramente disminuida asociada a neutropenia. La presencia de mielema (promielocitos, mielocitos) suele ser menor al 10% de los leucocitos. La disgranulopoyesis (hipo- o hipersegmentación, hipo- o hipergranulación) está presente en la mayoría de los casos pero es más notable en aquellos con un recuento normal o disminuido de leucocitos, lo que dificulta el diagnóstico entre neutrófilos hipogranulares y monocitos displásicos. A veces también puede observarse una basofilia leve. El número de eosinófilos normalmente es normal o se encuentra ligeramente elevado, aunque en algunos casos puede ser muy elevado. La LMMC con eosinofilia debe cumplir los criterios de la LMMC y además presentar unos recuentos de eosinófilos absolutos en sangre periférica $\geq 1,5 \times 10^9/L$. Los pacientes que presentan estas características pueden tener complicaciones relacionadas con la desgranulación de los eosinófilos. Estos casos de LMMC hipereosinofílicos pueden ser más similares a los casos con neoplasias mieloides con eosinofilia asociada a una alteración citogenética/molecular relacionada con los genes *PDGFRA* o *PDGFRB*, por lo cual, en estos casos deben descartarse reordenamientos donde pueda estar implicado alguno de estos genes. También es común encontrarnos con una anemia leve, a menudo normocítica, pero que en alguna ocasión puede ser macrocítica. El número de plaquetas es variable, pero a menudo se presenta una trombocitopenia moderada, donde se puede observar plaquetas atípicamente alargadas.

1.5.2.2 Médula Ósea

Debido a que la clasificación de la OMS se basa en el porcentaje de blastos y otras células específicas para establecer el diagnóstico de determinadas entidades, se recomienda contar hasta 500 células nucleadas en áreas próximas de una misma extensión y lo menos contaminada de sangre periférica posible. Si se cuentan diferentes laminillas se reducirá aun más la posibilidad de error debida a una posible distribución irregular de las células. Las células a contar incluyen blastos, promonocitos, promielocitos, mielocitos, metamielocitos, cayados, neutrófilos segmentados, eosinófilos, basófilos, monocitos, linfocitos, células plasmáticas, precursores eritroides y mastocitos. Los megacariocitos, incluidas las formas displásicas, no deben incluirse en el recuento. Si no se pudiera realizar una extracción de médula ósea debido a una fibrosis se deben usar improntas de la biopsia para valorar la médula ósea pero los recuentos celulares pueden no ser representativos. Además los recuentos diferenciales obtenidos del aspirado de médula ósea deben compararse con los obtenidos en la biopsia.

Un problema frecuente es la dificultad para diferenciar monoblastos de promonocitos, debido a que los dos tipos celulares se suman a la hora de realizar un diagnóstico de LMA. La distinción en este caso es siempre crítica, ya que la designación de un caso de monocitosis aguda, de leucemia mielomonocítica aguda o de leucemia mielomonocítica crónica a menudo va a depender de esta distinción

En las extensiones de médula ósea se estudia la presencia de signos de displasia, el porcentaje de blastos y el porcentaje de monocitos. Debe haber un mínimo de un 10% de células alteradas dentro de una misma línea celular para considerar dicha línea como displásica. La cuantificación del número de blastos es básica para el diagnóstico, la clasificación y el pronóstico de la LMMC. El estudio puede completarse con la tinción de Perls que permite descartar la presencia de sideroblastos en anillo en el aspirado de médula ósea.

La médula ósea es hiper celular en el 75% de los casos, aunque también se dan casos de médulas óseas normocelulares o hipocelulares. El hallazgo más llamativo a menudo es la proliferación granulocítica pero también puede haber un incremento de los precursores eritroides. Siempre hay presente una

proliferación monocítica, aunque a veces puede ser difícil de apreciar en el frotis del aspirado de médula ósea. Cuando hay sospecha de LMMC, se recomienda realizar estudios citoquímicos e inmunohistoquímicos para identificar los monocitos y sus formas menos maduras.

La disgranulopoyesis, similar a la encontrada en sangre periférica, está presente en la médula ósea de la mayoría de las LMMC, mientras que la diseritropoyesis (cambios megaloblásticos, contornos nucleares anormales, sideroblastos en anillo, etc.) se observa en al menos la mitad de los pacientes (Michaux JL, *et al.*, 1993). Micromegacariocitos y/o megacariocitos con núcleos anormalmente lobulados suelen encontrarse en un 80% de los casos (Martiat P *et al.*, 1991), mientras que un aumento moderado de las fibras de reticulina puede verse en el 30% de los pacientes (Maschek H *et al.*, 1992).

1.5.2.3 Biopsia

La biopsia no es normalmente necesaria para el diagnóstico, excepto en los casos de LMMC hipocelular o asociada a fibrosis, aunque puede aportar valiosa información diagnóstica y pronóstica. De hecho, la alteración de la estructura medular normal con la localización anormal de precursores inmaduros (ALIP), ha resultado tener un valor pronóstico independiente en la LMMC (Maschek *et al.*, 1994).

En la médula ósea de casi un 30% de los pacientes con LMMC se puede observar un incremento leve o moderado en la cantidad de fibras de reticulina y en un 20% se han descrito nódulos compuestos por células maduras plasmocitoides dendríticas (monocitos plasmocitoides). Estas células tienen núcleos redondos, cromatina finamente dispersa, nucléolos poco llamativos y un borde de citoplasma eosinófilo. A menudo hay presencia de cuerpos apoptóticos dentro de "histiocitos en cielo estrellado". Es incierta la relación entre la proliferación de células dendríticas plasmocitoides y las células leucémicas. Sin embargo, un estudio reciente ha demostrado que son clonales, de naturaleza neoplásica, y que están estrechamente relacionadas con la neoplasia mieloide asociada (Swerdlow *et al.*, 2008).

1.5.2.4 Otros tejidos

La esplenomegalia es un hallazgo común en la LMMC y ésta se debe principalmente a la infiltración de la pulpa roja por células leucémicas. No es frecuente observar adenopatías, pero cuando se observan se considera una señal de transformación a fase aguda y los nodos linfáticos pueden tener una infiltración difusa por blastos mieloides. Algunas veces, hay nodos linfáticos y menos frecuentemente infiltración del bazo por células plasmocitoides dendríticas.

1.6 Citogenética

Las alteraciones citogenéticas han demostrado tener una enorme importancia pronóstica en las leucemias agudas y en los SMD. Sin embargo, los datos relativos a la citogenética en la LMMC son escasos y derivan principalmente de distintos estudios en los que no se incluyen todos los casos de LMMC debido a su distinta consideración como SMD o SMPC. Además, la incidencia de anomalías citogenéticas al diagnóstico varía ampliamente de unas series a otras y las alteraciones cromosómicas encontradas no son específicas de este subgrupo de pacientes.

Al igual que en la LMA y en los SMD, el subgrupo citogenético mayoritario dentro de la LMMC lo constituye el cariotipo normal (60- 80% de los casos). Se trata de un grupo heterogéneo de pacientes en los que la alteración responsable de la transformación neoplásica no es detectable por citogenética convencional (ya sea por la propia naturaleza de la alteración o por selección en el cultivo de células normales). En el caso del 20 – 40% restante que presentan anomalías citogenéticas, las alteraciones más frecuentemente encontradas incluyen la trisomía del cromosoma 8, las deleciones parciales y monosomías del cromosoma 7, así como alteraciones estructurales del brazo corto del cromosoma 12. Las alteraciones en 11q23 son infrecuentes en los casos de LMMC y sugieren más un diagnóstico de LMA. Otra de las alteraciones más frecuente en estos pacientes es la pérdida aislada del cromosoma Y, aunque su significado pronóstico es todavía desconocido, ya que, aun presentándose en un gran número de neoplasias, también parece ser un fenómeno relacionado con el

envejecimiento. Sin embargo, en neoplasias hematológicas se ha demostrado que una proporción significativa de metafases con pérdida del cromosoma Y (> 75%) predice de forma efectiva la clonalidad de un trastorno determinado (Zhang *et al.*, 2007). Clínicamente, la pérdida aislada del cromosoma Y confiere un pronóstico similar al de los casos con cariotipo normal en SMD (Greenberg *et al.*, 1987; Solé *et al.*, 2005; Haase *et al.*, 2007).

Tabla 6. Principales alteraciones citogenéticas descritas en LMMC.

Autor, año	N	Cariotipo alterado N (%)	Alteraciones más comunes, Número (%)		
			+ 8	-7/7q	Complejo [#]
Groupe François. 1991	100	29 (29%)	6 (21)	2 (7)	2 (7)
Catalano <i>et al.</i> , 1996	26	3 (11%)	1 (9)	0	2 (18)
Germing U. <i>et al.</i> , 1998	41	8 (20%)	ND	ND*	ND
Fenaux <i>et al.</i> , 1998	47	11 (23%)	2 (9)	2 (9)	2 (9)
Vogloba <i>et al.</i> , 2001	54	15 (28%)	4 (26)	0	3 (20)
Nösslinger <i>et al.</i> , 2001	67	15 (22%)	ND	ND	ND
González-Medina <i>et al.</i> , 2002	23	14 (61%)	5 (22)	2 (9)	1 (4)
Onida <i>et al.</i> , 2002	205	70 (34%)	13 (6)	16 (8)	13 (6)
Solé <i>et al.</i> , 2005	170	53 (31%)	10 (6)	4 (2)	7 (6,5)
Germing <i>et al.</i> , 2004	104	35 (33%)	ND	ND	<10%
Haase <i>et al.</i> , 2007	272	102 (38%)	18 (7)	23 (9)	12 (4)
TOTAL	1332	391 (27%)	59 (13)	49 (5)	42 (5)

Abreviaturas: ND, No Disponible. [#]Complejo esta definido por presentar tres o más alteraciones. *La mayor parte de las alteraciones corresponde al cromosoma 7.

Las alteraciones más frecuentes descritas hasta el momento son la trisomía del cromosoma 8, las alteraciones del cromosoma 7 y los cariotipos complejos. La trisomía del cromosoma 8 es la única amplificación recurrente que se observa en los SMD. Se suele presentar como anomalía única en alrededor

del 8% y se considera una alteración de riesgo citogenético intermedio. En LMMC está descrito en alrededor del 13% de los casos (6 – 26%) según la serie, Tabla 6) y algunos estudios han señalado el elevado riesgo de transformación aguda de esta anomalía cromosómica (Solé *et al.*, 2005). Los pacientes de SMD con trisomía 8 tienen una supervivencia 50% menor que los pacientes con cariotipo normal (22 vs. 53 meses respectivamente; Haase *et al.*, 2007). Sin embargo, el subgrupo de pacientes con SMD y trisomía 8 aislada responden bastante bien a terapias inmunosupresoras. Estos pacientes tienden a ser más jóvenes, tener anemia refractaria de corta duración y ser HLA DR15. Se ha demostrado que estos pacientes presentan una expansión de células T CD8+ V β -restricted. Después de la terapia inmunosupresora la representación de V β en las células T CD8+ pasan a tener una distribución policlonal más normal. Sin embargo, a pesar de la mejoría, la médula ósea muestra una persistencia o incluso una mayor expansión del clon de la trisomía 8. Esto sugiere que el sistema inmunológico ataca las células enfermas y, en consecuencia, perjudica la hematopoyesis normal. Estas células con la trisomía 8 expresan altos niveles de genes antiapoptóticos y son más resistentes a la radiación que las células normales. En lo que autoinmunidad se refiere es probable que el clon con trisomía 8 tenga una ventaja selectiva sobre los precursores hematopoyéticos normales (Bejar *et al.*, 2011).

Las alteraciones del cromosoma 7 afectan en torno al 2% y 9% de los pacientes con LMMC presentándose tanto de forma aislada como en contexto de cariotipo complejo y se consideran asociadas a un peor pronóstico de la enfermedad. Esta frecuencia puede aumentar hasta un 50% en pacientes con neoplasias previas y tratados con agentes alquilantes o radioterapia. El curso clínico es muy desfavorable (Greenberg *et al.*, 1997; Solé *et al.*, 2005; Haase *et al.*, 2007). Estudios mediante citogenética convencional, hibridación in situ (FISH) y de pérdida de heterocigosidad (Loss of heterocigosity, LOH) muestran una gran heterogeneidad en las deleciones del brazo largo del cromosoma 7 en las diversas neoplasias mieloides. Al menos hay tres regiones identificadas como comúnmente delecionadas en 7q, sin embargo, las lesiones moleculares que conllevan todavía no están bien caracterizadas. Recientemente se ha descubierto el gen EZH2, localizado en 7q36 que podría arrojar luz al porqué esta región se delecciona frecuentemente en SMD. No obstante, aunque el

cuadro general parece más complejo, existe consenso en definir una región comúnmente delecionada en 7q22 en la mayoría de los casos (Liang *et al.*, 1998).

Por último los cariotipos complejos definidos por la presencia de 3 o más alteraciones cromosómicas independientes afectan a aproximadamente el 20% de los casos con alteraciones de LMMC e incluyen frecuentemente anomalías no balanceadas, especialmente de los cromosomas 5 y 7. Clínicamente se caracterizan por un pronóstico desfavorable.

1.6.1 Groupe Français de Cytogénétique Hématologique

En 1991 el grupo francés publicó una de las primeras referencias concretas a la citogenética en la LMMC. Ya entonces se encontraron alteraciones en 29 de los 100 casos estudiados. Estas alteraciones se dividían principalmente en trisomías del cromosoma 8 (21%), monosomías del cromosoma 7 o deleciones 7q (7%) y cariotipos complejos (7%). En trabajos posteriores se confirmaron los datos de incidencia de estas alteraciones y en algunos estudios se identificaron otras como deleciones de 12p (Groupe Français de Cytogénétique Hématologique. 1991), trisomía del cromosoma 21 (Solé *et al.*, 2005), deleciones de 20q (Ngo *et al.*, 2008) o cariotipos hipodiploides (Catalano *et al.*, 1996) (Tabla 6). Tres estudios recientes basados en la clasificación de la OMS 2001 destacan por el número de casos analizados:

1.6.2 M. D. Anderson Cancer Centre (MDACC).

Esta serie incluye 213 pacientes de LMMC analizados en el momento del diagnóstico o referidos de otros centros en un periodo máximo de 3 meses (Onida *et al.*, 2002). Se estudió la citogenética en 204 de los pacientes presentando anomalías cromosómicas un 34%. Las alteraciones más frecuentemente encontradas fueron: monosomía 7 (7,8%), trisomía 8 (6,3%) y cariotipo complejo con más de tres anomalías (6,3%) (Onida *et al.*, 2002). En este estudio se encontró que las alteraciones citogenéticas estaban asociadas a una menor supervivencia global pero no se pudo establecer el significado pronóstico de ninguna de las alteraciones por separado de forma global, ni tampoco encontrar diferencias pronósticas entre las distintas alteraciones clonales cuando se analizaba sólo los casos con alteraciones.

1.6.3 Registro de SMD de Düsseldorf.

En esta serie se estudiaban 104 pacientes de LMMC incluidos en el Registro de SMD de Düsseldorf (Germing *et al.*, 2004). Se encontraron alteraciones cromosómicas en el 33% de los pacientes y aunque no se detalla el tipo de alteración, se hace referencia a que correspondían principalmente a las del grupo de alto riesgo del índice pronóstico internacional para SMD (IPSS, International Prognostic Scoring System. Greenberg *et al.*, 1997): monosomías 7 y cariotipos complejos. Las alteraciones citogenéticas también mostraron asociación con la supervivencia en el análisis univariante pero no en el multivariante.

1.6.4 Grupo Español de Citogenética Hematológica.

Esta serie incluía 968 pacientes de SMD primario, de los que 170 pacientes tenían una LMMC (un 42% con características mieloproliferativas, Solé *et al.*, 2005). En el análisis del subgrupo de pacientes con LMMC se observaron alteraciones en el 33% de los casos, siendo las más frecuentes la trisomía 8 (6%), el cariotipo complejo (6,5%) y la monosomía 7/delección 7q (2%). Llama la atención la baja incidencia de ésta última con respecto al resto de series publicadas. En este caso los análisis estadísticos para estimar el impacto pronóstico de la citogenética se realizaron excluyendo los casos con $>12 \times 10^9$ Leucocitos/L.

Estos y otros estudios (Tabla 6) dejan constancia de la heterogeneidad latente en esta enfermedad y, aunque establecen la frecuencia de alteraciones en alrededor del 27%, los porcentajes son variables en cuanto al tipo de alteraciones encontradas. Además, en ninguno de ellos se consigue establecer el valor pronóstico independiente de las distintas alteraciones citogenéticas. Ello ha supuesto que las anomalías citogenéticas no se hayan considerado como parámetros importantes en los sistemas pronósticos diseñados para este subgrupo de pacientes y sólo se han tenido en cuenta en los casos de LMMC-MD cuyo pronóstico era estimado de acuerdo al índice pronóstico internacional para SMD.

1.7 Biología Molecular

1.7.1 Implicaciones de los marcadores moleculares

Los recientes descubrimientos en los mecanismos moleculares de los SMD han propiciado el ensayo de nuevos agentes terapéuticos como inhibidores de la angiogénesis (talidomida, lenalidomida, SU5416 e inhibidores del factor de crecimiento del endotelio vascular [VEGF]), inhibidores de la vía de señalización de RAS (inhibidores de farnesil transferasa) y fármacos hipometilantes (5-azacitidina y decitabina). La reciente constatación de una excelente respuesta a los fármacos con capacidad inhibidora de los receptores tirosina quinasa III/IV en los casos con LMMC con determinados reordenamientos obliga a un análisis minucioso de este tipo de alteraciones. La identificación de nuevos marcadores moleculares sin duda contribuirá a una mejor caracterización de esta enfermedad que permita la identificación de nuevas dianas terapéuticas específicas, así como una mejor estimación del riesgo.

Recientes análisis orientados a la caracterización de los SMPC y SMD han revelado el importante papel que desempeñan las rutas de señalización mediadas por tirosina quinasa en la patogénesis de estas enfermedades. Los receptores con actividad tirosina quinasa median las acciones de múltiples factores que controlan el crecimiento y la diferenciación celular y sus cascadas de señalización concentran un número muy elevado de oncoproteínas. La activación incontrolada de estas vías puede producirse por sobreexpresión del propio factor de crecimiento (PDGFs, VEGFs, entre otros); por mutaciones, fusiones o deleciones en los propios receptores que conducen a su dimerización y/o activación constitutiva de su dominio citoplásmico catalítico (por ejemplo, mutaciones en el receptor de CSF-1 o las fusiones *Tel/PDGFB*); o por la sobreexpresión o amplificación del receptor. Hay evidencias de que la expresión celular de VEGF y de otros péptidos angiogénicos en los monocitos y en los precursores mieloides podría contribuir en la patogenia de las enfermedades hematopoyéticas. Los genes receptores con actividad tirosina quinasa de VEGF, como *VEGFR1* (o *KDR*) y *VEGFR2* (o *FLT1*) podrían estar relacionados con la migración celular de la leucemogénesis. Igualmente sucede con el gen *c-FMS*, que codifica el receptor del CSF macrófago (CSF-M o CSF-1) y en el que varios estudios han demostrado la existencia de mutaciones activadas

prevalentemente en leucemias caracterizadas por una diferenciación monocítica (LMMC, y el subtipo LMA-M4) (Padua *et al.*, 1998).

Las alteraciones moleculares que se han descrito hasta el momento en la LMMC son escasas. La principal excepción la constituían las mutaciones de los genes RAS, presentes en alrededor del 40% de los pacientes, ya sea al momento del diagnóstico o durante el curso de la enfermedad y la mutación V617F del gen *JAK2* presente en el 9% de los casos (Tyner *et al.*, 2008). El papel central de la vía Ras en muchas rutas de señalización celular hace que diversos tipos de alteraciones relacionadas con ésta vía estén implicadas en el desarrollo de tumores. Son frecuentes las mutaciones constitutivamente activadas de *H-RAS*, *K-RAS* y *N-RAS*, y las alteraciones en sus proteínas activadoras Ras-GEF (intercambiadores de GDP por GTP), en sus proteínas atenuadoras Ras-GAP (que incrementan su actividad GTP), o en proteínas efectoras de RAS (Raf y la cascada MEK/ERK 1/2, PI3K, PKC-ZETA, etc.) también implicadas en tumorigénesis. Recientes estudios han demostrado que las mutaciones de *RAS* funcionan como un evento secundario contribuyendo al desarrollo de la LMMC principalmente en la variante mieloproliferativa, y que están asociadas con un peor pronóstico de la enfermedad (Ricci *et al.*, 2010). Por ejemplo, la mutación adquirida V617F en el gen de *JAK2* produce una ganancia de función en el dominio JH2-like, una activación constitutiva del receptor y una desregulación de la actividad quinasa, contribuyendo a la expansión del clon mieloproliferativo. La identificación de esta mutación ha abierto el camino para el desarrollo de nuevas terapias dirigidas.

Existen alteraciones de gran importancia en LMA (incluyendo LMA secundarias a LMMC) en las que diversos trabajos han sugerido que, dado el porcentaje de evolución de LMMC a LMA, podrían estar presentes en la fase inicial de la enfermedad. Entre ellas se encuentran las proteínas de la familia III de los receptores tirosina quinasa que engloba a las proteínas codificadas por *PDGFRA*, *PDGFRB*, *c-FMS*, *c-KIT* y *FLT3*, todos ellos receptores de factores de crecimiento que participan en vías de transducción de señales implicadas en la proliferación y diferenciación celular. Se han descrito diversas alteraciones como fusiones, amplificaciones, deleciones y, en algunos casos, mutaciones puntuales que provocarían su actividad constitutiva e independiente de ligando de estos receptores.

Por último, recientemente, y gracias a las nuevas tecnologías de arrays, se han descrito nuevos genes con alta incidencia de mutaciones en la LMMC, entre los que destacan *c-CBL*, *ASXL1*, *TET2*, *IDH1* o *DNMT3A*.

1.7.1 PDGFRA y PDGFRB

En la clasificación OMS 2001, consideraban la alteración de los genes *PDGFRA* y *PDGFRB* como un marcador característico de la LMMC y/o de eosinofilia. Estas alteraciones definirían un pequeño subgrupo de LMMC caracterizado por la presencia de translocaciones recíprocas que afectarían a la banda 5q33, y que implican al gen del receptor β del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (*PDGFRB*), o por la delección críptica de la banda 4q12 que implicaría el reordenamiento del gen del receptor α del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (*PDGFRA*).

La más frecuente de estas translocaciones es la t(5;12)(q33;p13), cuya contrapartida molecular es el reordenamiento *TEL/PDGFRB*, aunque hasta la fecha *PDGFRB* se han descrito al menos otros 8 reordenamiento. *PDGFRB* es un receptor con actividad tirosina-quinasa, de manera que la translocación une el extremo 3' del gen *PDGFRB*, correspondiente al dominio con actividad tirosina quinasa, y el extremo 5' del segundo gen implicado, en el que se localiza un dominio de oligomerización. Esta fusión provoca la activación constitucional del dominio tirosina quinasa del gen *PDGFRB* y le confiere la capacidad de transformación celular (Carroll *et al.*, 1996). Recientemente se ha demostrado en ratones transgénicos la capacidad transformadora del transcrito de fusión *TEL/PDGFRB* y la producción de una enfermedad similar a la LMMC humana. Uno de los modelos posibles para explicar el mecanismo de transformación celular del transcrito *TEL/PDGFRB* sería a través de la alteración de la regulación en la vía de señalización RAS. De hecho, la frecuencia de mutaciones *RAS* en la LMMC es del 66%, más elevada que en otros SMD (Padua *et al.*, 1998). Asimismo, estudios moleculares en la leucemia mielomonocítica juvenil, enfermedad con gran similitud a la LMMC, han mostrado que estos pacientes presentan mutaciones en el gen *NF1* (Miyachi *et al.*, 1994), que codifica una proteína con actividad GPTasa que inhibe RAS (Shannon *et al.*, 1994). Por otra parte, parece que la expresión de *MYC* es requerida para que *TEL/PDGFRB* adquiera su potencial de transformación celular (Bourgeade *et al.*, 2005). Sin

embargo, la respuesta funcional final a la expresión de *TEL/PDGFRB*, proliferativa o proapoptótica, es mucho más compleja y está modulada por la expresión de diferentes citosinas (Wheadon *et al.*, 2003).

Actualmente, y tras la nueva clasificación de la OMS 2008, el grupo de pacientes que presentan estos reordenamientos han pasado a formar parte de un nuevo subgrupo, ya que están presentes tanto en neoplasias mieloides como linfoides asociadas con eosinofilia. Desde el punto de vista terapéutico, se caracterizan por la respuesta al tratamiento con fármacos con capacidad inhibitoria de los receptores tirosina-quinasa III/IV, tanto en ratones (Cain *et al.*, 2004) como en humanos (Magnusson *et al.*, 2002, Apperley *et al.*, 2002, Gunby *et al.*, 2003). Por ello, en la nueva clasificación es imprescindible descartar la presencia de ambos reordenamientos en los casos de LMMC.

1.7.2 FLT3

El receptor tirosina quinasa de clase III FMS-like está codificado por el gen *FLT3* localizado en 13q12 y se expresa fundamentalmente en las células hematopoyéticas progenitoras, mediando en la diferenciación y proliferación de las mismas (Lyman *et al.*, 1998; McKenna *et al.*, 2000). Está compuesto por un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio quinasa citoplasmático dividido en dos partes con un dominio de unión. La interacción de la proteína *FLT3* con su ligando da como resultado la activación mediante fosforilación de las vías de señalización celular que intervienen en la proliferación y apoptosis, que incluyen las vías de STAT5a, RAS/MAP-K y Pi3-K, y se ha comprobado que es capaz de aumentar la capacidad proliferativa de las células de LMA in vitro (Thiede *et al.*, 2002; Frohling *et al.*, 2002). Se han descrito mutaciones asociadas a LMA y SMD que dan como resultado una activación constitutiva e intensa del receptor de las vías STAT5, Ras o Quinasa MAP. Entre las alteraciones más importantes destacan por su frecuencia e implicación pronóstica las duplicaciones internas en tándem de *FLT3* (*FLT3-ITD*). *FLT3-ITD* se observa en la LMA con una prevalencia de entre el 20 y 27% (Thiede *et al.*, 2002; Frohling *et al.*, 2002; Kottaridis *et al.*, 2001). En la LMMC, donde aproximadamente un 20% de los pacientes evolucionan a leucemia aguda, sería de gran interés conocer si las mutaciones de *FLT3* pueden estar relacionadas con esta evolución.

A pesar de sus conocidas propiedades de transformación, los efectos leucemogénicos de las mutaciones de *FLT3-ITD* en las células progenitoras hematopoyéticas y en su diferenciación no se conocen bien. En un trabajo realizado por Lee *et al.*, (2007) presentaron un modelo murino al que se le introducía un locus de *FLT3-ITD* y éste desarrollaba una enfermedad mieloproliferativa parecida a la LMMC humana. Este modelo proporcionó información detallada sobre las vías de señalización constitutiva de una tirosina quinasa oncogénica en las células hematopoyéticas quiescentes y sobre su función celular. Ello les llevo a estudiar la presencia de mutaciones de *FLT3* activadores en una serie de pacientes con SMPC en la que encontraron una frecuencia muy baja de mutaciones. Cabe destacar que todos los casos en que se encontró la mutación tenían LMMC. Concluyeron que era prematuro decir que la LMMC con *FLT3-ITD* era un subtipo único de LMMC aunque sus datos sugerían un posible efecto negativo en el pronóstico y que debían estudiarse en series más amplias (Lee *et al.*, 2007).

Por último, la posibilidad reciente de disponer de fármacos inhibidores de *FLT3*, algunos de los cuales ya se ha demostrado su eficacia (Sanz *et al.*, 2009), abre la puerta a un potencial terapéutico en los pacientes con LMMC que presenten alteraciones en éste gen.

1.7.3 NPM1

La nucleofosmina (*NPM*) es una fosfoproteína de localización predominantemente nucleolar que previene la agregación de las proteínas en el nucleolo y regula el ensamblaje y transporte de las partículas preribosomales a través de la membrana nuclear (Dumbar *et al.*, 1989; Tarapore *et al.*, 2002; Sipos *et al.*, 1991). También está implicada en la regulación de la estabilidad y la activación de la transcripción de p53 a través de la proteína ARF (Colombo *et al.*, 2002). Está codificada por el gen *NPM1* localizado en 5q35. Se ha descrito la existencia de mutaciones en el gen *NPM1* que consisten fundamentalmente en la inserción de 4 pares de bases en el exón 12, dando lugar a una proteína anormalmente alargada que queda retenida en el citoplasma (Falini *et al.*, 2005).

La incidencia de mutaciones de *NPM1* oscila entre 25% y 53% de las LMA, siendo significativamente más frecuente en los pacientes con cariotipo normal (entre 46% y 67%). Existe además una clara asociación entre las

mutaciones de *FLT3* y las de *NPM1* y por esta razón, su estudio se suele hacer de forma conjunta.

Desde el punto de vista de la evolución de los pacientes, la mayoría de trabajos otorgan un papel pronóstico favorable a las mutaciones de *NPM1*. No obstante, este pronóstico favorable se observa fundamentalmente en los pacientes con mutaciones de *NPM1* pero sin *FLT3-ITD*. (Dohner *et al.*, 2005; Thiede *et al.*, 2006).

1.7.4 c-FMS

La diferenciación macrofágica es controlada por el factor de estimulación de colonias macrofágicas CSF-1 (colony stimulating factor-1), mediante el receptor de membrana (CSF-1Rs) codificado por el protooncogen *c-FMS*. Este receptor media muchos de los procesos producidos por las citoquinas. La proteína codificada por este gen es una glicoproteína de pared celular dependiente de ligando y con actividad tirosina quinasa que es expresada en las líneas monocíticas/macrofágicas.

La mutación de este receptor ha sido asociada con la predisposición a enfermedades en la serie mieloide. De hecho, *c-FMS* está localizada en la banda 5q33.3, una región frecuentemente alterada en SMD. Por otro lado, estudios previos desarrollados por Ridge *et al.*, (1990) y Tobal *et al.*, (1990) empleando sondas de hibridaciones alelo específicas (ASO), identificaron la activación de mutaciones puntuales localizadas en los codones 301 y 969 en el 18% de las LMA y en el 15% de los síndromes mielodisplásicos, sugiriendo el importante papel que juega *c-FMS* en la leucemogénesis (Ridge *et al.*, 1990; Tobal *et al.*, 1990).

Las alteraciones en el codón 301 [TTG (Leu)] inducen una transformación neoplásica independiente del ligando y un receptor con actividad tirosina quinasa constitucional, mientras que el residuo de tirosina del codón 969 [TAT(Tyr)] tiene un efecto potenciador dependiente de la estimulación de CSF-1. Estas mutaciones activadas fueron más prevalentes en leucemias caracterizadas por una diferenciación monocítica (leucemia mielomonocítica crónica, LMMC, y el subtipo LMA-M4). En este caso, Padua *et al.*, estudiaron las mutaciones de activación de oncogenes en mielodisplasia, incluido *RAS*, *c-FMS* y mutaciones

de p53 identificando un 12% de pacientes con mutaciones en *c-FMS*, principalmente en el codón 969 (Padua *et al.*, 1998).

Por otra parte el estado de la mutación para *RAS* y *c-FMS* se ha relacionado con el subgrupo de LMMC-MD, sobre todo en los que tienen una enfermedad de alto riesgo (Padua *et al.*, 1998). En cambio, numerosos estudios posteriores que estudiaron estos genes con una amplia variedad de técnicas tales como análisis de secuenciación directa, análisis específico de restricción de alelos (ASRA), hibridación de ASO o electroforesis en gel de conformación no pudieron detectar estas mutaciones puntuales ni en SMD ni en LMA (Tyner *et al.*, 2008; Meshinchi *et al.*, 2003), por lo que existe una gran controversia respecto al papel que estas mutaciones podrían desempeñar en el proceso de la leucemogénesis.

1.7.5 JAK2

Diversos estudios han detectado la presencia de una mutación somática activadora del dominio tirosina-quinasa del gen *JAK2* (mutación V617F) en más del 50% de pacientes diagnosticados de distintos subtipos de SMPC (Kralovics *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2005). Concretamente en LMMC la frecuencia baja hasta aproximadamente el 9% (Tyner *et al.*, 2009). La proteína quinasa Jano (*JAK*) tiene dos dominios similares que se encuentran enfrentados en direcciones opuestas. Contiene cuatro miembros: *JAK1*, *JAK2*, *JAK3* y *Tyk2*. Las proteínas quinasas son enzimas que catalizan la fosforilación de otras proteínas. Éstas, a su vez, están reguladas por fosfatasas que hacen lo contrario, regular la actividad de las proteínas quinasas a través de la desfosforilación. Un tipo de proteína quinasas son las tirosina-quinasas, que catalizan la transferencia del grupo γ -fosfato del ATP a los grupos hidroxilo de los residuos de tirosina en las moléculas de transducción de señales. Las proteínas *JAK* fosforilan transductores de señales de co-activadores de la transcripción (*STAT*) de forma simultánea con otras fosforilaciones necesarias para activación (Kralovics *et al.*, 2005). *JAK2* es la quinasa activada predominante en respuesta a factores de crecimiento y citosinas como IL-3, GM-CSF o eritropoyetina. Se encuentra asociada al receptor de prolactina y es necesaria en la respuesta al interferón gamma. La mutación adquirida en el gen de *JAK2* en el codón 617 conlleva un cambio de aminoácido de valina a fenilalanina (V617F), produciendo una

ganancia de función en el dominio JH2-like, una activación constitutiva del receptor y una desregulación de la actividad quinasa. La presencia de esta mutación contribuye a la expansión del clon mieloproliferativo y se correlaciona con la aparición de complicaciones clínicas. La identificación de esta mutación ha abierto el camino para el desarrollo de nuevas terapias dirigidas, así como para una nueva clasificación dentro de los SMPC.

1.7.6 VEGFR1 (o KDR) y VEGFR2 (o FLT1)

La angiogénesis es reconocida como un elemento característico de muchos procesos fisiopatológicos humanos. En tumores sólidos, la angiogénesis anormal ha sido estudiada extensamente. Sin embargo, en los trastornos hematológicos primarios, incluyendo mieloma, mielodisplasias y leucemias agudas y crónicas son ahora objeto frecuente de estudio. Estos estudios han consistido en detectar un incremento o una angiogénesis anormal en la médula ósea de pacientes con trastornos hematológicos sugiriendo que la vascularización puede contribuir a la patogénesis de la enfermedad, debiéndose, probablemente, a que el microambiente de la médula ósea posee sustancias que favorecen la supervivencia y la proliferación de las células leucémicas.

Los factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF, vascular endothelial growth factor) intervienen en la regulación del desarrollo vascular embrionario, la remodelación de la matriz extracelular, la generación de citoquinas inflamatorias, la intensificación de la permeabilidad vascular y la supervivencia de las células endoteliales, entre otras funciones. Esta última actividad es de gran interés porque una de las características de las células leucémicas es su resistencia a la apoptosis. Ejercen sus efectos biológicos sobre las células hematopoyéticas al interactuar con dos de sus cuatro receptores tirosina quinasa, el VEGF-R1 y el VEGF-R2 (De Vries et al, 1992; Terman et al, 1992). La expresión celular de estos receptores de VEGF no sólo se da en las células endoteliales que están proliferando, sino también en macrófagos, megacariocitos y en células madre hematopoyéticas primitivas (Barleon *et al.*, 1996; Bellamy *et al.*, 1999). Asimismo, Se ha observado que se producía una sobreexpresión y secreción de VEGF en el 72% de los pacientes con LMA y la correspondiente expresión del RNA mensajero del gen *FLT1* o *KDR* en el 52% y en el 19% de los pacientes, respectivamente (Fiedler *et al.*, 1997). Además se

comprobó que la densidad microvascular de la médula ósea estaba incrementada en pacientes con SMD y LMA y que estaba directamente correlacionado con el porcentaje de mieloblastos (Pruneri *et al.*, 1999). Posteriormente se demostró que VEGF actúa como un factor trófico que da soporte a la renovación de los progenitores leucémicos por una inducción autocrina o paracrina de factores de crecimiento mieloide secretados por elementos del estroma (Bellamy *et al.*, 2001).

Una activación constitutiva de VEGFR-1 y 2, producida por mutaciones puntuales en la secuencia de los genes que los codifican, podría alterar la proliferación, supervivencia o la diferenciación celular de las células hematopoyéticas dando lugar a una angiogénesis anormal. En este sentido, se han identificado mutaciones que resultan en una activación constitutiva de la actividad quinasa en un amplio espectro de tumores humanos, siendo más comunes en enfermedades hematológicas (Krause *et al.*, 2005). En LMA y en LMMC, la mayoría de las mutaciones activadoras de estos receptores son por ganancia de función afectando al dominio de activación (AL, activation loop) del receptor o por pérdida de función del dominio autoinhibidor (JM, dominio yuxtamembrana) del receptor tirosina-quinasa (Tyner *et al.*, 2008).

Existen cuatro receptores de VEGF pero sólo los dos primeros (VEGFR-1 y VEGFR-2) se encuentran involucrados en la leucemogénesis. El receptor VEGFR-1, codificado por el gen *FLT1* y localizado en la banda cromosómica 13q12, contiene 30 exones, de los que el exón 16 codifica el dominio yuxtamembrana y el exón 17 el dominio tirosina-quinasa. El VEGFR-1 fue el primer receptor identificado de alta afinidad para el VEGF pero su función precisa es aún controvertida (Maru *et al.*, 1998). El receptor VEGFR-2, codificado por el gen *KDR* y localizado en la banda cromosómica 4q11-12, está formado por 30 exones, de los que el exón 16 codifica el dominio yuxtamembrana y el exón 17 el dominio tirosina-quinasa. Solo la forma glicosilada final del VEGFR-2 es capaz de autofosforilarse en respuesta al VEGF y participa de manera crucial en la angiogénesis en el desarrollo y la hematopoyesis. (Ferrara *et al.*, 2003).

Se han construido vectores con mutaciones que activan constitutivamente los receptores de VEGF *in vitro*, pero tales mutaciones no han sido todavía identificadas en ninguna de las enfermedades mieloides.

1.7.7 *c-CBL*

Entre las anomalías cromosómicas involucradas en la patogénesis molecular de los trastornos hematológicos, la disomía uniparental (UPD) está empezando a ser reconocida como una de las alteraciones más frecuentes. Recientemente, con las técnicas de 'arrays' de polimorfismos (SNPs), se ha podido detectar en qué regiones del genoma hay una mayor incidencia de UPD en las enfermedades hematológicas. En varios estudios realizados en pacientes con SMD o con SMPC se ha observado que una de las regiones con mayor incidencia de UPD es 11q, principalmente en LMMC (48%) y SMD/SMPC inclasificables (38%). A raíz de estos trabajos se ha profundizado en el análisis de esta región y se han descrito distintas mutaciones que afectan al gen *c-CBL* en este mismo subgrupo de pacientes y que podría ser un proceso anterior a la UPD (Makishima *et al.*, 2009).

El gen *c-CBL*, forma parte de la familia de CBL. Está compuesto por 16 exones que codifican 906 aminoácidos en un único transcrito. Se encuentra localizado en 11q23.3 y codifica una ubiquitin ligasa E3, que juega un papel regulador en la señalización de las tirosinas quinasas. Por una parte, favorece su activación, al provocar la unión del activador al dominio de unión en N-terminal y, por otra, sirve de adaptador al reclutar componentes reguladores de las señales de transducción como SHP2 y P13K.

Se han encontrado hasta 12 mutaciones diferentes localizadas en el exón 8 del gen, 11 mutaciones en el exón 9 y 4 en la región intrónica (Grand *et al.*, 2009). Muchas de las variaciones que se han descrito son sustituciones 'missense' (78%) en el dominio RING o en el dominio de unión, que impiden la actividad ubiquitin ligasa de CBL, por lo que las células adquieren una mayor capacidad proliferativa, ya que conlleva a una sobreexpresión de *FLT3* (Reindl *et al.*, 2009). Otras mutaciones producen alteraciones en el 'splicing' (19%), y la formación de nuevos codones de parada (3%) (Grand *et al.*, 2009). Estas mutaciones podrían explicar la desregulación de las rutas de proliferación que se observan en los pacientes de SMD/SMPC. Diferentes análisis demuestran que las mutaciones en *c-CBL* son adquiridas y que raramente se ven relacionadas con otras mutaciones conocidas. En cuanto a la repercusión clínica que pudieran tener, parece que los pacientes que tienen estas mutaciones tienden a tener una

supervivencia global y una supervivencia libre de progresión más corta que en los pacientes sin dicha mutación.

1.7.8 IDH

La enzima Isocitrato deshidrogenasa (IDH) es importante en el metabolismo de los carbohidratos que participa en el ciclo de Krebs catalizando la descarboxilación oxidativa del isocitrato en 2-oxoglutarato. Esta reacción genera la reducción de los agentes NADPH y NADH, necesarios para diferentes procesos biológicos.

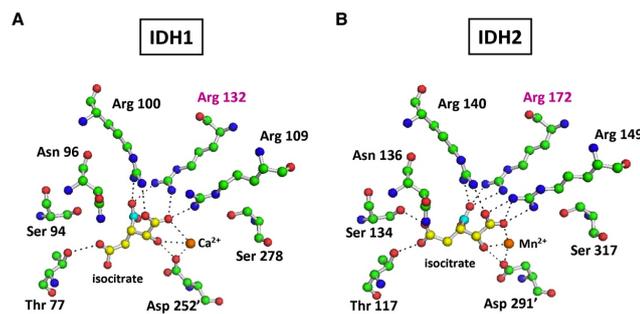
En los organismos eucariontes existen varias isoformas de IDH localizadas en diferentes compartimentos celulares y que emplean diferentes cofactores. La enzima *IDH1* está localizada en el citoplasma o en el peroxisoma, catalizando las reacciones de descarboxilación oxidativa del isocitrato y del oxalosuccinato mediante el uso exclusivo de NADP⁺ como aceptor de electrones. El gen que codifica para esta enzima se encuentra situado en el cromosoma 2q33.3, dando lugar a una proteína homodimérica de 414 aminoácidos.

Su variante mitocondrial es la enzima *IDH2*, que cataliza las reacciones de descarboxilación oxidativa del isocitrato y del oxalosuccinato, utilizando también exclusivamente NADP⁺ como aceptor de electrones. Esta proteína de 452 aminoácidos está codificada por el gen *IDH2* localizado en cromosoma 15q26.1. Participa en el metabolismo intermedio y en la producción de energía estando estrechamente asociada al complejo piruvato deshidrogenasa.

Las mutaciones en *IDH1* fueron identificadas por primera vez en los gliomas malignos y más recientemente en las LMA (Yan *et al.*, 2009; Mardis *et al.*, 2009). Estudios posteriores revelaron que algunos pacientes presentaban mutaciones en *IDH1* pero también en *IDH2* (Mardis *et al.*, 2009) con diferentes frecuencias dependiendo de la enfermedad. Las mutaciones en estos genes son un evento poco frecuente en pacientes con síndromes mieloproliferativos (Tefferi *et al.*, 2010) y en síndromes mielodisplásicos (Kosmider *et al.*, 2010). En cualquier caso, las mutaciones que se han descrito hasta el momento en *IDH1* y *IDH2* se encuentran localizadas en el exón 4 que es el encargado de codificar el sitio de unión del isocitrato. En el gen *IDH1* la arginina en posición 132 es la que

con mayor frecuencia se encuentra afectada; en el gen *IDH2* las mutaciones se localizan en el codón 140 o en el 172 (Figura 1).

Figura 1. Localización de las principales mutaciones de *IDH1* e *IDH2* en la proteína.



Las mutaciones de *IDH1* (arg132) e *IDH2* (arg172) se encuentran principalmente en los sitios de unión al isocitrato.

Los estudios publicados hasta el momento muestran que las distintas mutaciones en *IDH* se asocian con una citogenética de riesgo intermedio, mas concretamente con LMA de cariotipo normal y con mutaciones en *NPM1*. Estas mutaciones confieren un pronóstico adverso principalmente al subgrupo de pacientes de LMA con cariotipo normal, por ello se trata de un nuevo marcador que permite refinar la evaluación del riesgo de estos pacientes sin alteraciones moleculares identificadas (Paschka *et al.*, 2010). Recientemente, también se han descrito estas mutaciones en SMD y SMPC, asociándose con un mayor riesgo de evolución a LMA (Thol *et al.*, 2010; Ward *et al.*, 2010; Kosmider *et al.*, 2010) Concretamente, en LMMC se ha demostrado la presencia de estas mismas mutaciones, todas afectando a los residuos R132 en *IDH1* y R140 y R172 en *IDH2* (Kosmider *et al.*, 2010; Figueroa *et al.*, 2010; Yoshida *et al.*, 2011). Sin embargo, la relevancia pronóstico de las mismas sigue siendo desconocido.

1.8 Factores pronósticos

Hasta el momento han sido desarrollados varios sistemas pronósticos para predecir el curso de los SMD. Entre ellos, el índice pronóstico internacional (IPSS) es el más usado. Este sistema incluye casos de LMMC, pero limita su análisis y validación a los casos con una cifra leucocitaria inferior a $12 \times 10^9/L$ (LMMC-MD) y, por tanto, no es aplicable en aproximadamente la mitad de los casos de esta enfermedad. Sin embargo, no existe una justificación clínica o biológica relevante para la exclusión de estos casos y se basa en la hipótesis de que estos pacientes representan más un trastorno mieloproliferativo que un verdadero SMD (Greenberg *et al.*, 1997).

Tabla 7. Principales índices pronósticos descritos para LMMC.

	Blast	PMI	HB	PLQ	PMN	WBC	LDH	Linf
Unidades	%	%	g/dL	$\times 10^9/L$	$\times 10^9/L$	$\times 10^9/L$	U/L	$\times 10^9/L$
Bournemouth modificado	> 5	-	< 10	< 100	< 2,5 >1,6	-	-	-
MDAPS	> 10	> 0	< 12	-	-	-	-	> 2,5
Grupo Español	> 5	-	< 12	-	-	< 10	>1,5x	
Düsseldorf	> 5	-	< 9	< 100	-	-	Elevada	

Abreviaturas: Blast, Blastos en Médula Ósea; PMI, Precursores Mieloides Inmaduros; HB, hemoglobina; PLQ, Plaquetas; PMN, Polimorfonucleares; WBC, Leucocitos; LDH, Lactato Deshidrogenasa; Linf, Linfocitos.

Existen cuatro sistemas pronósticos específicamente desarrollados y validados en LMMC. Estos sistemas permiten definir de dos a cuatro grupos pronósticos, basados en la presencia de diferentes factores pronósticos (Tabla 7). Si bien alguno de estos parámetros está representado en más de uno de estos sistemas pronósticos, sólo el porcentaje blastos es común en todos ellos aunque no así el punto de corte de los mismos.

1.8.1 Índice de Bournemouth modificado

El Sistema de Bournemouth modificado fue el primero desarrollado específicamente para LMMC (Molica *et al.*, 1990). Este sistema incorporaba la variable de bajo o alto número de neutrófilos y los valores de hemoglobina,

recuento de plaquetas y porcentaje de blastos en médula ósea. Este sistema pronóstico era capaz de segregar en dos grupos de riesgo, alto y bajo, bien definidos con unas medianas de supervivencia de 15 y 27 meses, respectivamente. Los puntos de corte de las variables utilizadas se muestran en la tabla 7.

1.8.2 Índice español

Años más tarde, González-Medina *et al.*, (2002) presentaron un estudio de una serie de 70 pacientes con LMMC en un solo centro. Construyeron un índice pronóstico que permitía diferenciar dos grupos de riesgo: uno con una mediana de supervivencia de 44 meses; y otro con una mediana de 7 meses.

1.8.3 Índice de Düsseldorf

El grupo de Düsseldorf propuso un nuevo índice pronóstico para SMD que permitía estratificar los pacientes en riesgo alto, intermedio y bajo riesgo (Aul *et al.*, 1992). Este sistema pronóstico, que incluía por primera vez como factor de riesgo los niveles elevados de LDH, resultó ser particularmente bueno para LMMC (Germing *et al.*, 2004). Este permitía identificar un pequeño grupo de pacientes (6%) con muy buen pronóstico que presentaba una mediana de supervivencia de 93 meses), un grupo más amplio de pacientes de peor pronóstico (con una mediana de supervivencia de 12 meses) y un grupo de pronóstico intermedio (26 meses).

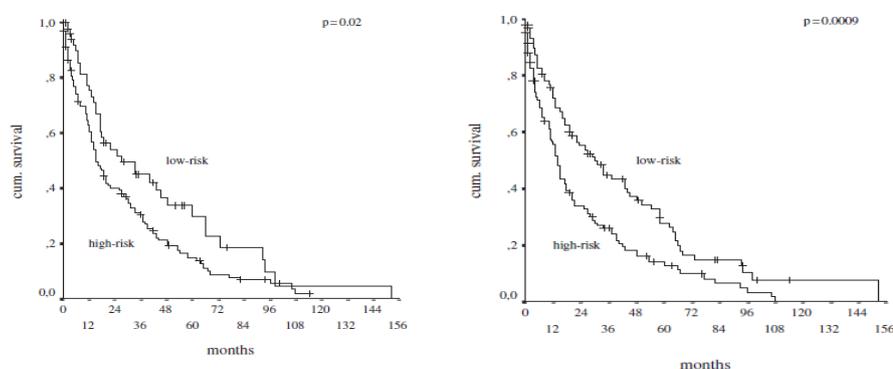
1.8.4 Índice del M.D. Anderson Cancer Center

Más recientemente, el M.D. Anderson Cancer Center (MDACC) propuso un nuevo sistema pronóstico desarrollado en una amplia serie de pacientes con LMMC (Onida *et al.*, 2002). Este índice permitía distinguir cuatro grupos de riesgo: alto, intermedio-1, intermedio-2 y bajo, con unas medias de supervivencia global de 24, 15, 8 y 5 meses, respectivamente. Este sistema es el único que incluye los linfocitos como factor pronóstico independiente, que parece ser específico de la LMMC ya que no se observa en otros tipos de SMD. La significación pronóstica y específica ha sido confirmada en dos series independientes (Germing *et al.*, 2002; Breccia *et al.*, 2004).

1.8.5 Comparación de los principales índices pronósticos

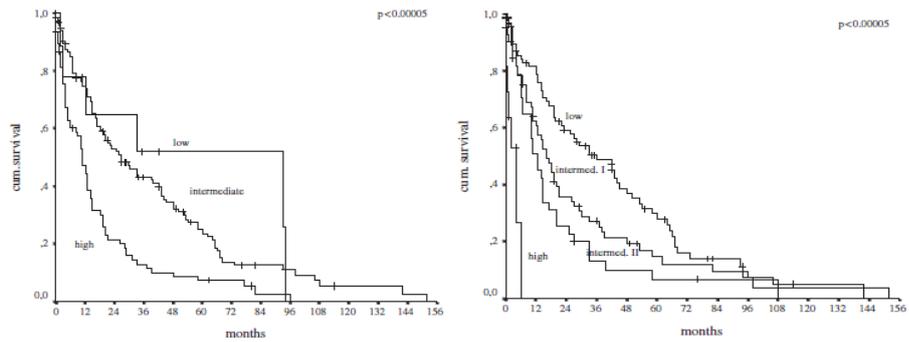
Todos los índices pronósticos contruidos específicamente para la LMMC son capaces de separar diferentes grupos de riesgo utilizando variables distintas. Ninguno de ellos incluye la citogenética, pero utilizan parámetros comúnmente disponibles en el momento del diagnóstico. En la figura 2 se muestran los resultados al aplicar los 4 sistemas pronósticos anteriormente comentados en 212 pacientes de LMMC del Registro de SMD de Düsseldorf (Germing *et al.*, 2004). En todos los casos hay diferencias significativas en los grupos de riesgo, sin embargo la estimación de supervivencia para un mismo paciente varía según el sistema pronóstico que utilizemos. No obstante, hacen falta nuevos trabajos de validación en series más amplias que permitan identificar el sistema pronóstico más eficaz y adecuado.

Figura 2. Metanálisis realizado por Germing *et al.*, (2004) donde se aplican los cuatro índices pronósticos más relevantes al mismo grupo de pacientes.



A. Supervivencia global de acuerdo al índice pronóstico de Bournemouth modificado: bajo y alto riesgo (n =212). **B.** Supervivencia global de acuerdo al índice pronóstico Español: bajo y alto riesgo (n =212).

Figura 2 (continuación). Metanálisis realizado por Germing *et al.*, (2004) donde se aplican los cuatro índices pronósticos más relevantes al mismo grupo de pacientes.



C. Supervivencia global de acuerdo al índice pronóstico de Düsseldorf: bajo, intermedio y alto riesgo (n =212). D. Supervivencia global de acuerdo al índice pronóstico de MDAPS: bajo, intermedio-I, intermedio-II y alto riesgo. (n =212).

2. HIPÓTESIS

La caracterización y clasificación de los pacientes con LMMC ha ido refinándose hasta constituir un grupo bien reconocible. Sin embargo, sigue siendo un grupo con una gran variabilidad clínica y biológica. Aumentar el conocimiento de las alteraciones citogenéticas y moleculares en paralelo con el comportamiento clínico podría contribuir no solo a un mejor conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en esta enfermedad, sino también a un más apropiado manejo terapéutico.

3. OBJETIVOS

Partiendo de la hipótesis de que es preciso aumentar el conocimiento de las alteraciones citogenéticas y moleculares de la LMMC, en paralelo con su comportamiento clínico, para contribuir a un mejor conocimiento de los mecanismos biológicos implicados y para realizar tratamiento más ajustado al riesgo, los objetivos de este trabajo de tesis doctoral son:

1. Analizar las características clínico-biológicas la evolución clínica de una amplia serie de pacientes con LMMC, haciéndose particular énfasis en el estudio de:
 - a. Las alteraciones citogenéticas al diagnóstico
 - b. La presencia de mutaciones, mediante amplificación y secuenciación directa, de las regiones codificantes de los dominios de activación de los siguientes genes: FLT3, NPM1, JAK2, KDR, FLT1, c-FMS, c-CBL, IDH1 y IDH2.
 - c. La incidencia de los reordenamientos de PDGFR α y PDGFR β mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH).
2. Analizar el valor pronóstico de las alteraciones citogenéticas y moleculares en el contexto de otras variables clínico-biológicas en pacientes con LMMC.
3. Construir un nuevo índice pronóstico específico para LMMC que incluya las alteraciones citogenéticas y moleculares que eventualmente pudieran tener un valor pronóstico independiente.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Pacientes

4.1.1 Recogida de datos

El Registro Español de SMD (RESMD) es una base de datos creada dentro del Grupo Cooperativo Español de SMD (GESMD), el cual fue constituido en 2005 para promover estudios cooperativos de investigación entre las distintas instituciones españolas que trabajan en este área (Apéndice 1). La base de datos incluye datos clínicos y biológicos de los pacientes diagnosticados de SMD y LMMC de 104 instituciones participantes. Todos los datos fueron verificados y actualizados por los responsables de cada institución y revisados para evitar casos duplicados. Este estudio fue aprobado por el comité ético del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe y todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a la revisión del año 2000 de la Declaración de Helsinki.

4.1.2 Serie de estudio

Se recogieron retrospectivamente los datos clínicos y hematológicos de los pacientes con LMMC de novo diagnosticados entre 1980 y 2009 de acuerdo a los criterios de clasificación de la OMS 2008 en el GESMD. Antes de 2008, los pacientes fueron diagnosticados de acuerdo a los criterios de las clasificaciones FAB y OMS vigentes en el momento del diagnóstico y reclasificados posteriormente según la clasificación de la OMS 2008. Los pacientes con un porcentaje de blastos en médula ósea o sangre periférica igual o superior al 20% fueron excluidos del estudio al ser reclasificados como LMA.

La mayoría de los pacientes recibieron tratamiento de soporte (transfusiones de hematíes y/o plaquetas y antibióticos) según el requerimiento. Los pacientes con hiperleucocitosis y/o los síntomas relacionados con la esplenomegalia recibieron hydroxyurea. Ninguno de los pacientes incluidos en este estudio recibió azacitidina o decitabina y los que recibieron un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (n = 4) o quimioterapia intensiva tipo LMA (n = 23) fue interrumpida la observación a efectos de cálculos actuariales en el momento en el que comenzaron estos procedimientos.

De 75 pacientes de la serie se recogieron y almacenaron muestras de médula ósea y/o sangre periférica en el Laboratorio de Citogenética y Biología

Molecular del Servicio de Hematología del Hospital Universitario La Fe para el estudio de las alteraciones genéticas.

4.1.3 Serie de validación

Para validar los resultados, dispusimos de una serie independiente de 274 pacientes (191 hombres y 83 mujeres) procedente del Registro de SMD de Düsseldorf del Hospital Heinrich-Heine-University (Düsseldorf, Germany) entre 1982 y 2009 (n = 153) y del Servicio de Hematología del Hospital San Matteo (Pavia, Italy) entre 1992 y 2009 (n = 121). Se seleccionaron los pacientes con diagnóstico de LMMC de novo según los mismos criterios de inclusión que la serie de estudio. La mediana de seguimiento de la serie fue de 16 meses (1 – 170 meses).

4.2 Estudio citogenético

El análisis citogenético convencional de los casos diagnosticados en nuestro centro consistió en el estudio de las alteraciones cromosómicas en las metafases de las células leucémicas obtenidas tras el cultivo in vitro de células de médula ósea.

4.2.1 Procesamiento de las muestras para el bandeo G

A partir de muestras de aspirado de médula ósea se practicaron cultivos de 24 horas en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10% y antibiótico. Los cultivos se prepararon en cámara de flujo laminar y posteriormente se incubaron a 37°C durante toda la noche en un incubador con 5% de presión de CO₂ y una humedad del 90%.

4.2.1.1 Sacrificio del cultivo

Para impedir la formación del huso acromático y que por tanto los cromosomas se dirijan a los polos de la célula, se añadieron 100µL de Colcemid al día siguiente, dejándolo actuar 30 minutos a 37°C. Para la recolección de los cromosomas se transfirió el cultivo a un tubo cónico y se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm, decantándose el sobrenadante y resuspendiendo el

sedimento posteriormente. Se añadieron 10mL de CIK (atemperado a 37°C) y se incubó durante 30 minutos a 37°C para permitir su entrada en las células y que éstas aumentaran de volumen. Posteriormente, se vertió gota a gota el fijador Carnoy (metanol:ácido acético 3:1) completando hasta 5mL, se centrifugó, decantó y resuspendió el botón celular. La fijación con disolución de Carnoy se repitió hasta tres veces para la obtención de un botón celular limpio.

4.2.1.2 Preparación de extensiones

Para la elaboración de las preparaciones se vertió una gota de suspensión celular sobre un portaobjetos desengrasado previamente en metanol frío. La extensión se secó al aire y en llama. Los portaobjetos con metafases aptas se dejaron envejecer toda la noche en horno a 60°C.

4.2.1.3 Tinción de bandas G

Los cromosomas se identificaron mediante el método de bandas G con tripsina-Giemsa (Seabright et al, 1971). Las extensiones se sometieron a una digestión enzimática con tripsina y se tiñeron con una solución de Giemsa (47,5mL fosfato monopotásico + 47,5mL fosfato bisódico + 5mL de Giemsa) durante 5 minutos. Por último se lavaron y se dejaron secar toda la noche.

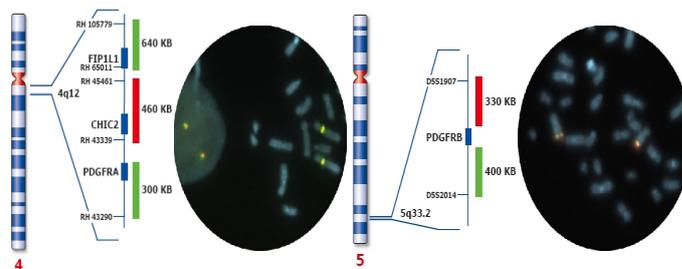
4.2.2 Análisis del cariotipo

Para la aceptación de un cariotipo como normal, se analizaron al menos 20 metafases por muestra. Las metafases se visualizaron con un microscopio Nikon Eclipse E600 (Tokyo, Japón) y fueron analizadas usando el programa Ikaros (Metasystems Inc., Alemania). La nomenclatura utilizada para describir las anomalías cromosómicas ha sido de acuerdo al Sistema Internacional de Nomenclatura Cromosómica (ISCN, Shaffer et al, 2005).

4.2.3 Hibridación in situ Fluorescente (FISH)

El estudio de los reordenamientos de los genes *PDGFRA* y *PDGFRB* se realizó según las indicaciones de la casa comercial. Referencias: KB10003 y KB10004 (Kreatech diagnostics).

Figura 3. Estructura de las sondas comerciales para PDGFRA y PDGFRB.



Referencias: KB10003 y KB10004 (Kreatech diagnostics).

4.3 Estudio de las alteraciones moleculares

En la caracterización molecular de rutina de los pacientes, se realizó un análisis de aquellas alteraciones que han sido descritas como más relevantes.

4.3.1 Extracción de ácidos nucleicos

Para la extracción del DNA se utilizó el kit comercial QIAmp® DNA Mini kit (Quiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este método es rápido y eficaz y permite extraer DNA incluso de muestras muy hipocelulares. La calidad, integridad y cantidad del DNA se determinó mediante espectrofotometría medida como absorbancia a una longitud de onda (λ) de 260nm y 280nm (Nanodrop) y mediante la migración en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio para visualización del nivel de degradación. Se seleccionarán aquellas muestras con concentraciones superiores a 50mg/mL, cuya cantidad total no sea inferior a 1 μ g y presenten ratios Abs260/280 alrededor de 1.8. Las muestras serán almacenadas a -80°C hasta su utilización.

4.3.2 FLT3 y NPM1

El estudio de las mutaciones de FLT3-ITD y NPM1 se realizó mediante PCR utilizando cebadores específicos descritos previamente (Nakao et al, 1996 y Schnittger et al, 2005). Los productos de PCR se analizaron mediante análisis

de fragmentos en secuenciador ABIPRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

4.3.3 JAK2

La detección de la mutación puntual V617F del gen *JAK2* se fundamenta en el uso de PCR alelo específicas diseñadas para amplificar el alelo mutado y/o el alelo normal realizando una PCR cualitativa según el método descrito por Jones et al, (2005).

4.3.4 c-FMS, KDR, FLT1, c-CBL, IDH1 e IDH2

4.3.4.1 Diseño de cebadores

La detección de mutaciones en los genes de estudio se basó en la amplificación y posterior secuenciación de los exones de interés. Se usaron cebadores específicos para cada uno de los genes. En el diseño de los cebadores se tuvo en cuenta la longitud de los cebadores (entre 17-28 nucleótidos), que el contenido de GC fuese elevado y que terminaran en C/G. Además, se comprobó que la pareja de cebadores tuviera un porcentaje de GC similar, que fuesen complementarios a las regiones deseadas y que ambos cebadores tuvieran una temperatura de fusión similar ($T_m \sim 4GC + 2AT$) (normalmente, $T_m > 56$). Con estos criterios, se diseñaron cebadores específicos para cada una de las regiones de interés en los genes a estudio (Tabla 8). Los cebadores se hibridaron en las regiones intrónicas flanqueantes a los exones de interés para conseguir secuencias de entre 300-850pb.

Tabla 8. Secuencia de cebadores empleados para el estudio de los genes.

GEN	Cebador	Secuencia
<i>C-FMS</i> , Dominio tirosina-quinasa (TK)		
	Sentido	5'-GGGACTGGATCAATGGGTGG -3'
	Anti-sentido	5'-GTCCCAGGTAGGTCCAGTAAAA-3'
<i>C-FMS</i> , Dominio Yustamembrana (YM)		
	Sentido	5-CTGACCTGCGAGCAA-3
	Anti-sentido	5-CCCCGTGTCGCCCCATCC-3
<i>FLT1</i> , Dominio tirosina-quinasa		
	Sentido	5'-GGTTTACTTTGCCACTTCTTGC -3'
	Anti-sentido	5'-AACTGTTGCAAGAACAAACAGG-3'
	Secuenciación	5'TGTGATGAGTGTATGTGAATGTGG-3'
<i>FLT1</i> , Dominio Yustamembrana		
	Sentido	5'-CATTTTAATGGGCTTTTGTTC-3'
	Anti-sentido	5'-TACGGCTTTTCTTTGAACACC-3'
	Secuenciación	5'-TGTATACTGCCTGGCTTAGAAGG-3'
<i>KDR</i> , Dominio tirosina-quinasa		
	Sentido	5'-CCTTAATTCTGAGCTCCTTTGG-3'
	Anti-sentido	5'-CAAATGTCCTGCTTTGGATG -3'
	Secuenciación	5'-GGGACAAGGGAACTAGAAGC-3'
<i>KDR</i> , Dominio Yustamembrana		
	Sentido	5'- TACGGGTGTGTAAGTGTTC -3'
	Anti-sentido	5'-GGGCAGGAACGTTATTGTATTG-3'
	Secuenciación	5'-TACGGGTGTGTAAGTGTTC-3'
<i>C-CBL</i> , Exón 8		
	Sentido	5'-GGACCCAGACTAGATGCTTTCT -3'
	Anti-sentido	5'-TTTTTGATCTCTAGGAAATGTATTTTC -3'
<i>C-CBL</i> , Exón 9		
	Sentido	5'-CTGGCTTTTGGGGTTAGGTT-3'
	Anti-sentido	5'-AAAGCCGTAACACTTAACGA -3'
<i>IDH1</i> , Exón 4		
	Sentido	5'-CCATTTGTCTGAAAACTTTGCT -3'
	Anti-sentido	5'- AAGTCATGTTGGCAATAATGTGA -3'
<i>IDH2</i> , Exón 4		
	Sentido	5'-GCTGCAGTGGGACCACTATT -3'
	Anti-sentido	5'-CTCTGCAGTACAAGGCCACA -3'

4.3.4.2 Amplificación

La amplificación por PCR fue llevada a cabo en el termociclador 2720-Thermal Cycler de Applied Biosystem, comportando una primera etapa de activación de la polimerasa a 94°C durante 10 minutos, seguido de 35 ciclos que comprendían, una primera fase de desnaturalización de 94°C durante 30 segundos, una fase de hibridación a 54-60°C según el gen estudiado (ver detalle en Tabla 9), y una fase de extensión de la cadena a 72°C durante 30 – 45 segundos. El programa finalizó con una extensión a 72°C durante siete minutos.

Todas las PCR se amplificaron en una reacción final de 25µL, conteniendo 25-50ng de DNA genómico, 2.5µL de tampón de PCR 10X, 2,5mM de MgCL₂, 2mM de desoxirribonucleótidos (dNTP), 1.5U de DNA polimerasa (Ampliaq gold, 5U/µL) y 50pmol de los cebadores específicos.

Tabla 9. Temperatura de amplificación empleada para cada pareja de cebadores.

Dominio	T° de amplificación	Amplicón
<i>c-FMS</i> (c.301)	55°C	370 pb
<i>c-FMS</i> (c.969)	55°C	405 pb
<i>FLT1</i> (Dominio YM)	57°C	671 pb
<i>FLT1</i> (Dominio TK)	57°C	834 pb
<i>KDR</i> (Dominio TK)	56°C	390 pb
<i>KDR</i> (Dominio TK)	56°C	525 pb
<i>c-CBL 8</i>	52°C	446 pb
<i>c-CBL 9</i>	60°C	399 pb
<i>IDH1</i>	54°C	360 pb
<i>IDH2</i>	54°C	293 bp

Tras la amplificación, 10µL del producto se corrieron en un gel de agarosa al 3% para comprobar que había producto amplificado correspondiente al tamaño

esperado [el marcador de peso molecular utilizado fue el Marker VI (0.15-2.1kpb, Roche, Indianápolis USA)] y que no habían productos inespecíficos.

4.3.4.3 Secuenciación

Las muestras con una amplificación correcta fueron tratadas con ExoSAP-IT (USB Corporation, Cleveland, Ohio USA) para eliminar los cebadores y nucleótidos que habían quedado sin utilizar tras la amplificación. Para ello se mezclaron 8µL del producto de PCR obtenido con 2µL de ExoSAP-IT y se incubaron a 37°C durante 15 minutos (tiempo en el que realiza su acción) y a 80°C durante otros 15 minutos para inactivarlo. La incubación se llevó a cabo en el termociclador 2720-Thermal Cycler de Applied Biosystems.

La primera fase de la reacción de secuenciación se llevó a cabo en el termociclador 2720-Thermal Cycler de Applied Biosystems, comportando una primera etapa de activación de la polimerasa a 94°C durante 3 minutos, seguido de 25 ciclos que comprendían una primera fase de desnaturalización de 96°C durante 10 segundos, una fase de hibridación a 50°C para todos los genes durante 6 segundos, y una fase de extensión de la cadena a 60°C durante 4 minutos.

La purificación de la reacción de secuenciación se realizó por filtración (Gel Filtration Cartridge. Genycell Biotech España, S.L.). Finalmente, el producto de reacción fue resuspendido en 20µL de formamida. Se utilizó el secuenciador ABIPRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

El análisis de la secuencia se correlacionó con el GeneBank Accession number de cada uno de los genes (Tabla 10) y con los controles negativos de médulas óseas de donantes sanos, todo ello mediante el programa de análisis Sequence Scanner de Applied Biosystems y el MEGA 4.1. En todas las muestras se secuenció la cadena sentido y anti-sentido.

Tabla 10. Números de *GeneBank* *accesion* con los que se ha comparado los resultados.

Gen	GeneBank Accesion nº	Exón estudiado
<i>c-FMS</i>	NG_012303.1 GI: 239787264	22
<i>FLT1</i>	NC_000013.10 NT_024524.14	16 y 17
<i>KDR</i>	NC_000004.11 NT_022853.15	16 y 17
<i>c-CBL</i>	NC_000011.9 NT_033899.8	16
<i>IDH1</i>	NC_000002.11 NT_005403.17	4
<i>IDH2</i>	NC_000015.9 NT_010274.17	4

4.4 Análisis estadístico

En primer lugar se realizó un análisis estadístico descriptivo de la serie. Los resultados se expresaron como porcentajes en las variables categóricas y como medianas (extremos) para las variables continuas. El estudio de la comparación de la distribución de las variables en los distintos subgrupos de pacientes se realizó mediante el test de t-student cuando se estudiaban variables continuas y Chi-cuadrado de Pearson para las variables categóricas.

Se incluyeron en el estudio datos demográficos básicos (edad y sexo), parámetros hematológicos (nivel de hemoglobina, recuento de leucocitos, neutrófilos y plaquetas y porcentaje de blastos en SP), porcentaje de blastos en MO, niveles de LDH en suero, niveles de ferritina, la dependencia transfusional al diagnóstico (haber recibido al menos una transfusión de concentrado de hematíes cada 8 semanas en un periodo de 4 meses) y la citogenética. Las variables continuas fueron categorizadas de acuerdo al punto de corte más discriminante o al establecido por trabajos previos. Para el análisis citogenético, las alteraciones se clasificaron en seis categorías: cariotipo normal, trisomía 8 (aislada o con una alteración adicional), pérdida aislada del cromosoma Y, cariotipo complejo (tres o más alteraciones), alteraciones del cromosoma 7 (monosomía o deleción del brazo largo, aislada o con una alteración adicional), y otras anomalías diversas (simples o dobles).

La estimación de la supervivencia global se realizó mediante el método de Kaplan-Meier (Kaplan EL. 1958) y para comparaciones las pruebas de log-rank (Mantel N. 1966). La probabilidad de evolución a LMA se calculó mediante los métodos de Kaplan-Meier y el método de incidencia acumulativa (riesgo competitivo, Gooley TA *et al.*, 1999). Para el análisis de la incidencia acumulativa, se consideró evento competitivo la muerte sin evolución. La supervivencia global se definió como el tiempo transcurrido entre el diagnóstico y la muerte o el último seguimiento y la probabilidad de evolución a LMA, como el tiempo transcurrido entre el diagnóstico y la progresión a leucemia aguda o el último seguimiento.

Las variables con un valor de $P < 0.10$ para cada 'end point' fueron incluidas en los análisis multivariantes usando el método de riesgo proporcional de Cox para eventos temporales (observaciones incompletas, Cox DR. 1972) o el método de Fine and Gray para la incidencia acumulativa (Fine JP, Gray RJ. 1999). El análisis estadístico se realizó usando el SPSSv17 y el lenguaje y entorno de programación R version 2.13.2, usando los paquetes maxstat v0.7-14, survival v2.36-10, , Design 2.3-0, prodlim v1.2.1 y cmprsk v2.2-2.

5. RESULTADOS

5.1 Descripción de la serie

Se seleccionaron un total de 558 pacientes procedentes del RESMD. La mediana de edad de la serie fue de 74 años (extremos, 17 – 99). Trescientos setenta y siete pacientes (69%) fueron hombres y 181 (31%) mujeres. De acuerdo a la clasificación FAB, 338 pacientes (60%) fueron LMMC-MD y 220 (40%) fueron LMMC-MP. Según la clasificación de la OMS, 478 pacientes (86%) fueron LMMC-1 y 80 (14%) fueron LMMC-2. Las características principales de los pacientes se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Características principales de los paciente según las clasificaciones FAB y OMS.

	Clasificación FAB			Clasificación OMS		P
	Mediana	LMMC-MD	LMMC-MP	LMMC-1	LMMC-2	
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	
Total	558	338 (60)	220 (40)	478 (86)	80 (14)	
Edad	73 (19 – 99)					.455
< 70	190 (34)	111 (33)	79 (36)	161 (34)	29 (36)	
> 70	368 (66)	227 (67)	141 (64)	317 (66)	51 (64)	
Sexo						.534
Hombre	377 (68)	225 (66)	152 (69)	320 (67)	57 (71)	
Mujer	181 (32)	113 (34)	68 (31)	158 (33)	23 (29)	
Clasificación OMS						.117
LMMC 1	478 (86)	295 (87)	183 (83)	--	--	
LMMC 2	80 (14)	43 (13)	37 (17)	--	--	
Leucocitos	10 (1 – 156)					.177
< 13 x10 ⁹ /L	338 (60)	--	--	295 (62)	43 (54)	
≥ 13 x10 ⁹ /L	220 (40)	--	--	183 (38)	37 (46)	
Hemoglobina	11 (3 –19)					.001
< 10 g/dL	190 (34)	98 (29)	92 (48)	149 (31)	41 (51)	
≥ 10 g/dL	368 (66)	240 (71)	128 (58)	329 (69)	39 (49)	

Tabla 11 (continuación). Características principales de los paciente según las clasificaciones FAB y OMS.

	Clasificación FAB			Clasificación OMS		P
	Mediana	LMMC-MD	LMMC-MP	LMMC-1	LMMC-2	
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	
Total	558	338 (60)	220 (40)	478 (86)	80 (14)	
Plaquetas	123 (4 – 928)					.040
< 100 x10 ⁹ /L	221 (40)	138 (41)	83 (38)	181 (38)	40 (50)	
≥ 100 x10 ⁹ /L	337 (60)	200 (59)	137 (62)	297 (62)	40 (50)	
Neutrófilos	4.2 (1 – 74)					< .001
< 1.8x10 ⁹ /L	101 (18)	99 (29)	2 (1)	90 (19)	11 (14)	
≥ 1.8x10 ⁹ /L	457 (82)	239 (71)	218 (99)	388 (81)	69 (86)	
Monocitos	2.6 (1 – 41)					< .001
< 3 x10 ⁹ /L	234 (56)	199 (82)	35 (20)	209 (58)	25 (42)	
≥ 3 x10 ⁹ /L	182 (44)	45 (18)	137 (80)	148 (42)	34 (58)	
Blastos MO	3 (0 – 19)					< .001
< 5%	347 (62)	210 (62)	137 (62)	344 (72)	3 (4)	
5 - 9%	138 (25)	89 (26)	49 (22)	134 (28)	4 (5)	
10 - 19%	73 (13)	39 (12)	34 (16)	0 (0)	73 (92)	
Blastos SP						< .001
< 0	365 (78)	239 (85)	126 (67)	334 (84)	31 (46)	
> 0	102 (22)	41 (15)	61 (33)	65 (16)	37 (54)	
LDH	394(104 – 2976)					< .001
≤ 480 U/L	242 (68)	165 (78)	77 (53)	216 (71)	26 (50)	
> 480 U/L	115 (32)	46 (22)	69 (47)	89 (29)	26 (50)	
Disgranulopoyesis						.283
< 10	31 (20)	16 (17)	15 (25)	29 (20)	2 (10)	
≥ 10	124 (80)	77 (83)	47 (75)	110 (79)	14 (90)	
Diseritropoyesis						.902
< 10	79 (53)	45 (53)	34 (54)	74 (56)	5 (33)	
≥ 10	69 (47)	40 (47)	29 (46)	59 (44)	10 (67)	
Distrombopoyesis						.126
< 10	84 (49)	56 (53)	28 (41)	77 (49)	7 (41)	
≥ 10	89 (51)	49 (47)	40 (59)	79 (51)	10 (59)	

5.1.1 Comparación entre LMMC-MD y LMMC-MP

Con las variables estudiadas, pueden observarse marcadas diferencias entre los subtipos mielodisplásicos y mieloproliferativos de la LMMC. Los pacientes con LMMC-MD en comparación con los que tenían LMMC-MP presentaron menos anemia (29% vs. 58%, $P = .001$), más neutropenia (29% vs. 1%, $P < .001$), menor recuento de monocitos absolutos (18% vs. 80%, $P < .001$), menos blastos en SP (15% vs. 33%, $P < .001$), menor incidencia de LDH elevada (22% vs. 47%, $P < .001$; Tabla 12). Por el contrario, el porcentaje de blastos en MO y la frecuencia de cariotipos alterados es similar en ambos subgrupos.

5.1.2 Comparación entre LMMC-1 y LMMC-2

También pudieron observarse marcadas diferencias entre los dos subgrupos propuesto por la OMS. Los pacientes con LMMC-2, además de un mayor porcentaje de blastos ya determinado por la propia definición de estas categorías, presentaron mayor frecuencia de anemia (31% vs. 51%, $P = .001$), y trombopenia (38% vs. 50%, $P = .040$). Además los pacientes con LMMC-2 presentaron mayor frecuencia alteraciones citogenéticas (22% vs. 56%, $P < .001$; Tabla 12).

5.2 Citogenética

5.2.1 Descripción

Para determinar la importancia pronóstica de las alteraciones citogenéticas en pacientes con LMMC se analizaron los resultados del cariotipo de 414 pacientes. De ellos, trescientos cuatro pacientes (73%) presentaron un cariotipo normal al diagnóstico y 110 pacientes (27%) presentaron un cariotipo anormal. La alteración citogenética más frecuente fue la trisomía del cromosoma 8 ($n = 30$), veinticuatro pacientes presentaron la alteración de forma aislada y seis con una de las siguientes alteraciones adicionales: $\text{del}(5)(q31q33)$, $+10$, $\text{del}(11)(q14)$, $\text{del}(12)(p13)$, $\text{add}(17)(p13.3)$, $+19$, y $+21$. Le siguieron en frecuencia la pérdida aislada del cromosoma Y ($n = 18$), las alteraciones del cromosoma 7 ($n = 6$), cinco con monosomía 7 y uno con $\text{del}(7q)$, cuatro de ellos como alteración aislada y dos casos con una alteración adicional. En cinco

Resultados

pacientes se halló un cariotipo complejo con más de dos alteraciones (n = 12). Cuarenta y cuatro pacientes adicionales presentaron otras anomalías no recurrentes. Entre ellas se presentaban en al menos tres casos las siguientes alteraciones: del(20q) (n = 3), como alteración aislada en todos los casos y del(5q) (n = 3), que se encontró de forma aislada en dos pacientes y en el restante con una alteración adicional. En las figuras 4 y 5 se muestra un diagrama con las frecuencias de las alteraciones más relevantes encontradas y su presentación aislada o con otras anomalías.

Figura 4. Frecuencia de las alteraciones cromosómicas más comunes.

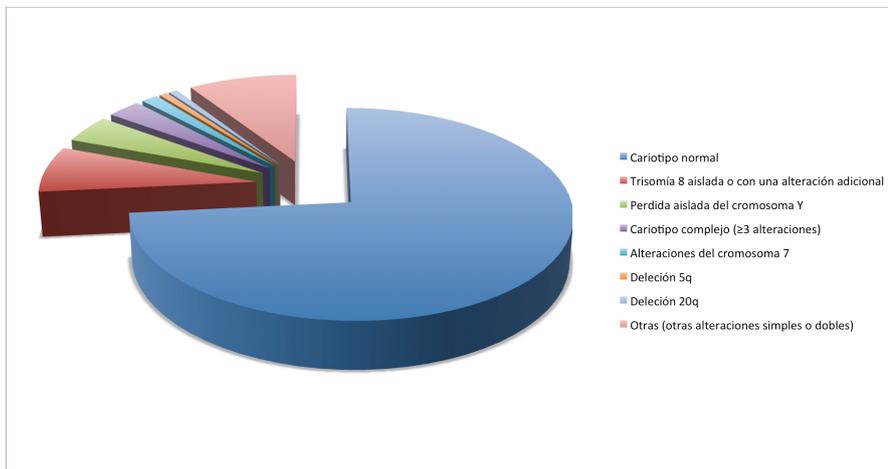
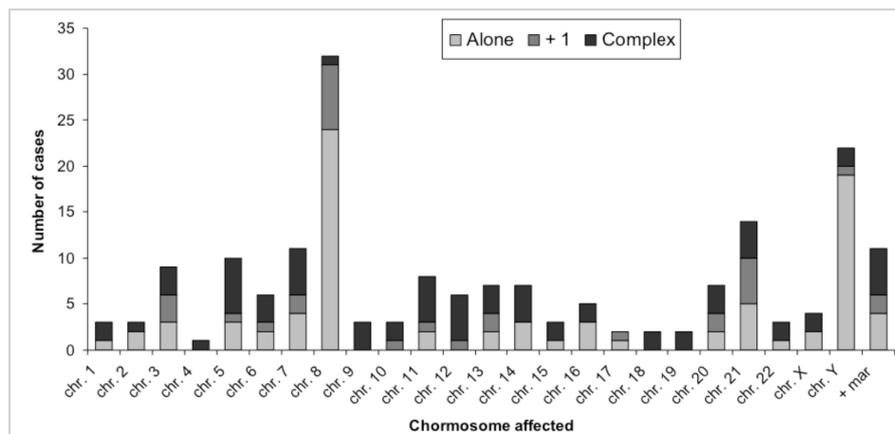


Figura 5. Frecuencia de las alteraciones cromosómicas más comunes según se presenten aislada, con una alteración adicional o en cariotipo complejo.



5.2.2 Asociación de la citogenética con otras variables

Al analizar el grupo de pacientes con cariotipo normal y con cariotipo alterado por separado, observamos que las alteraciones cromosómicas se encontraban con mayor frecuencia en el subgrupo de LMMC-2 de la clasificación de la OMS ($P < .001$). Además, este subgrupo presentaba una frecuencia más alta de blastos en MO (igual o superior al 10%, $P < .001$), una mayor presencia de blastos en SP ($P < .001$), más diseritropoyesis ($P = .015$) y más disgranulopoyesis ($P = .037$). En la tabla 12 están detalladas las principales características de estos pacientes.

Tabla 12. Comparación de los pacientes con LMMC de acuerdo a la presencia o no de alteraciones cromosómicas.

Características	Cariotipo normal	Cariotipo alterado	P
	N (%)	N (%)	
Total	304 (78)	110 (22)	
Edad, años			.300
< 70	102 (34)	44 (40)	
> 70	202 (66)	66 (60)	
Sexo			.181
Hombre	205 (67)	82 (74)	
Mujer	99 (43)	28 (36)	
Clasificación OMS			< .001
LMMC 1	283 (93)	82 (75)	
LMMC 2	21 (7)	27 (25)	
Hemoglobina g/dL			.101
< 10	101 (67)	46 (42)	
≥ 10	203 (33)	64 (78)	
Leucocitos, x 10⁹/L			.102
< 13	187 (62)	60 (55)	
≥ 13	117 (48)	50 (45)	
Plaquetas, x 10⁹/L			.283
< 100	113 (37)	43 (39)	
≥ 100	189 (73)	64 (61)	

Tabla 12 (continuación). Comparación de los pacientes con LMMC de acuerdo a la presencia o no de alteraciones cromosómicas.

Características	Cariotipo normal N (%)	Cariotipo alterado N (%)	P
Neutrófilos, x 10⁹/L			.252
< 1.8	62 (20)	17 (16)	
≥ 1.8	242 (80)	92 (84)	
Blastos en MO, %			< .001
0 - 9	292 (96)	91 (83)	
10 -19	12 (4)	19 (17)	
Blastos en SP			< .001
No	245 (81)	67 (61)	
Si	17 (19)	17 (39)	
LDH, U/L			.053
≤ 480	149 (70)	39 (58)	
> 480	63 (30)	28 (42)	
Disgranulopoyesis			.037
< 10	27 (24)	4 (10)	
≥ 10	88 (76)	36 (90)	
Diseritropoyesis			.015
< 10	65 (59)	14 (37)	
≥ 10	45 (41)	24 (63)	
Distrombopoyesis			.643
< 10	65 (50)	19 (45)	
≥ 10	66 (50)	23 (55)	

5.2.3 Impacto de las alteraciones citogenéticas en la supervivencia

5.2.3.1 Efecto sobre la supervivencia global

Para poder categorizar las alteraciones citogenéticas según su impacto en la supervivencia se analizaron cada una de las alteraciones más frecuentes por separado. La mediana de seguimiento de la serie fue de 16 meses (extremos, 1 – 170) y la mediana de supervivencia global de la serie de 31 meses. Los pacientes con cariotipo normal tuvieron una supervivencia global más larga que los que presentaron alteraciones citogenéticas (36 vs. 16 meses, $P = .001$).

Igualmente, los pacientes con una pérdida aislada del cromosoma Y mostraron una mayor supervivencia global que el resto de pacientes con alteraciones citogenéticas (41 vs. 16 meses, $P = .020$). Por el contrario, los pacientes con trisomía del cromosoma 8 o un cariotipo complejo presentaron una supervivencia global más corta que el resto de pacientes con alteraciones cromosómicas (11 vs. 16 meses, $P < .001$ y 8 vs. 16 meses, $P < .001$, para trisomía 8 y cariotipo complejo, respectivamente). El resto de pacientes con alteraciones no recurrentes mostraron una supervivencia global significativamente menor que los pacientes con cariotipo normal o una pérdida aislada del cromosoma Y (19 vs. 39 meses para el grupo de cariotipo normal y 41 meses para el grupo de pérdida aislada del cromosoma Y, $P = .017$) y significativamente más larga que en los pacientes que presentaban trisomía del 8 o cariotipo complejo (19 vs. 11 meses para el grupo de trisomía y 9 meses para cariotipo complejo, $P = .007$). No se observaron diferencias en la supervivencia en ninguna de las alteraciones de baja frecuencia (simples o dobles) incluidas en el grupo de alteraciones no recurrentes (Tabla 13).

Tabla 13. Relación del cariotipo y de las alteraciones más frecuentes encontradas con la supervivencia global.

Características	Supervivencia Global			
	N (%)	Mediana (meses)	Vivos a los 5 años (%)	P
Total	414 (100)	35	33	
Cariotipo				.001
Normal	304 (73)	39	36	
Alterado	110 (27)	16	23	
Categorías citogenéticas				< .001
Cariotipo normal	304 (73)	39	36	
Trisomía 8 aislada o con una alteración adicional	30 (7.2)	11	13	
Pérdida aislada del cromosoma Y	18 (4.3)	41	41	
Cariotipo complejo (≥ 3 alteraciones)	12 (2.9)	9	0	
Alteraciones del cromosoma 7	6 (1.5)	18	0	
Otras (simples o dobles)	44 (10.6)	19	27	

La mediana de supervivencia en los pacientes con alteraciones del cromosoma 7 fue de 18 meses, menor que la observada en la serie global (35 meses). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre este grupo y el resto de grupos citogenéticos. Cabe destacar que los análisis de supervivencia en las alteraciones que se presentaron con muy baja frecuencia, incluida las alteraciones del cromosoma 7, se vieron dificultados por el bajo número de casos encontrados.

5.2.3.2 Efecto sobre el riesgo de evolución a LMA

Al estudiar el impacto de las alteraciones citogenéticas en el riesgo de evolución a LMA, de los 414 pacientes estudiados, 59 de ellos evolucionaron a LMA. La mediana de tiempo de la probabilidad de que el 25% evolucione a LMA fue de 59 meses y la probabilidad de evolución a LMA a los 2 y 5 años fue del 15% y 29%, respectivamente. Al comparar los distintos subgrupos de alteraciones citogenéticas, los pacientes con cariotipo complejo asociaron una mayor probabilidad de desarrollar LMA ($P < .001$; Tabla 14)

Tabla 14. Relación del cariotipo y de las alteraciones más frecuentes encontradas con la evolución a LMA.

Características	Evolución a LMA			P
	Evolución del 25% (meses)	Probabilidad actuarial (%)		
		2 años	5 años	
Total	39	15	29	
Cariotipo				.010
Normal	59	12	27	
Alterado	13	26	36	
Categorías citogenéticas				.001
Cariotipo normal	59	12	27	
Trisomía 8 aislada o con una alteración adicional	12	41	41	
Perdida aislada del cromosoma Y	25	11	26	
Cariotipo complejo (≥ 3 alteraciones)	7	44	100	
Alteraciones del cromosoma 7	6	33	33	
Otras (simples o dobles)	8	21	34	

También los pacientes con una trisomía del cromosoma 8 mostraron una tendencia a evolucionar a LMA ($P = .081$). En contraste, los pacientes con una citogenética normal tenían una baja probabilidad de evolución a LMA ($P = .010$). En los casos con alteraciones del cromosoma 7 la mediana de tiempo de la probabilidad de que el 25% evolucione a LMA fue de 6 meses y la probabilidad de evolución a LMA a los 2 años del 33% pero, al igual que en supervivencia global, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el riesgo de evolución a LMA de este subgrupo de pacientes y el resto de subgrupos citogenéticos (Tabla 14).

5.2.4 Propuesta de una clasificación de riesgo citogenético

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el análisis univariante, se desarrolló una nueva clasificación de riesgo citogenético para LMMC. Los pacientes se estratificaron en tres grupos pronósticos (favorable, intermedio y desfavorable) de acuerdo a las alteraciones citogenéticas y la supervivencia global obtenida en cada uno de ellos. De esta forma, los pacientes con cariotipo normal y delección aislada del cromosoma Y se asignaron a la categoría de buen pronóstico. Los pacientes con trisomía 8, alteraciones del cromosoma 7 y cariotipo complejo fueron considerados de pronóstico desfavorable. Las alteraciones del cromosoma 7 se asignaron al grupo de pronóstico desfavorable, a pesar de su falta de significación estadística en el análisis univariante, en base a su corta supervivencia global y su alto riesgo de evolución a LMA en esta serie y en otros importantes estudios que incluían pacientes con LMMC (Onida *et al.*, 2002) y a la cohorte del IPSS (Greenberg *et al.*, 1997). El resto de pacientes con otras alteraciones tanto simples como dobles se definieron como grupo intermedio. Las principales características de los pacientes estratificados según la nueva clasificación citogenética se detallan en la Tabla 15.

Tabla 15. Características principales según el riesgo citogenético.

Características	Bajo N (%)	Intermedio N (%)	Alto N (%)	P
Total	320 (78)	49 (12)	42 (10)	
Edad, años				.21
< 70	102 (32)	26 (52)	17 (41)	
> 70	218 (68)	24 (48)	25 (59)	
Sexo				.16
Hombre	322 (69)	39 (78)	26 (62)	
Mujer	100 (31)	11 (22)	16 (38)	
Clasificación OMS				< .001
LMMC 1	297 (93)	39 (80)	29 (69)	
LMMC 2	23 (7)	10 (20)	13(31)	
Hemoglobina g/dL				.08
< 10	106 (33)	20 (40)	21 (50)	
≥ 10	214 (67)	30 (60)	21 (50)	
Leucocitos, x 10⁹/L				.04
< 13	202 (63)	26 (52)	19 (45)	
≥ 13	118 (37)	24 (48)	23 (55)	
Plaquetas, x 10⁹/L				.236
< 100	125 (39)	23 (47)	20 (49)	
≥ 100	195 (61)	26 (53)	22 (51)	
Neutrófilos, x 10⁹/L				.472
< 1.8	61 (19)	6 (13)	6 (14)	
≥ 1.8	259 (81)	43 (87)	36 (86)	
Blastos en MO, %				.004
< 5	224 (70)	27 (55)	24 (58)	
5 - 9	79 (25)	16 (33)	9 (22)	
10 - 19	16 (5)	6 (12)	8 (20)	
Blastos en SP				< .001
No	259 (93)	31 (84)	22 (71)	
Si	19 (7)	6 (16)	9 (29)	
LDH, U/L				.071
≤ 480	158 (71)	20 (57)	10 (50)	
> 480	66 (29)	15 (43)	10 (50)	

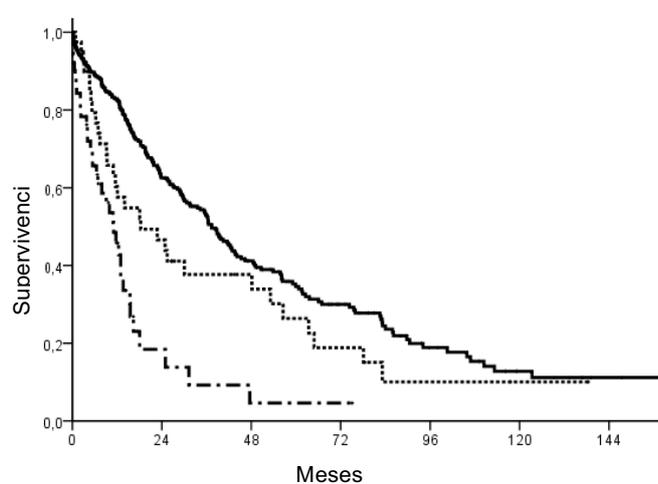
5.2.4.1 Efecto de la citogenética en la supervivencia global

Aplicando esta estratificación, la mediana de supervivencia en cada uno de estos grupos fue de 37, 18 y 11 meses, respectivamente. La supervivencia a los 5 años en las tres diferentes categorías citogenéticas fueron del 35% para el grupo de pronóstico favorable, 26% para el grupo de pronóstico intermedio y de un 4% para el grupo de pronóstico desfavorable. (Tabla 16 y Figura 6).

Tabla 16. Supervivencia global de acuerdo al grupo a la nueva clasificación desarrollada para LMMC.

	Supervivencia Global			
	N (%)	Mediana (meses)	Vivos a los 5 años (%)	P
Clasificación citogenética específica para LMMC				< .001
Bajo riesgo (cariotipo normal y -Y)	324 (78)	37	35	
Riesgo intermedio (otras alteraciones)	39 (9)	18	26	
Alto riesgo (+8, anomalías del cromosoma 7 y cariotipo complejo)	51 (12)	11	4	

Figura 6. Supervivencia global de acuerdo a la nueva clasificación propuesta para LMMC.



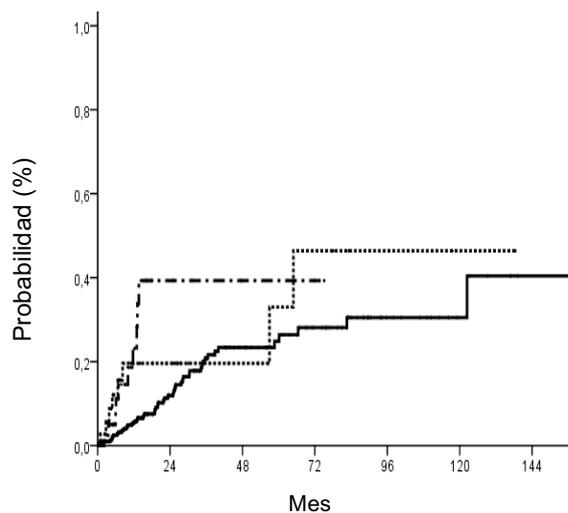
5.2.4.2 Efecto de la citogenética en la evolución a LMA

En relación a la probabilidad de evolución a LMA, el nuevo sistema pronóstico fue capaz de diferenciar los tres grupos pronósticos (significación global de $P = .001$, Figura 7). Los riesgos de transformación en los tres diferentes grupos a los 2 años fueron de: un 12% en el grupo de buen pronóstico, un 20% en el grupo de pronóstico intermedio y un 40% en el grupo de pronóstico desfavorable (Tabla 17, $P = .001$). Sin embargo, cuando comparamos las diferencias entre los grupos de riesgo, sólo se obtuvieron diferencias significativas entre el grupo de buen pronóstico vs. el de pronóstico intermedio ($P = .047$) y entre el grupo de buen pronóstico vs. el de pronóstico desfavorable ($P = .001$). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de pronóstico intermedio y pronóstico desfavorable entre sí ($P = .NS$).

Tabla 17. Riesgo de evolución a LMA de acuerdo al grupo a la nueva clasificación desarrollada para LMMC.

	Evolución a LMA			<i>P</i>
	Evolución del 25% (meses)	Probabilidad actuarial (%)		
		2 años	5 años	
Clasificación citogenética específica para LMMC				.001
Bajo riesgo (cariotipo normal y -Y)	59	12	27	
Riesgo intermedio (otras alteraciones)	10	20	33	
Alto riesgo (+8, anomalías del cromosoma 7 y cariotipo complejo)	8	42	42	

Figura 7. Riesgo de evolución a LMA de acuerdo a la nueva clasificación propuesta para LMMC.



5.2.4.3 Comparación con la clasificación citogenética del IPSS

Hasta el momento la clasificación de riesgo citogenético más usada es la clasificación citogenética según el IPSS. Por esta razón, se comparó esta nueva clasificación de riesgo citogenético, desarrollada específicamente para LMMC, con la clasificación citogenética del IPSS que incluye: en el bajo riesgo, el cariotipo normal, la pérdida aislada del cromosoma Y, y las alteraciones del(5q) y del(20q); en el grupo de alto riesgo, el cariotipo complejo (con tres o más anomalías) y las alteraciones del cromosoma 7; y, en el riesgo intermedio, todas las demás alteraciones.

En el análisis univariante, la clasificación citogenética del IPSS mostró una asociación estadísticamente significativa con la supervivencia ($P = .001$, Tabla 18). Sin embargo, sólo fue capaz de segregar dos grupos de riesgo, de forma que la supervivencia en el grupo intermedio y de alto riesgo eran prácticamente iguales (medianas de supervivencia de 37, 12 y 11 meses para los pacientes del riesgo bueno, intermedio y pronóstico desfavorable respectivamente; Figura 8).

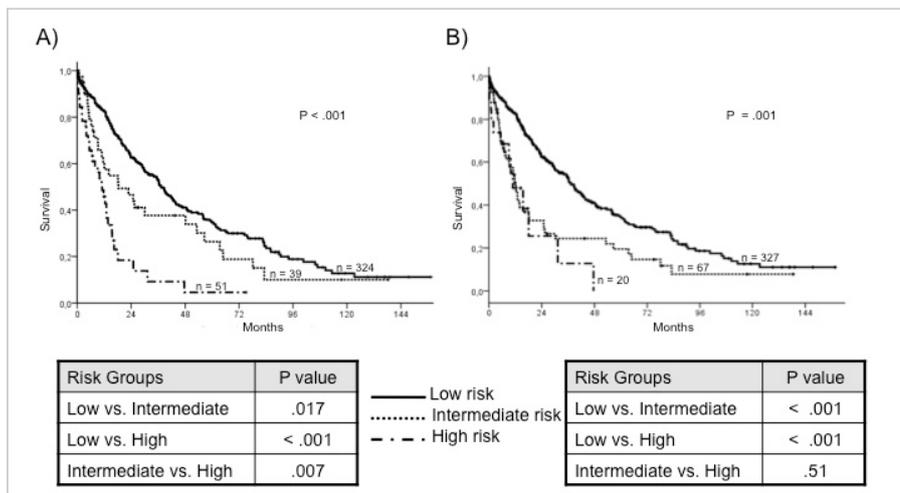
Resultados

Tabla 18. Supervivencia global de acuerdo al grupo a la nueva clasificación desarrollada para LMMC y a la clasificación citogenética del IPSS.

	Supervivencia Global			P
	N (%)	Mediana (meses)	Vivos a los 5 años (%)	
Clasificación citogenética específica para LMMC				< .001
Bajo riesgo	324 (78)	37	35	
Riesgo intermedio	39 (9)	18	26	
Alto riesgo	51 (12)	11	4	
Clasificación citogenética según IPSS				= .001
Bajo riesgo	327 (79)	37	36	
Riesgo intermedio	67 (16)	12	20	
Alto riesgo	20 (5)	11	12	

Clasificación nueva: Bajo riesgo, cariotipo normal y -Y; Alto riesgo, +8, anomalías del cromosoma 7 y cariotipo complejo; y, Riesgo intermedio, otras alteraciones. Clasificación IPSS: Bajo riesgo, del(5q) aislada, del(20q), -Y y cariotipo normal; Alto riesgo, anomalías del cromosoma 7 y cariotipo complejo; y Riesgo intermedio, otras alteraciones.

Figura 8. Supervivencia global de acuerdo a la nueva clasificación de riesgo citogenético para LMMC (A) y a la clasificación de riesgo citogenético del IPSS (B).



A continuación se realizó un análisis multivariante con ambas clasificaciones para poder determinar cual de ellas presentaba mayor poder estadístico. En un primer análisis la categorización citogenética del IPSS quedaba fuera del modelo de regresión entrando en primer lugar la nueva clasificación citogenética propuesta para LMMC. Se realizó un segundo análisis forzando la entrada de ambas clasificaciones en el modelo de regresión, en este caso la significación estadística para el IPSS fue no significativa, $P = .076$.

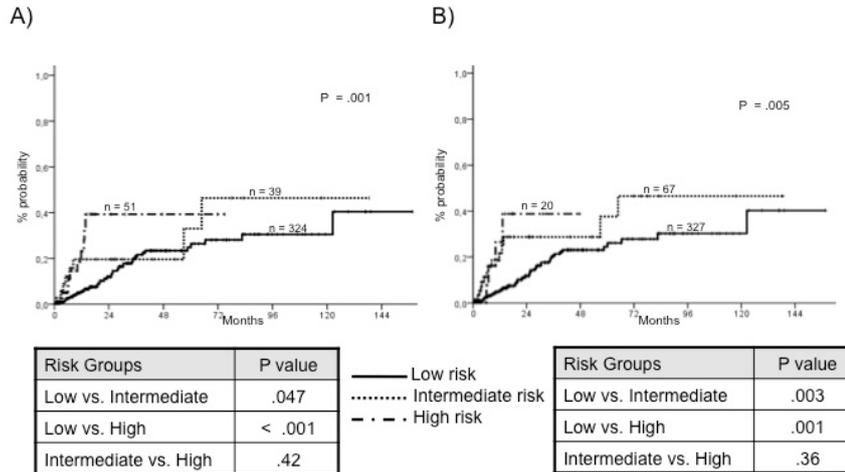
Por otro lado, se estudió el riesgo de evolución a LMA. La clasificación del IPSS también permitió diferenciar distintos grupos de riesgo de evolución a LMA ($P = .005$) pero, al igual que la nueva clasificación propuesta, no permitió diferenciar los pacientes incluidos en los grupos de riesgo desfavorable e intermedio ($P = .NS$; Tabla 19 y Figura 9).

Tabla 19. Riesgo de evolución a LMA de acuerdo al grupo a la nueva clasificación desarrollada para LMMC y a la clasificación citogenética del IPSS.

	Evolución a LMA			<i>P</i>
	Evolución del 25% (meses)	Probabilidad actuarial (%)		
		2 años	5 años	
Clasificación citogenética específica para LMMC				.001
Bajo riesgo	59	12	27	
Riesgo intermedio	10	20	33	
Alto riesgo	8	42	42	
Clasificación citogenética según IPSS				.005
Bajo riesgo	59	12	27	
Riesgo intermedio	12	29	38	
Alto riesgo	7	46	46	

Clasificación nueva: Bajo riesgo, cariotipo normal y -Y; Alto riesgo, +8, anomalías del cromosoma 7 y cariotipo complejo; y, Riesgo intermedio, otras alteraciones. Clasificación IPSS: Bajo riesgo, del(5q) aislada, del(20q), -Y y cariotipo normal; Alto riesgo, anomalías del cromosoma 7 y cariotipo complejo; y Riesgo intermedio, otras alteraciones.

Figura 9. Riesgo de evolución a LMA de acuerdo a la nueva clasificación de riesgo citogenético para LMMC (A) y a la clasificación de riesgo citogenético del IPSS (B).



5.2.4.4 Citogenética en los subgrupos LMMC-MD y LMMC-MP

Posteriormente se analizaron la asociación de las dos clasificaciones citogenéticas a la población de pacientes a la que es aplicable el IPSS: los casos con menos de $12 \times 10^9/L$.

Ambas clasificaciones permitieron diferenciar tres grupos de riesgo estadísticamente significativos tanto para supervivencia global como para riesgo de evolución a LMA en los dos subgrupos de pacientes LMMC-MD y LMMC-MP (Tabla 20 y 21).

Tabla 20. Supervivencia global de acuerdo al grupo a la nueva clasificación desarrollada para LMMC y a la clasificación citogenética del IPSS para LMMC-MD y LMMC-MP.

	Supervivencia Global			P
	N (%)	Mediana (meses)	Vivos a los 5 años (%)	
LMMC-MD				
Clasificación citogenética específica para LMMC				< .001
Bajo riesgo	210	48	43	
Riesgo intermedio	23	30	35	
Alto riesgo	22	12	13	
Clasificación citogenética según IPSS				= .001
Bajo riesgo	215	46	43	
Riesgo intermedio	32	14	26	
Alto riesgo	8	9	42	
LMMC-MP				
Clasificación citogenética específica para LMMC				< .001
Bajo riesgo	113	23	19	
Riesgo intermedio	19	11	15	
Alto riesgo	29	10	100	
Clasificación citogenética según IPSS				= .001
Bajo riesgo	114	23	19	
Riesgo intermedio	36	6	9	
Alto riesgo	11	15	100	

Clasificación nueva: Bajo riesgo, cariotipo normal y -Y; Alto riesgo, +8, anomalías del cromosoma 7 y cariotipo complejo; y, Riesgo intermedio, otras alteraciones. Clasificación IPSS: Bajo riesgo, del(5q) aislada, del(20q), -Y y cariotipo normal; Alto riesgo, anomalías del cromosoma 7 y cariotipo complejo; y Riesgo intermedio, otras alteraciones.

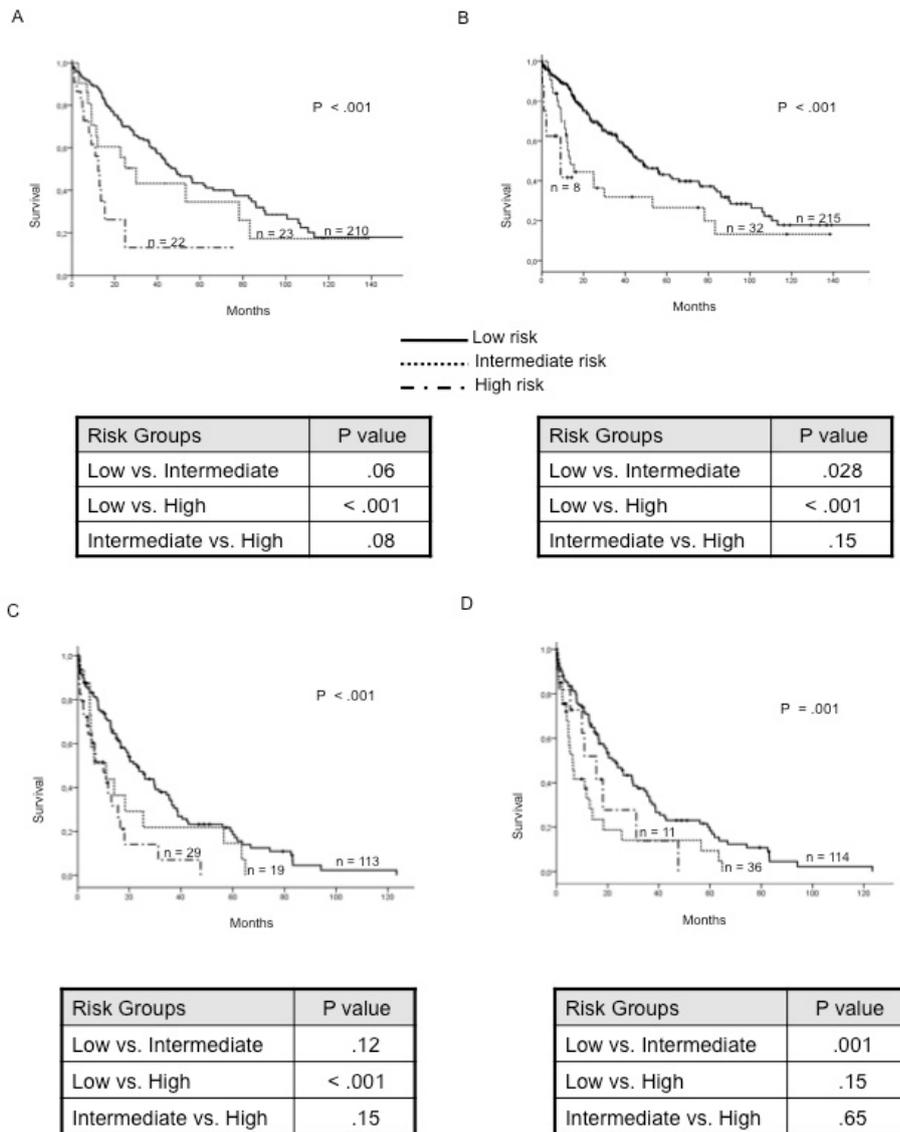
Tabla 21. Riesgo de evolución a LMA de acuerdo al grupo a la nueva clasificación desarrollada para LMMC y a la clasificación citogenética del IPSS para LMMC-MD y LMMC-MP.

	Evolución a LMA			P
	Evolución del 25% (meses)	Probabilidad actuarial (%)		
		2 años	5 años	
LMMC-MD				
Clasificación citogenética específica para LMMC				.016
Bajo riesgo	66	10	16	
Riesgo intermedio	8	21	21	
Alto riesgo	7	37	37	
Clasificación citogenética según IPSS				.047
Bajo riesgo	66	10	16	
Riesgo intermedio	13	28	28	
Alto riesgo	7	25	25	
LMMC-MP				
Clasificación citogenética específica para LMMC				.022
Bajo riesgo	28	15	44	
Riesgo intermedio	5	17	58	
Alto riesgo	6	48	48	
Clasificación citogenética según IPSS				.043
Bajo riesgo	28	15	44	
Riesgo intermedio	13	31	65	
Alto riesgo	6	47	47	

Clasificación nueva: Bajo riesgo, cariotipo normal y -Y; Alto riesgo, +8, anomalías del cromosoma 7 y cariotipo complejo; y, Riesgo intermedio, otras alteraciones. Clasificación IPSS: Bajo riesgo, del(5q) aislada, del(20q), -Y y cariotipo normal; Alto riesgo, anomalías del cromosoma 7 y cariotipo complejo; y Riesgo intermedio, otras alteraciones.

Sin embargo, mientras que la forma de las curvas de supervivencia con la nueva clasificación citogenética en el subgrupo de pacientes de LMMC-MP fue el esperado, cuando se aplicaba la clasificación citogenética del IPSS en este mismo subgrupo de pacientes la curva de supervivencia correspondiente la categoría de riesgo intermedio se dibujaba por debajo de la categoría de pacientes de riesgo alto (Figura 10A-D).

Figura 10. Supervivencia global de acuerdo a la nueva clasificación de riesgo citogenético para LMMC (A y B) y a la clasificación de riesgo citogenético del IPSS (C y D) en LMMC-MD y LMMC-MP respectivamente.



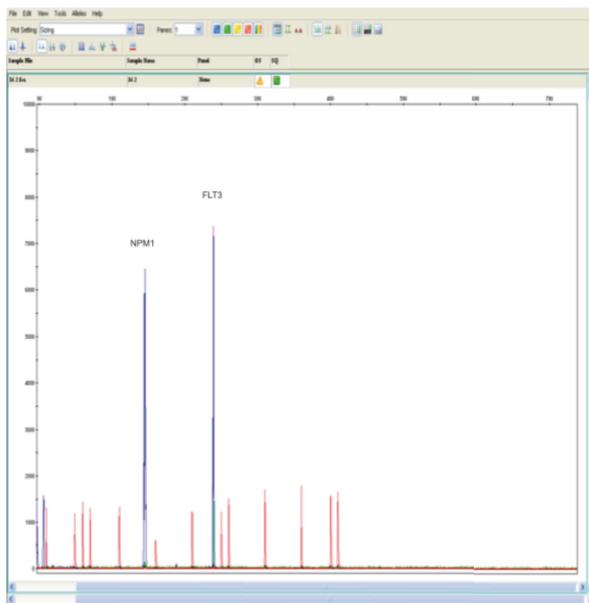
5.3 Alteraciones moleculares

5.3.1 *FLT3* y *NPM1*

Para determinar la frecuencia de mutaciones de los genes *FLT3* y *NPM1* en pacientes con LMMC se amplificó el DNA usando cebadores específicos marcados para ambos genes. El producto de PCR obtenido fue analizado simultáneamente mediante electroforesis capilar en el ABIPLISM 3130 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Todas las muestras se analizaron por duplicado.

No se encontraron mutaciones en *FLT3*-ITD/*NPM1* en ninguno de los 70 pacientes estudiados. En la Figura 11 se muestra una imagen de los resultados obtenidos, donde pueden observarse los alelos normales para ambos genes.

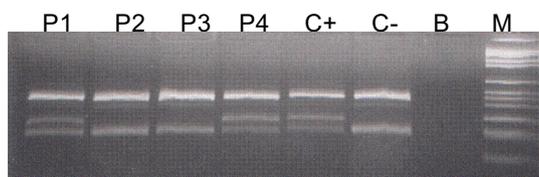
Figura 11. Análisis de fragmentos obtenidos mediante PCR múltiple de *NPM1* y *FLT3*. El tamaño del alelo normal de *NPM1* y *FLT3* son 236pb y 330pb, respectivamente.



5.3.2 JAK2

Se estudió la presencia del alelo *JAK2V617F* en las 70 muestras de LMMC. Seis de los pacientes (8%) resultaron positivos para el alelo mutado de forma heterocitogota (Figura 12). Dada la baja incidencia no se pudo establecer su implicación pronóstica.

Figura 12. Gel de agarosa donde se muestran dos pacientes positivos y dos negativos.



Abreviaturas: P, pacientes; C+, control positivo; C-, control negativo; B, Blanco; M, marcador de peso molecular

5.3.3 *c-FMS, FLT1, KDR, c-CBL, IDH1 e IDH2*

5.3.3.1 *c-FMS, FLT1, KDR y c-CBL*

Para determinar el posible potencial oncogénico de las mutaciones en los receptores tirosina-quinasa *c-FMS*, *FLT1* y *KDR* y en la actividad ubiquitín ligasa de *c-CBL* se secuenciaron los exones de interés en cada uno de los casos detallados en la Tabla 9.

Una vez obtenidos los cromatogramas mediante secuenciación directa, se compararon las secuencias con las proporcionadas por el “GeneBank Accesion number” y no se encontraron mutaciones en ninguno de los genes estudiados. Todas las secuencias se correspondieron con la secuencia normal de cada uno de los genes. Además no se encontró ningún polimorfismo en los

genes estudiados: *c-FMS*, *FLT1*, *KDR* y *c-CBL*. Esto se confirmó en la base de datos de SNP del “National Center for Biotechnology Information (NCBI)”.

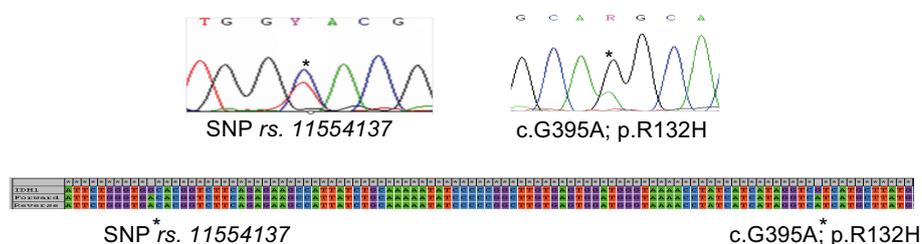
5.3.3.2 *IDH1* e *IDH2*

Se han estudiado mediante secuenciación directa la incidencia de las mutaciones R132 y R172 que afectan a *IDH1* e *IDH2* respectivamente.

De los 70 casos estudiados dos fueron no valorables. Dos de 68 pacientes (3%) resultaron positivos para el alelo mutado *IDH1* R132. Sin embargo, no se encontró ningún caso que presentara la mutación R172 en *IDH2*. Las mutaciones encontradas se trataban de p.Arg132His, el cambio más frecuente descrito que se produce por el cambio de base c.G395A (Figura 13).

Además, en 7/68 (10%) se observó la presencia del polimorfismo SNP rs11554137 (V71I) localizado en el codón 105 (GGC_GGT; *IDH1*105GGT) localizado en el mismo exón que las mutaciones que se han descrito hasta el momento en *IDH1* (Figura 13).

Figura 13. Cromatograma del gen *IDH1*



Se encuentra señalada la mutación R132H y el polimorfismo SNP rs11554137 localizado en el codón 105 (GGC_GGT; *IDH1*105GGT) obtenida en uno de los pacientes estudiados.

Este polimorfismo se presenta en torno al 7,5% de la población europea. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>). Un estudio a niveles de mRNA de *IDH1* demostró que los pacientes que presentaba el SNP en heterocigosis o en homocigosis tenían una expresión significativamente mayor de mRNA. El

aumento de expresión podría afectar a los niveles de proteína *IDH1* y, por consiguiente, al metabolismo intracelular de NADPH, lo que a su vez afectaría a diferentes rutas de la mielopoyesis (Wagner *et al.*, 2009).

Dado la baja frecuencia encontrada en nuestra serie no se han podido correlacionar las variaciones encontradas en la secuencia de *IDH1* con las características clínicas o biológicas de los pacientes estudiados.

5.3.4 Reordenamiento de los genes *PDGFRA* y *PDGFRB*

El estudio por FISH de reordenamientos de los genes *PDGFRA* y *PDGFRB* mostró que ninguno de los casos estudiados se encontró reordenado. Todos los casos mostraron un patrón normal con una doble señal de fusión. Variables pronósticas en LMMC.

5.4 Factores pronósticos en LMMC

5.4.1 Supervivencia global

Para determinar que factores de riesgos fueron predictivos tanto para muerte como para evolución a LMA se realizó un análisis univariante en la serie de 558 pacientes con cada una de las variables recogidas en el momento del diagnóstico.

5.4.1.1 Análisis univariante

Diferentes variables se asociaron una menor supervivencia global: la edad, el sexo, la clasificación OMS para LMMC y por tanto también los blastos en MO y en SP, la hemoglobina, el recuento de leucocitos, PMN y monocitos, los niveles de LDH y Ferritina en suero (aunque estos datos sólo se disponían de en un menor número de pacientes) y la dependencia transfusional al diagnóstico (Tabla 22).

Tabla 22. Asociación de las principales características de la serie con la supervivencia global.

Características	Supervivencia Global			P
	No. de pacientes (%)	Mediana (meses)	Vivos a los 5 años (%)	
Total	558 (100)			
Edad, años				.008
< 70	190 (34)	37	37	
> 70	207 (66)	28	27	
Sexo				.021
Hombre	377 (68)	29	28	
Mujer	181 (32)	42	36	
Clasificación OMS				< .001
LMMC 1	478 (86)	37	34	
LMMC 2	80 (14)	12	12	
Hemoglobina g/dL				< .001
< 10	190 (34)	18	16	
≥ 10	368 (66)	43	38	
Leucocitos, × 10⁹/L				< .001
< 13	338 (61)	44	42	
≥ 13	220 (39)	21	16	
Plaquetas, × 10⁹/L				.054
< 100	221 (40)	30	29	
≥ 100	337 (60)	36	32	
Neutrófilos, × 10⁹/L				.021
< 1.8	101 (18)	53	42	
≥ 1.8	457 (82)	29	29	
Monocitos, × 10⁹/L				= .001
< 3	234(57)	42	40	
≥ 3	182(43)	26	21	
Blastos en MO, %				< .001
< 5	347 (62)	36	34	
5 - 9	138 (25)	43	35	
10 - 19	73 (13)	11	10	
Blastos en SP				< .001
No	367 (77)	39	34	
Si	100 (21)	15	11	

Tabla 22 (continuación). Asociación de las principales características de la serie con la supervivencia global.

Características	Supervivencia Global			P
	No. de pacientes (%)	Mediana (meses)	Vivos a los 5 años (%)	
Total	558 (100)			
LDH, U/L				< .001
≤ 480	242 (68)	43	43	
> 480	115 (32)	20	11	
Ferritina, mg/dL				< .001
≤ 500 mg/dL	173 (80)	42	35	
> 500 mg/dL	43 (20)	20	16	
Dependencia transfusional				< .001
No	441 (79)	40	38	
Si	116 (21)	14	9	
Clasificación citogenética específica para LMMC				< .001
Bueno	429 (81)	39	36	
Intermedio	47 (9)	18	20	
Malo	56 (10)	12	7	

5.4.1.2 Análisis multivariante

Todas las variables estadísticamente significativas se incluyeron en el análisis. Cinco variables mantuvieron significación pronóstica en el análisis multivariante para supervivencia global: la Clasificación según la OMS, los leucocitos, la dependencia transfusional al diagnóstico, la nueva clasificación citogenética para LMMC y los niveles de LDH en suero (Tabla 23).

Tabla 23. Análisis multivariante para supervivencia global.

VARIABLES	HR (95% CI)	P
<i>Supervivencia Global</i>		
Leucocitos (</≥ 13 × 10 ⁹ /L)	1.730 (1.268 – 2.360)	P < .001
Categorías OMS	2.055 (1.402 – 3.012)	P < .001
Citogenética de LMMC	1.605 (1.259 – 2.047)	P < .001
Dependencia transfusional	1.904 (1.368 – 2.652)	P < .001
LDH en suero	2.197 (1.583 – 3.047)	P < .001

5.4.2 Riesgo de Evolución a LMA

5.4.2.1 Análisis univariante

5.4.2.1.1 Análisis mediante Kaplan Meier

En el análisis univariante de Kaplan-Meier las variables asociadas con un mayor riesgo de evolución a LMA fueron: la clasificación OMS y por tanto también los blastos en MO y en SP, la hemoglobina, la clasificación de la FAB, el recuento de PMN y monocitos, la dependencia transfusional al diagnóstico, la nueva clasificación citogenética para LMMC y los niveles de LDH y ferritina en suero (Tabla 24).

5.4.2.1.2 Análisis mediante riesgos competitivos

En el análisis univariante de incidencia acumulada de riesgo competitivo las variables asociadas con un mayor riesgo de evolución a LMA fueron: la edad, la clasificación OMS y por tanto también los blastos en MO y en SP, la clasificación de la FAB, la nueva clasificación citogenética para LMMC y los niveles de ferritina en suero (Tabla 24).

Tabla 24. Asociación de las principales características de la serie con el riesgo de evolución a LMA.

	N (%)	Evolución a LMA					
		Incidencia mediante Kaplan-Meier (%)			Incidencia acumulada mediante riesgo competitivo (%)		
		2 años	5 años	P	2 años	5 años	P
Total	558 (100)						
Edad, años				.071			.014
< 70	190 (34)	22	34		18	26	
> 70	207 (66)	15	25		11	17	
Sexo				.074			.190
Hombre	377 (68)	17	34		14	23	
Mujer	181 (32)	17	22		15	15	
Clasificación OMS				< .001			< .001
LMMC 1	478 (86)	13	25		11	18	
LMMC 2	80 (14)	47	54		32	35	
Hemoglobina g/dL				< .001			.065
< 10	190 (34)	29	40		21	26	
≥ 10	368 (66)	13	25		11	18	
Leucocitos, × 10⁹/L				< .001			.014
< 13	338 (61)	14	20		12	15	
≥ 13	220 (39)	23	49		17	28	
Plaquetas, × 10⁹/L				.850			.650
< 100	221 (40)	21	30		16	21	
≥ 100	337 (60)	15	28		13	21	
Neutrófilos, × 10⁹/L				.470			.931
< 1.8	101 (18)	20	24		13	21	
≥ 1.8	457 (82)	17	31		18	21	
Monocitos, × 10⁹/L				.068			.341
< 3	234(57)	14	20		11	16	
≥ 3	182(43)	17	34		13	21	
Blastos en MO, %				< .001			< .001
< 5	347 (62)	12	26		10	18	
5 - 9	138 (25)	16	24		14	19	
10 - 19	73 (13)	49	58		34	36	

Tabla 24 (continuación). Asociación de las principales características de la serie con el riesgo de evolución a LMA.

	N (%)	Evolución a LMA					
		Incidencia mediante Kaplan-Meier (%)			Incidencia acumulada mediante riesgo competitivo (%)		
		2 años	5 años	P	2 años	5 años	P
Total	558 (100)						
Blastos en SP				< .001			.005
No	367 (77)	12	25		10	18	
Si	100 (21)	39	48		26	30	
LDH, U/L				.456			.451
≤ 480	242 (68)	14	25		12	20	
> 480	115 (32)	14	25		11	15	
Ferritina, mg/dL				< .001			.014
≤ 500 mg/dL	173 (80)	10	15		8	12	
> 500 mg/dL	43 (20)	30	48		23	28	
Dependencia transfusional				< .001			.222
No	441 (79)	14	25		12	19	
Si	116 (21)	32	47		21	26	
Clasificación citogenética para LMMC				< .001			< .001
Bueno	429 (81)	12	24		11	18	
Intermedio	47 (9)	31	45		25	29	
Malo	56 (10)	56	67		38	41	

5.4.2.2 Análisis multivariante

5.4.2.2.1 Análisis mediante Regresión de Cox

Las variables que mantuvieron significado pronóstico en el análisis multivariante fueron: el recuento de leucocitos, la clasificación según la OMS, la nueva clasificación citogenética para LMMC y la dependencia transfusional al diagnóstico (Tabla 25).

5.4.2.2.2 Análisis mediante el test de "Fine and Gray"

Las variables que mantuvieron significado pronóstico en el análisis multivariante de incidencia acumulada de evolución a LMA fueron: la clasificación según la OMS y la nueva clasificación citogenética para LMMC (Tabla 25).

Tabla 25. Análisis multivariante del riesgo de evolución a LMA.

Variabes	HR (95% CI)	P
<i>Evolución a LMA mediante regresión de Cox</i>		
Leucocitos (</≥ 13 × 10 ⁹ /L)	2.483 (1.414 – 4.359)	P = .001
Categorías OMS	2.520 (1.243 – 5.107)	P < .001
Citogenética de LMMC	2.158 (1.459 – 3.191)	P < .001
Dependencia transfusional	2.051 (1.096 – 3.837)	P = .025
<i>Evolución a LMA mediante test de Fine and Gray</i>		
Categorías OMS	2.23 (1.38 – 3.60)	P = .001
Citogenética de LMMC	1.54 (1.17 – 2.03)	P = .002

5.4.3 Propuesta de un nuevo índice pronóstico (CPSS)

Con todos los datos anteriores se construyó un índice pronóstico de supervivencia libre de evento específico para LMMC (CPSS, CMML-specific Prognostic Scoring System). Se seleccionaron las cuatro variables con significado pronóstico independiente tanto para supervivencia global como para transformación a LMA. Se asignó el mismo valor a cada una de las variables basándonos en la similitud de los coeficientes de regresión del modelo proporcional de Cox (Hazards Ratio, HR) obtenido en el análisis multivariante: 1 punto para LMMC-2, 1 punto para leucocitos ≥ 13 × 10⁹/L, 1 punto para el transfusión-dependiente, 1 punto para el grupo de riesgo intermedio citogenético y 2 puntos para el grupo de alto riesgo citogenético (Tabla 26).

Los niveles de LDH al diagnóstico finalmente no se incluyeron en el índice pronóstico porque no mantuvieron su significación para la evolución a LMA. Sin embargo, cabe destacar que la LDH > 480UI/L permitió dividir el grupo intermedio en dos grupos con diferente pronóstico para supervivencia global

(mediana de supervivencia global de 30 meses vs. 20 meses para $\leq 480\text{UI/L}$ y $> 480\text{UI/L}$, respectivamente, ($P < .001$).

Tabla 26. Puntuación de los factores de riesgo según el nuevo CPSS.

Puntuación	0	1	2
Categorías OMS	LMMC-1	LMMC-2	
Leucocitos	$< 13 \times 10^9/\text{L}$	$\geq 13 \times 10^9/\text{L}$	
Dependencia transfusional	No dependiente	Dependiente	
Categoría citogenética de LMMC	Bajo riesgo	Riesgo intermedio	Alto riesgo

El índice pronóstico se calculó posteriormente sumando el número de puntos correspondiente a cada factor de riesgo. De acuerdo a este criterio los pacientes se dividieron en 6 grupos, desde 0 a 5 puntos. Mediante un análisis univariante se obtuvo la supervivencia estimada para cada subgrupo. Mediante el estudio de los grupos dos a dos se establecieron cuatro grupos de riesgo con diferentes pronósticos significativos: un grupo de bajo riesgo (0 puntos), un grupo de riesgo intermedio-1 (1 punto), un grupo de riesgo intermedio-2 (2 y 3 puntos), y un grupo de alto riesgo (4 y 5 puntos) (Tabla 27).

Tabla 27. Grupos de riesgo según la puntuación obtenida en el nuevo índice pronóstico.

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

5.4.3.1 Supervivencia global según el CPSS

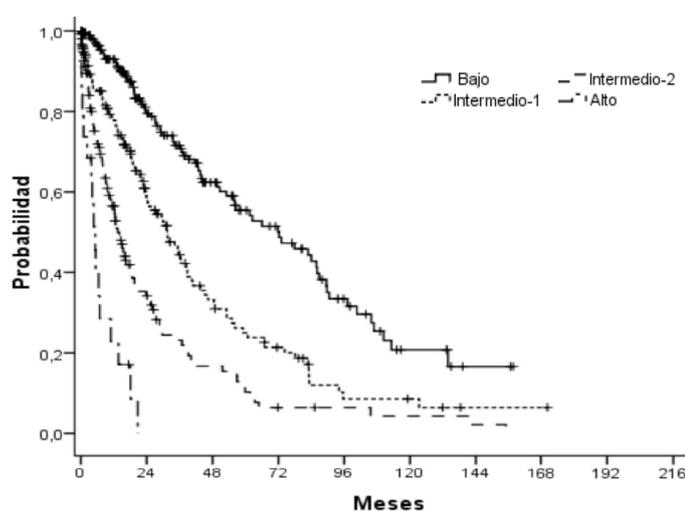
La clasificación de la serie según de acuerdo a los grupos de riesgo del CPSS resultó en un 41% de los pacientes en el grupo de bajo riesgo, un 29% en

el grupo de riesgo intermedio-1, un 26% en el grupo de riesgo intermedio-2 y un 4% en el grupo de alto riesgo con diferentes probabilidades de muerte: mediana de supervivencia global de 72, 31, 13 y 5 meses, respectivamente; $P < .001$ (Tabla 28 y Figura 14). Además estas diferencias mantuvieron su significación cuando se analizaron las diferencias entre grupos de riesgo por parejas.

Tabla 28. Supervivencia global de las categorías del riesgo pronósticos del CPSS.

Supervivencia Global				
CPSS	N (%)	Mediana (meses)	Vivos a los 5 años (%)	P
Categorías de riesgo				< .001
Bajo	217 (41)	72	55	
Intermedio-1	155 (29)	31	25	
Intermedio-2	141 (26)	13	10	
Alto	19 (4)	5	0	

Figura 14. Supervivencia global de acuerdo a CPSS.



5.4.3.2 Riesgo de evolución a LMA según el CPSS

5.4.3.2.1 Análisis univariante mediante Kaplan Meier

De acuerdo al CPSS, las diferencias en las tasas de evolución a LMA fueron del 7, 14, 37 y 100% respectivamente a los 2 años, $P < .001$. Además estas diferencias mantenían su significación cuando se analizaban las diferencias entre grupos de riesgo por parejas (Tabla 29 y Figura 15).

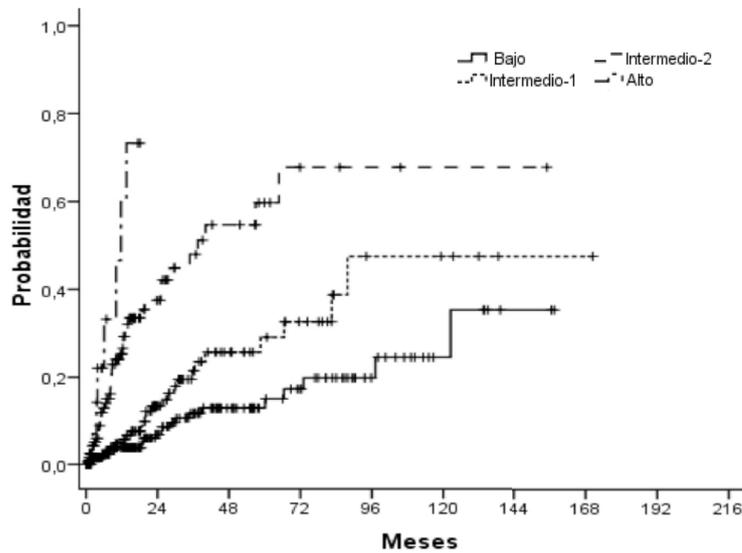
5.4.3.2.2 Análisis univariante mediante riesgo competitivo

Mediante el análisis de incidencia acumulada de riesgo competitivo se observaron también diferencias significativas entre los grupos de riesgo del CPSS. Las tasas de evolución a LMA en este caso fueron de 6%, 11%, 27% y 39% respectivamente a los 2 años, $P < .001$ (Tabla 29).

Tabla 29. Riesgo de evolución a LMA según el CPSS. Serie de desarrollo.

CPSS	Incidencia mediante Kaplan Meier (%)			Incidencia acumulada mediante riesgo competitivo (%)		
	2 años	5 años	<i>P</i>	2 años	5 años	<i>P</i>
Categorías de riesgo			< .001			< .001
Bajo	7	13		6	11	
Intermedio-1	14	29		11	19	
Intermedio-2	37	60		27	36	
Alto	73	73		39	39	

Figura 15. Riesgo de evolución a LMA de acuerdo al CPSS.



5.5 Serie validación

Para validar el nuevo CPSS dispusimos de una serie independiente. Se seleccionaron un total de 264 pacientes con diagnóstico de LMMC de novo procedentes del Heinrich-Heine-University Hospital y de la Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo según los mismos criterios de inclusión que la serie de desarrollo. Las principales características de los pacientes en el momento del diagnóstico se pueden observar en la Tabla 30.

Esta serie de validación presentó las siguientes características: un 80% de los pacientes fueron mayores de 60 años y 191 (70%) pacientes fueron hombres. La mediana de supervivencia global fue de 25 meses y el riesgo de evolución a LMA a los 2 años fue del 35%. De acuerdo a la clasificación de la FAB (leucocitos \leq $13 \times 10^9/L$) 138 pacientes (50%) fueron LMMC-MD y 136 pacientes (50%) fueron LMMC-MP. Según la clasificación de la OMS 218 pacientes (80%) fueron del subtipo LMMC-1 y 56 pacientes (20%) eran LMMC-2. La nueva clasificación citogenética estratificó estos pacientes en los tres grupos de riesgo de la siguiente forma: 146 (63%) en el bajo riesgo, 41 (18%) en el riesgo intermedio y 45 (19%) en el alto riesgo. Sesenta y nueve de los 274 pacientes (25%) presentaron dependencia transfusional al diagnóstico. En la

Resultados

tabla 30 se pueden observar las principales diferencias entre las series de desarrollo y validación.

Tabla 30. Tabla comparativa de las principales características de la serie de desarrollo y de validación.

Características	Serie de desarrollo		Serie de Validación		
	Mediana (extremos)	N (%)	Mediana (extremos)	N (%)	
Total		558(100)		274(100)	
Edad	73 (19 – 99)		70 (41 – 98)		< .001^a
≤ 60		61 (11)		55 (20)	
61 - 70		135 (24)		105 (38)	< .001^b
>70		362 (65)		114 (42)	
Sexo					
Hombre		377 (68)		191 (70)	.532 ^c
Mujer		181 (32)		83 (30)	
Clasificación OMS					
CMML-1		478 (86)		218 (80)	.025^b
CMML-2		80 (14)		56 (20)	
Hemoglobina	11 (1 – 19)		11 (2 – 17)		.224 ^a
< 10 g/dL		190 (34)		101 (37)	.479 ^c
≥ 10 g/dL		368 (66)		173 (63)	
Leucocitos	10 (1 – 156)		13 (1 – 150)		.143 ^a
< 13× 10 ⁹ /L		338 (61)		138 (50)	.005^c
≥ 13× 10 ⁹ /L		220 (39)		136 (50)	
Plaquetas	123 (4 – 928)		105 (1 – 979)		.091 ^a
< 100×10 ⁹ /L		221 (40)		132 (48)	.019^c
≥100 ×10 ⁹ /L		337 (60)		142 (52)	
PMN	4.2 (0.1 – 73.9)		6.3 (0.1 – 75.0)		.018^a
< 1.8 ×10 ⁹ /L		103 (18)		41 (15)	.218 ^c
≥ 1.8 ×10 ⁹ /L		455 (82)		232 (85)	

^a Mann-Whitney U-test.; ^b χ^2 -test. ^c Fisher's exact test.

Tabla 30 (continuación). Tabla comparativa de las principales características de la serie de desarrollo y de validación.

Características	Serie de desarrollo		Serie de Validación		
	Mediana (extremos)	N (%)	Mediana (extremos)	N (%)	
Total		558(100)		274(100)	
Monocitos	2.6 (1.1 – 40.9)		6.4 (1.1 – 75.0)		< .001 ^a
< 3.0 ×10 ⁹ /L		236 (57)		128 (47)	.010 ^c
≥ 3.0 ×10 ⁹ /L		180 (43)		146 (53)	
Blastos en SP					
No		367 (79)		193 (70)	.013 ^c
Si		100 (21)		81 (30)	
Blastos en MO	3 (0 – 19)		6 (0 – 19)		< .001 ^a
< 5%		347 (62)		116 (42)	< .001 ^b
5 – 9%		138 (25)		103 (38)	
10 – 19%		73 (13)		55 (20)	
LDH	394 (104 – 2976)		277 (97 – 7743)		< .001 ^a
≤ 480 UI/L		242 (68)		94 (46)	< .001 ^c
> 480 UI/L		115 (32)		10 ⁹ (54)	
Ferritina	170 (6 – 4000)		318 (58 – 2010)		.001 ^a
≤ 500 mg/dL		173 (80)		73 (63)	< .001 ^c
> 500 mg/dL		43 (20)		43 (37)	
Dependencia transfusional					
No		441 (79)		205 (75)	.156 ^c
Si		116 (21)		69 (25)	
Riesgo citogenético específico para LMMC					
Bueno		429 (81)		146 (63)	< .001 ^b
Intermedio		47 (9)		41 (18)	
Malo		56 (10)		45 (19)	

^a Mann-Whitney U-test.; ^b χ^2 -test. ^c Fisher's exact test.

Cuando se compararon las características clínico-biológicas entre las series se observaron diferencias entre el porcentaje de blastos en MO ($P < .001$),

en la presencia de blastos en SP ($P = .012$), y consecuentemente en la clasificación de la OMS ($P = .025$), en el recuento de leucocitos ($P = .005$), en el recuento de plaquetas ($P = .019$), en el recuento de monocitos ($P = .010$), en los niveles de LDH en suero ($P < .001$), en los niveles de ferritina ($P < .001$), en la distribución de los pacientes en los grupos de riesgos citogenéticos ($P < .001$). Además, se observó una mayor frecuencia de evolución a LMA, la serie de validación presentó una frecuencia más alta de transformación a LMA a los 5 años (29% vs. un 45% en la serie de desarrollo vs. la serie de validación, respectivamente, $P < .001$). Sin embargo, las medias de supervivencia global eran comparables en ambas series (31 meses en la serie de desarrollo vs. 25 meses en la serie de validación, $P = .231$).

Con el fin de intentar explicar estas diferencias en la tasa de evolución a LMA entre las dos series, se seleccionaron en la serie de desarrollo los pacientes que provenían de hospitales de tercer nivel. Cuando se comparó este subgrupo de pacientes con la serie de validación, las medianas de evolución a LMA fueron comparables (39% en el subgrupo de pacientes de hospitales de 3er nivel vs. 45% en la serie de validación, $P = 0.52$). No se observaron otras diferencias entre ambas series.

5.5.1 Validación del nuevo índice pronóstico (CPSS)

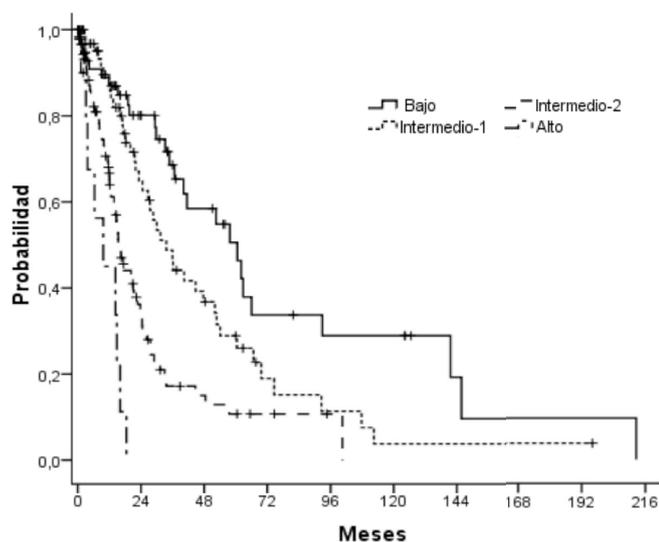
5.5.1.1 Supervivencia global

De acuerdo al nuevo CPSS los pacientes se asignaron en los cuatro grupos de riesgo del siguiente modo: 26% dentro del grupo de bajo riesgo, 31% en el grupo de riesgo intermedio-1, un 39% en el grupo de riesgo intermedio-2, y un 4% en el grupo de alto riesgo. La distribución de los pacientes fue similar a la serie de desarrollo ($P = .176$). Los pacientes de las cuatro categorías presentaron diferencias significativas en las medianas de supervivencia global: 61 meses para el bajo riesgo, 34 meses para el grupo de riesgo intermedio-1, 15 meses para el grupo de riesgo intermedio-2 y 9 meses para el alto riesgo, $P < .001$ (Tabla 31 y Figura 16). Las comparaciones entre grupos por parejas mantuvieron la significación estadística.

Tabla 31. Supervivencia global según el CPSS. Serie de validación.

Cohorte de validación	N (%)	Mediana (meses)	Vivos a los 5 años (%)	P
Categorías de riesgo				< .001
Bajo	60 (26)	61	51	
Intermedio-1	71 (31)	34	29	
Intermedio-2	90 (39)	15	11	
Alto	10 (4)	9	0	

Figura 16. Supervivencia global de acuerdo al CPSS. Serie de validación.



5.5.1.2 Riesgo de evolución a LMA

5.5.1.2.1 Análisis univariante mediante Kaplan-Meier

En cuanto al riesgo de evolución a LMA, de acuerdo al CPSS el porcentaje de riesgo acumulado a los 2 años fue del 8% para el bajo riesgo, del 25% para el grupo de riesgo intermedio-1, del 49% para el grupo de riesgo intermedio-2 y del 100% para el grupo de alto riesgo, $P < .001$ (Tabla 32 y Figura 17). Las comparaciones por parejas mantuvieron la significación estadística

entre todos los grupos exceptuando los grupo de riesgo Intermedio-1 e Intermedio-2 que mostró una tendencia a la significación ($P = .064$).

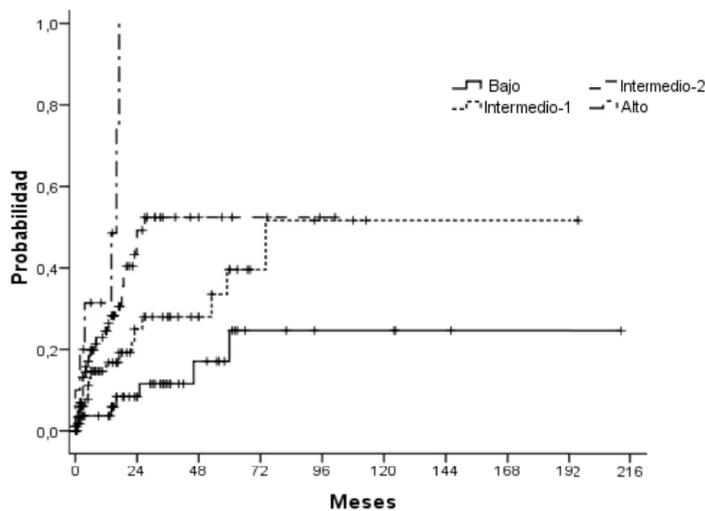
5.5.1.2.2 *Análisis univariante mediante riesgo competitivo*

Mediante el análisis de incidencia acumulada de riesgo competitivo se observaron también diferencias significativas entre los grupos de riesgo del CPSS ($P < .001$). Sin embargo, no hay diferencias de riesgo de evolución a LMA entre los grupos intermedio-2 y alto riesgo (Tabla 32).

Tabla 32. Riesgo de evolución a LMA según el CPSS. Serie de validación.

CPSS	Incidencia mediante Kaplan Meier (%)			Incidencia acumulada mediante riesgo competitivo (%)		
	2 años	5 años	P	2 años	5 años	P
Categorías de riesgo	< .001			< .001		
Bajo	8	25		8	18	
Intermedio-1	25	40		23	30	
Intermedio-2	49	52		41	43	
Alto	100	100		41	43	

Figura 17. Riesgo de evolución a LMA de acuerdo al CPSS. Serie de validación.



5.6 Comparación con otros sistemas pronósticos

Hasta el momento se han descrito diversos índices pronósticos, todos ellos capaces de predecir el curso de la enfermedad en pacientes con LMMC y separando significativamente distintos grupos de riesgo. Hemos aplicado los índices pronósticos más relevantes (Bournemouth modificado, Español-2002, Düsseldorf e IPSS) a las dos cohortes de pacientes con el fin de conocer cuál de ellos presentaba una mayor potencia estadística. Los parámetros utilizados para estratificar los pacientes según los distintos sistema pronóstico se detallan en la Tabla 33.

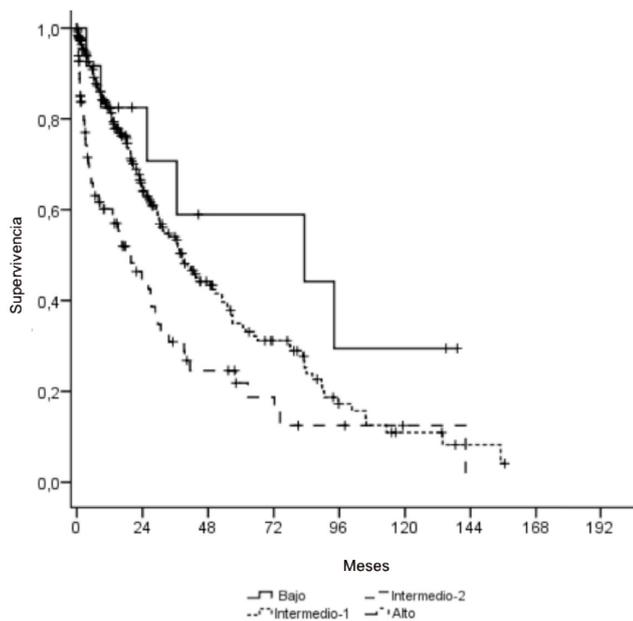
Tabla 33. Variables para la clasificación de los diferentes índices pronósticos descritos para LMMC.

BOURNEMOUTH		DÜSSELDORF		ESPAÑOL		IPSS	
Factores de riesgo							
Hb <10 g/dL	1	Hb <9 g/dL	1	LDH > 1,5 ULN	1	Citopenias 2/3	0.5
PMN < 2,5x10 ⁹ /L or > 16x10 ⁹ /L	1	LDH elevada (200 UI)	1	WCB > 10x10 ⁹ /L	1	Citogenética: Intermedio	0.5
Plaquetas < 100x10 ⁹ /L	1	Plaquetas < 100 x 10 ⁹ L	1	Blastos MO >5%	1	Citogenética: Malo	1
Blastos MO > 5%	1	Blastos MO > 5%	1			Blastos MO 5 – 10%	0.5
						Blastos MO 11 – 19%	1.5
Grupos de riesgo							
Bajo: 0 - 1		Bajo: 0		Bajo: 0		Bajo: 0	
		Intermedio-1: 1 - 2				Interm-1: 0,5 – 1,0	
						Interm-2: 1,5 – 2,0	
Alto: 2 - 4		Alto: 3 - 4		Alto: 3 - 4		Alto: ≥ 2.5	

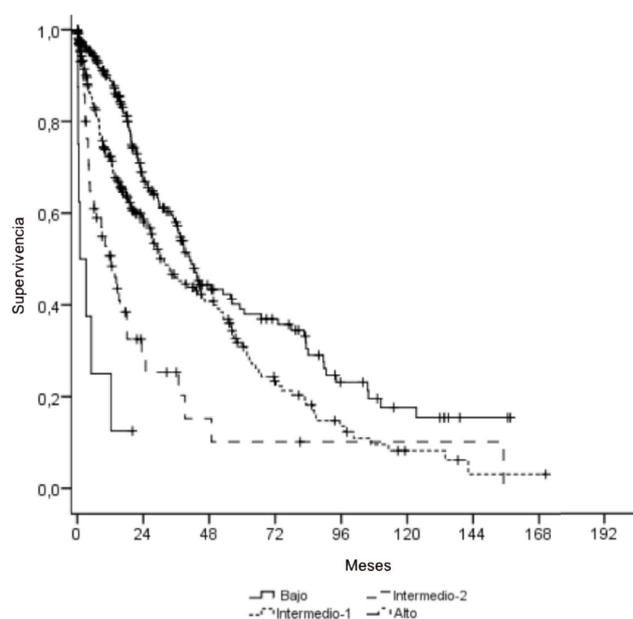
Todos los sistemas pronósticos fueron diseñados para separar al menos dos grupos de riesgo estadísticamente significativos (Tabla 33). Sin embargo, los que mostraban tres o más grupos de riesgo no mostraron diferencias significativas al comparar los grupos de riesgo entre sí (Fig. 18-19):

- El índice pronóstico de Düsseldorf permitió separar tres grupos de riesgo para supervivencia global pero en el caso de la evolución a LMA sólo encontramos diferencias significativas entre los grupos de Bajo y Alto riesgo en ambas series. (Figura 18).

Figura 18. Supervivencia global en la serie de desarrollo según el índice pronóstico de Düsseldorf.



- El IPSS permitió separar cuatro grupos de riesgo para supervivencia global en ambas series pero para predecir la evolución a LMA no se encontraron diferencias entre los grupos de riesgo bajo e intermedio-1 ($P = .090$ en la serie de desarrollo y $P = .071$ en la serie de validación) ni entre los grupos intermedio-2 y alto riesgo ($P = .142$ en la serie de desarrollo y $P = .318$ en la de validación; (Figura 19).

Figura 19. Supervivencia global en la serie de desarrollo según el IPSS.

Con el fin de conocer cuál de ellos era capaz de predecir mejor tanto la supervivencia global como el riesgo de evolución a LMA se aplicó el test de Estimación de la Probabilidad de Concordancia (CPE, concordance probability estimation, Gonen and Heller. 2005) en cada índice pronóstico. Como podemos observar en la Tabla 33, todos ellos presentaron un valor de CPE superior a 0.5 (valor considerado dintel de discriminación), pero sólo el IPSS y el nuevo CPSS alcanzaban valores próximos a 0.7. Estos datos hay que tenerlos en cuenta en combinación con la capacidad de predecir varios grupos de riesgo significativamente distintos entre ellos, y en este caso sólo el CPSS lo conseguía tanto para supervivencia global como para evolución a LMA (Tabla 34).

Tabla 34. Supervivencia global y riesgo de evolución a LMA de acuerdo a los diferentes índices pronósticos descritos para LMMC en la serie de desarrollo y en la serie de validación.

Serie de desarrollo				
Índice Pronóstico	Mediana (meses)	Long rank <i>P</i>	Evolución a LMA 2 años (%)	Long rank <i>P</i>
GESMD		CPE = 0.658		CPE = 0.694
Bajo	72	Bajo vs. Interm-1, <i>P</i> < .001; Bajo vs. Interm-2, <i>P</i> < .001; Bajo vs. Alto, <i>P</i> < .001; Interm-1 vs. Interm-2, <i>P</i> < .001; Interm-1 vs. Alto, <i>P</i> < .001; Interm-2 vs. Alto, <i>P</i> < .001.	7	Bajo vs. Interm-1, <i>P</i> = .023; Bajo vs. Interm-2, <i>P</i> < .001; Bajo vs. Alto, <i>P</i> < .001; Interm-1 vs. Interm-2, <i>P</i> < .001; Interm-1 vs. Alto, <i>P</i> < .001; Interm-2 vs. Alto, <i>P</i> = .015.
Interm-1	31		14	
Interm-2	13		37	
Alto	5		73	
BOURNEMOUTH modificado		CPE = 0.573		CPE = 0.593
Bajo	42	Bajo vs. Alto, <i>P</i> < .001.	10	Bajo vs. Alto, <i>P</i> < .001.
Alto	22		27	
DÜSSELDORF		CPE = 0.563		CPE = 0.595
Bajo	83	Bajo vs. Interm, <i>P</i> = .162; Bajo vs. Alto, <i>P</i> < .001; Interm vs. Alto, <i>P</i> = .028.	17	Bajo vs. Interm, <i>P</i> = .386; Bajo vs. Alto, <i>P</i> = .001; Interm vs. Alto, <i>P</i> = .077.
Interm	38		10	
Alto	15		35	
ESPAÑOL		CPE = 0.574		CPE = 0.594
Bajo	43	Bajo vs. Alto, <i>P</i> < .001.	11	Bajo vs. Alto, <i>P</i> < .001.
Alto	18		28	
IPSS		CPE = 0.597		CPE = 0.636
Bajo	41	Bajo vs. Interm-1, <i>P</i> = .002; Bajo vs. Interm-2, <i>P</i> < .001; Bajo vs. Alto, <i>P</i> < .001; Interm-1 vs. Interm-2, <i>P</i> = .001; Interm-1 vs. Alto, <i>P</i> < .001; Interm-2 vs. Alto, <i>P</i> = .018.	9	Bajo vs. Interm-1, <i>P</i> = .090; Bajo vs. Interm-2, <i>P</i> < .001; Bajo vs. Alto, <i>P</i> < .001; Interm-1 vs. Interm-2, <i>P</i> = .001; Interm-1 vs. Alto, <i>P</i> < .001; Interm-2 vs. Alto, <i>P</i> = .142.
Interm-1	31		18	
Interm-2	12		50	
Alto	1		73	

Tabla 34 (continuación). Supervivencia global y riesgo de evolución a LMA de acuerdo a los diferentes índices pronósticos descritos para LMMC en la serie de desarrollo y en la serie de validación.

Serie de validación				
Índice Pronóstico	Mediana (meses)	Long rank <i>P</i>	Evolución a LMA 2 años (%)	Long rank <i>P</i>
GESMD		CPE = 0.653		CPE = 0.668
Bajo	61	Bajo vs. Interm-1, <i>P</i> = .013; Bajo vs. Interm-2, <i>P</i> < .001;	8	Bajo vs. Interm-1, <i>P</i> = .034; Bajo vs. Interm-2, <i>P</i> < .001; Bajo vs. Alto, <i>P</i> < .001; Interm-1 vs. Interm-2, <i>P</i> = .041; Interm-1 vs. Alto, <i>P</i> < .001; Interm-2 vs. Alto, <i>P</i> = .021.
Interm-1	31		25	
Interm-2	15		49	
Alto	9	Bajo vs. Alto, <i>P</i> < .001; Interm-1 vs. Interm-2, <i>P</i> = .001; Interm-1 vs. Alto, <i>P</i> < .001; Interm-2 vs. Alto, <i>P</i> = .009.	100	
BOURNEMOUTH modificado		CPE = 0.554		CPE = 0.587
Bajo	35	Bajo vs. Alto, <i>P</i> = .008.	33	Bajo vs. Alto, <i>P</i> = .003.
Alto	20		44	
DÜSSELDORF		CPE = 0.558		CPE = 0.588
Bajo	12	Bajo vs. Interm, <i>P</i> = .239; Bajo vs. Alto, <i>P</i> = .583; Interm-1 vs. Alto, <i>P</i> < .001.	26	Bajo vs. Interm, <i>P</i> = .731; Bajo vs. Alto, <i>P</i> = .351; Interm-1 vs. Alto, <i>P</i> = .002.
Interm	31		27	
Alto	15	50		
ESPAÑOL		CPE = 0.559		CPE = 0.533
Bajo	31	Bajo vs. Alto, <i>P</i> = .006.	29	Bajo vs. Alto, <i>P</i> = .310.
Alto	16		41	
IPSS		CPE = 0.636		CPE = 0.700
Bajo	40	Bajo vs. Interm-1, <i>P</i> = .063; Bajo vs. Interm-2, <i>P</i> < .001; Bajo vs. Alto, <i>P</i> < .001; Interm-1 vs. Interm-2, <i>P</i> = .001; Interm-1 vs. Alto, <i>P</i> < .001; Interm-2 vs. Alto, <i>P</i> = .052.	9	Bajo vs. Interm-1, <i>P</i> = .071; Bajo vs. Interm-2, <i>P</i> < .001; Bajo vs. Alto, <i>P</i> < .001; Interm-1 vs. Interm-2, <i>P</i> = .001; Interm-1 vs. Alto, <i>P</i> < .001; Interm-2 vs. Alto, <i>P</i> = .318.
Interm-1	29		21	
Interm-2	15		68	
Alto	4	67		

6. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio muestran las principales características clínico-biológicas de la LMMC y propone una nueva clasificación de riesgo citogenético y un nuevo índice de estratificación pronóstica con las cuatro variables que mostraron tener un valor pronóstico independiente en la progresión y supervivencia de estos pacientes (la clasificación OMS, los leucocitos, la dependencia transfusional al diagnóstico y las categorías de riesgo citogenético). Además, analiza varios genes que pueden estar involucrados en la leucemogénesis de la LMMC mediante secuenciación de los exones más relacionados con su actividad tirosina-quinasa. El conocimiento de los factores pronósticos creemos que pueden ser determinantes para seleccionar el tratamiento más apropiado en el paciente individual.

El estudio se planteó en dos vertientes, un análisis de los factores clínico-biológicos y citogenéticos en una serie de 558 pacientes del registro del GESMD y la validación de los resultados en una serie independiente, y un estudio de mutaciones de una selección de genes escasamente estudiados en LMMC en un subgrupo de 77 pacientes de los que se disponía material biológico.

6.1 Factores clínico-biológicos y citogenéticos

Siendo evidente que el estudio presenta algunas debilidades metodológicas inherentes a los estudios de cohortes históricas y de registros multinstitucionales, por otro lado denominador común a la práctica totalidad de los estudios de caracterización de la LMMC en la literatura, no es menos cierto que es la serie más amplia analizada hasta el momento, lo que le confiere cierta robustez a los resultados obtenidos. La ligera mayor incidencia de la variante mielodisplásica de LMMC encontrada en nuestra serie en comparación con otras en la literatura (Germing *et al.*, 2004) podría deberse a un sesgo de selección inherente a la configuración del registro del GESMD. Aun así, la proporción LMMC-MD:LMMC-MP varía entre unas series y otras de 1:1 (Onida *et al.*, 2002) a 1:1,5 (Germing *et al.*, 2004) a 1,5:1 en nuestra serie.

En relación con las características de nuestra serie, observamos que, en comparación con la LMMC-MD, los pacientes con LMMC-MP presentaron además de una mayor monocitosis y neutrofilia, consustanciales con su definición, mayor anemia, mayor presencia de blastos en SP y niveles más altos

de LDH en suero, también explicables por la mayor actividad proliferativa. Asimismo, en comparación con la LMMC-1 (OMS), en la LMMC-2 también observamos una mayor monocitosis, mayor anemia y trombopenia y niveles más elevados de LDH, probablemente ligados tanto al componente mieloproliferativo como a la ocupación medular y su consecuencia en un síndrome de insuficiencia medular.

Entre las características biológicas de la LMMC, las alteraciones citogenéticas merecen una mención especial. A este respecto, destacar que la incidencia de las alteraciones citogenéticas en LMMC publicadas hasta el momento han sido muy variadas. En general, la incidencia de alteraciones citogenéticas está en torno al 25% (extremos 11 – 42%) y en nuestra serie ha representado un 27%. El tipo de las alteraciones encontradas no son específicas para la LMMC y se encuentran comúnmente en otros subtipos de SMD y LMA (Solé *et al.*, 2005; Germing *et al.*, 2004 y Hasse *et al.*, 2007). Las anomalías más frecuentes son la trisomía 8, el cariotipo complejo y las alteraciones en el cromosoma 7 (Solé *et al.*, 2005; Onida *et al.*, 2002; Germing *et al.*, 2004). Otras menos frecuentes que también se han descrito son las trisomías 21 (Solé *et al.*, 2005), las deleciones de 20q (Hasse *et al.*, 2007) y los cariotipos hiperdiploides (Fenaux *et al.*, 1998). En el presente estudio, también las trisomías del cromosoma 8, las alteraciones del cromosoma 7 y el cariotipo complejo, junto con la pérdida aislada del cromosoma Y, fueron las más prevalentes. No obstante, las frecuencias de las alteraciones del cromosoma 7 y de los cariotipos complejos fueron inferiores a las publicadas en la mayoría de las series anteriormente mencionadas. En el caso concreto de las alteraciones del cromosoma 7, la incidencia fue similar a la serie global de los SMD del GESMD (Córdoba *et al.*, 2011), estando en torno al 5%, mientras que en las series de SMD previamente publicadas oscila entre el 11% y el 21% (Greenberg *et al.*, 1997; Solé *et al.*, 2005 y Hasse *et al.*, 2007). Esta diferencia podría deberse en primer lugar a que, siguiendo los actuales criterios de la OMS, nuestra serie solo incluyó pacientes con menos de 20% de blastos en MO, restringiéndose el estudio de una población en la que la incidencia de estas alteraciones puede ser mayor (pacientes con más de 20% y menos del 30%) (Groupe Français de Cytogénétique Hématologique. 1991) y en segundo lugar, a que, a diferencia de otros estudios, en el nuestro el cariotipo se realizó en el momento del diagnóstico

(Onida *et al.*, 2002 y Ngo *et al.*, 2008). Otro hallazgo de interés de nuestro estudio que no ha sido previamente analizado es la proporción de pacientes con alteraciones citogenéticas en los subtipos FAB y OMS de LMMC. Así, encontramos que la incidencia de alteraciones cromosómicas en la LMMC-MD fue similar a la LMMC-MP, mientras que ésta fue significativamente superior en la LMMC-2 comparado con la LMMC-1. Como en los SMD en general, esta mayor incidencia podría estar relacionada con la mayor proporción de blastos de la LMMC-2. La relación entre las alteraciones cromosómicas y una mayor incidencia de rasgos displásicos, especialmente la observada en relación con la diseritropoyesis y disgranulopoyesis, merecería una investigación adicional que se escape a los propósitos de este proyecto de tesis.

La observación de un curso clínico variable en la LMMC ha sido el estímulo para la investigación de factores pronósticos en esta peculiar variedad de SMD, hoy considerada un grupo de enfermedades fronterizas entre los SMD y los SMP. Aunque este asunto ha sido objeto de diversas aportaciones en la literatura, la principal aportación de nuestro estudio es la inclusión de la citogenética al estudio de los factores pronósticos de la LMMC y su valor relativo con respecto a otras variables relacionadas con el paciente y con su enfermedad.

A nuestro conocimiento, sólo el grupo del MD Anderson Cancer Center se ha ocupado de evaluar la relación entre las alteraciones citogenéticas en la LMMC con la supervivencia (Onida *et al.*, 2002 y Braun *et al.*, 2007). En estos estudios, como en el nuestro, los pacientes con LMMC que presentaron un cariotipo alterado tuvieron una supervivencia mas corta que los que tenían un cariotipo normal. Sin embargo, a diferencia de nuestro estudio, no pudieron demostrar un valor pronóstico independiente de la citogenética. Aunque existen más trabajos que relacionan la citogenética con la supervivencia de la LMMC, los pacientes con esta enfermedad fueron estudiados junto a otros subgrupos de SMD (Haase *et al.*, 2009), excluyeron los pacientes de LMMC-MP (Greenberg *et al.*, 1997) o se analizaron junto a SMD secundarios. (Kartarjian *et al.*, 2008).

En este estudio se ha podido identificar un subgrupo de pacientes con cariotipo complejo o trisomía del cromosoma 8 con una supervivencia mucho menor que el resto, y que pueden identificarse como alteraciones citogenéticas de alto riesgo. De igual modo, los pacientes con anomalías en el cromosoma 7 presentaron una menor supervivencia global y un mayor riesgo de evolución a

LMA. A diferencia de lo observado con la trisomía 8, que en la LMMC hemos visto que confiere muy mal pronóstico, mientras en otras leucemias no es así, las alteraciones del cromosoma 7 (monosomía 7 y del(7q)) parecen también conferir muy mal pronóstico, pero en este caso como se esperaría de lo observado en otras hemopatías malignas (Haase *et al.*, 2009; Kartarjian *et al.*, 2008; Schanz *et al.* 2012). Por esta razón, a pesar de la baja incidencia en la serie actual, los pacientes con alteraciones del cromosoma 7 también se incluyeron en la categoría de alto riesgo en la nueva clasificación citogenética específica para LMMC. Por otro lado, los pacientes que presentaron un cariotipo normal o la pérdida aislada del cromosoma Y, que mostraron una mayor supervivencia global que el resto de los pacientes, se estratificaron en la categoría de bajo riesgo. Con el resto de alteraciones encontradas, debido a la baja incidencia no se pudieron realizar análisis estadísticos para establecer su posible relación con el pronóstico. Por lo tanto, todas estas alteraciones se fusionaron en un mismo subgrupo de riesgo intermedio. Con estos datos, basándonos en un análisis de supervivencia, se han podido definir tres categorías de riesgo citogenético, una de bajo riesgo (cariotipo normal y la pérdida del cromosoma Y como alteración única), un grupo de alto riesgo (trisomía 8 aislada o con una alteración adicional, las anomalías del cromosoma 7, aislada o con una alteración adicional y el cariotipo complejo), y un grupo de riesgo intermedio (donde se incluyen el resto de alteraciones simples o dobles).

Hasta el momento, ninguno de los sistemas pronósticos desarrollados previamente para LMMC han utilizado los hallazgos citogenéticos (Molica *et al.*, 1990; Onida *et al.*, 2002; González-Medina *et al.*, 2002 y Germing *et al.*, 2004) y la dependencia transfusional al diagnóstico. Este trabajo propone un nuevo sistema de clasificación citogenética específico para LMMC que muestra una asociación clara e independiente con la supervivencia global y la transformación a LMA. Estos datos sugieren que las alteraciones cromosómicas con impacto pronóstico difieren de aquellas descritas para otros subtipos de pacientes con SMD. En este sentido, en el IPSS la trisomía del cromosoma 8 es considerada una alteración de riesgo intermedio y sin embargo en la nueva clasificación propuesta para LMMC se considera de alto riesgo. Por otra parte, las alteraciones del(5q) y del(20q) incluidas en el IPSS como alteraciones de bajo riesgo, para LMMC se han considerado como alteraciones de riesgo intermedio

ya que su incidencia fue bastante baja, resultados similares a los obtenidos por Haase *et al.* (2009) quienes encuentran una incidencia del 1,5%. De este modo, se demuestra que la nueva clasificación citogenética propuesta en este estudio es más precisa que la propuesta por el IPSS para determinar el pronóstico de los pacientes con LMMC muy probablemente debido a los resultados obtenidos en los pacientes con trisomía 8 y a la inclusión de pacientes con más de $13 \times 10^9/L$. Esta ventaja fue especialmente evidente cuando se determinó la supervivencia en los pacientes con LMMC-MP (pacientes excluidos del IPSS original).

Uno de los objetivos de este proyecto de tesis ha sido analizar el valor pronóstico de las clasificaciones FAB y OMS y su relación con la citogenética. Las clasificaciones FAB y OMS han sido indispensables para refinar la definición de LMMC. Sin embargo, es importante tener presente que ambas están basadas en interpretaciones subjetivas de expertos y no en características biológicas objetivas. La falta de criterios objetivos para determinar el punto de corte en $1 \times 10^9/L$ monocitos que incluye o excluye a pacientes con características limítrofes a los puntos de corte, como los pacientes que presentan una mínima monocitosis mantenida, o los que cursan con alteraciones medulares o extramedulares claras pero no presentan monocitosis, puede influir en la heterogeneidad de este grupo de pacientes y por tanto, en el impacto de los modelos de estratificación (Braun *et al.*, 2007). Poco después de la propuesta de separar los pacientes en LMMC-MD y LMMC-MP, Germing *et al.* (1998) realizaron un análisis retrospectivo de 158 pacientes con LMMC. Aparte de una tendencia mayor de transformaciones a LMA en los pacientes con LMMC-MD, no encontraron diferencias significativas ni en la supervivencia ni en las causas principales de mortalidad. Con estos resultados concluyeron que esta categorización propuesta por la FAB no parecía aportar ninguna información pronóstica aunque se haya usado como guía para la toma de decisiones terapéuticas. En este estudio se observa que el recuento de leucocitos es un factor pronóstico independiente para LMMC. González-Medina *et al.* (2002) en una serie de 70 pacientes de un único centro español también demostró que la cifra de leucocitos (aunque en este caso con el punto de corte en $10 \times 10^9/L$) tenían un impacto pronóstico independiente en la supervivencia. Esta es la única referencia en la literatura en la que se describe una relación entre la variante MD y MP y la supervivencia. Probablemente la ausencia de otros estudios

confirmando este hallazgo se debida a que la OMS reclasificó estos pacientes dentro de la categoría mixta de NPM/SMD, basándose en que los resultados clínicos de la LMMC estaban más relacionados con la proporción de blastos que con la proporción de monocitos y leucocitos (Yavorkovsky & Cook, 2001; Greenberg *et al.*, 2001). Sin embargo, ha habido gran controversia sobre este tema ya que el dilema se centra en si la clasificación debería hacerse en base a las características morfológicas y clínicas de la enfermedad o en base al pronóstico. Otra posible causa de que otros grupos no encuentren relación de los leucocitos con la supervivencia puede ser debida a la disparidad en las proporciones de los dos subtipos de LMMC, es decir de los subtipos MD y MP.

Otra de las variables que inciden en el pronóstico de forma independiente es el porcentaje de blastos. Esta es la única variable común en todos los esquemas pronósticos desarrollados específicamente para LMMC. En nuestro caso se ha utilizado la clasificación de la OMS que combina el porcentaje de blastos tanto en MO (incluyendo promonocitos) como en SP. Sin embargo, en los distintos índices pronósticos los punto de corte varían entre el 5 y el 10% y siempre contabilizados en MO (Tabla 34, Molica *et al.*, 1990; Onida *et al.*, 2002; González-Medina *et al.*, 2002 y Germing *et al.*, 2004). La propuesta de la OMS 2001 de reconocer que en ocasiones se produce una superposición entre los SMD y SMPC ofrecía una visión menos restrictiva de estos trastornos. La división de LMMC-1 y LMMC-2 se propuso con la intención de ayudar a identificar aquellos pacientes con un peor pronóstico y un mayor riesgo de evolución a leucemia aguda. Germing *et al.* (2004) demostraron que había diferencias significativas en la supervivencia y en la evolución a LMA entre ambos subgrupos. A su vez, no encontraron diferencias en los parámetros clínicos, morfológicos, hematológicos ni citogenéticos (Germing *et al.*, 2007).

Nuestros resultados confirman la importancia de ambas clasificaciones, FAB (basada en la cifra de leucocitos) y OMS (basada en el porcentaje de blastos), para la estratificación de lo pacientes con LMMC, ya que dan una información complementaria. Además, la clasificación OMS junto con la nueva clasificación citogenética específica para LMMC son las únicas variables pronósticas independientes para el riesgo de evolución a LMA. En relación con esta observación, quisiéramos resaltar que el análisis fue realizado mediante métodos de riesgo competitivo, ya que actualmente es la recomendación general

cuando el 'end point' que se analiza 'compite' con otros. En este caso, la muerte sin una transformación leucémica previa fue considerado el evento competitivo. Esta forma de analizar el impacto pronóstico no nos permite su comparación con otros estudio de la literatura, ya que no tenemos constancia de estudios que hayan aplicado estos métodos en el caso de la LMMC.

Otra de las variables en la que encontramos una relación independiente con la supervivencia es la dependencia transfusional al diagnóstico. Esta se ha establecido como uno de los principales factores de riesgo en pacientes con SMD y forma parte del nuevo sistema pronóstico descrito para estos pacientes (WPSS). Sin embargo, el potencial pronóstico de esta variable no se había establecido hasta el momento en la LMMC. Otros trabajos encuentran relación con la anemia, una variable ligada a la dependencia transfusional al diagnóstico. Sin embargo, al analizar en esta serie cual de las dos variables inciden más en el pronóstico la dependencia transfusional era ligeramente superior a los niveles de hemoglobina. A la espera de que estos datos sean confirmados, como se ha sugerido para los SMD en general (Asemissen *et al.*, 2011), la dependencia transfusional podría reflejar otras características subyacentes de los pacientes además del grado de anemia, como la edad o la comorbilidad, entre otras.

Otras variables que han sido consideradas en los índices pronósticos descritos para LMMC, y que en nuestro estudio no hemos encontrado que tuviesen un peso pronóstico significativo, merecen algún comentario. El índice de Bournemounth modificado incluye el recuento de plaquetas y PMN, y el índice de Düsseldorf el recuento de plaquetas y los niveles de LDH. Nosotros también encontramos que todas estas variables tienen una relación con la supervivencia, pero sólo los niveles de LDH mostraron tener valor pronóstico independiente. No obstante, decidimos no incluir la LDH en el modelo predictivo que proponemos debido que el análisis derivó de una serie limitada de pacientes en los que este dato estuvo disponible (la mitad aproximadamente), sin contar la variabilidad de su medición en los diferentes centros. Con respecto a los precursores mieloides inmaduros y el recuento de linfocitos, que han sido considerados en el índice pronóstico del MD Anderson Cancer Center (Onida *et al.*, 2002), no fueron incluidos en nuestro estudio por carecer de dicha información.

En cuanto al riesgo de evolución a LMA, se observa que las variables seleccionadas por nuestro modelo son las misma que las encontradas para

supervivencia global, a excepción de los niveles de LDH. Llama la atención que ningún estudio previo ha conseguido establecer una relación de las características del paciente o de la LMMC con el riesgo de evolución a LMA.

Finalmente, quisiéramos resaltar el valor añadido de la validación que hicimos del modelo obtenido del RESMD en una serie independiente de pacientes del Registro de SMD de Düsseldorf, Alemania, y del Hospital San Matteo de Pavia, Italia. Pudimos en ambas series, la serie de estudio y la serie de validación, comprobar la segregación de cuatro categorías pronósticas tanto para transformación a LMA como para supervivencia global. Así pues, el índice pronóstico que proponemos con capacidad de reconocer 4 categorías pronósticas puede eventualmente ser una excelente herramienta para evaluar el pronóstico, planificar el tratamiento y diseñar ensayos clínicos en pacientes con LMMC.

6.2 Estudio de mutaciones

En este trabajo hemos estudiado mediante secuenciación directa las posibles alteraciones que pudieran afectar a distintos genes tirosina quinasa ya que parecen desempeñar un importante papel en las rutas de señalización que afectan a los SMPC y SMD. Hasta el momento la selección de posibles genes alterados en una patología se hacían en base a su función y su implicación, ya conocida en otras hemopatías malignas o en las distintas rutas de señalización implicadas, principalmente en la diferenciación y en la apoptosis. Por esta razón se han estudiado los genes *FLT3*, *NPM1*, *c-FMS*, *VEGFR1*, *VEGFR2*, *JAK2*, *c-CBL*, *IDH1*, *IDH2*, *PDGFRA* y *PDGFRB*. Sin embargo sólo hemos encontrado mutaciones en los genes *JAK2* e *IDH1*. La mutación *JAK2* V617F se ha identificado en el 8% de los casos analizados, proporción similar a lo descrito en series previas. La presencia de ésta mutación produce una ganancia de función en el dominio JH2-like y la capacidad de fijarse al receptor de la citoquina en ausencia de esta, activándose por autofosforilización y uniéndose a las proteínas STAT con lo que la cascada de señales inductora de la proliferación se produce en ausencia del ligando activador. Esta desregulación de la actividad quinasa contribuye a la expansión del clon mieloproliferativo y se correlaciona con la aparición de complicaciones clínicas. A finales de 2011 la FDA aprobó el uso de un inhibidor de JAK1 y JAK2 en pacientes con mielofibrosis que presentaban la

mutación (en torno al 50% de los casos). En estos momentos su uso sólo está indicado en este subgrupo concreto de pacientes pero cabe esperar que en unos años puedan aplicarse en otros casos.

En cuanto a la mutación R132 de *IDH1* (Kosmider *et al.*, 2010), la incidencia en nuestra serie es del 3%, algo inferior a lo publicado en otras series. En pacientes con SMD y SMPC esta mutación parece estar asociada a un mayor riesgo de evolución a LMA. Sin embargo, en este estudio dada la baja incidencia no han podido realizarse análisis de supervivencia.

En esta serie llama la atención la escasa incidencia de mutaciones. Una de las razones puede ser la baja sensibilidad de las técnicas de secuenciación basadas en Sanger (en torno al 20% de detección) combinada con la infiltración de las muestras analizadas (hasta un 19% de blastos tanto en MO como en SP) lo que podría hacer que detectáramos menos alteraciones de las descritas mediante otros métodos. Sin embargo, aunque en algunos de los genes estudiados no se habían descrito mutaciones en este subgrupo de pacientes, llama la atención la ausencia de mutaciones encontradas en el estudio de *c-CBL*, donde en los dos principales trabajos la incidencia es del 13% y del 22% (Grand *et al.*, 2009 y Kohlmann *et al.*, 2010). La principal diferencia con ambos estudios es la sensibilidad de las técnicas empleadas, técnicas de secuenciación masiva y SNParrays, mucho más sensibles que las utilizadas en el presente trabajo. Se podría pensar que en algún caso fueran polimorfismos, considerados por error mutaciones debido a la falta de bases de datos de SNP de controles sanos. Actualmente son la principal causa de fluctuación entre las incidencias descritas, aunque en todos los genes estudiados se ha descartado porque todas las mutaciones que se han encontrado son de cambio de aminoácido. Otra razón podría ser que no hacen estudios pareados de muestra tumoral y germinal con la que poder descartar todas aquellas alteraciones constitucionales. Estas hipótesis se apoyan en un estudio más reciente que describe mutaciones en la muestra tumoral y no en la germinal de los genes *UTX*, *EZH2* y *DNMT3A* (Jankowska *et al.*, 2011). En este estudio para poder confirmar los resultados obtenidos mediante el método de Sanger necesitaron recurrir a técnicas de clonación para poder confirmar las alteraciones encontradas (Jankowska *et al.*, 2011).

Las nuevas técnicas de cribado masivo, además de aportar una mayor sensibilidad, están permitiendo estudiar el exoma y/o el genoma completo de los

pacientes y esta permitiendo avanzar rápidamente en los conocimientos moleculares de LMMC. A día de hoy se han descrito nuevas mutaciones génicas recurrentes en neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas: *TET2*, *ASXL1*, *c-CBL*, *IDH*, *RUNX1*, *DNMT3A*, *UTX* o *EZH2* entre otros. Además, diversos estudios han demostrado que algunas de estas mutaciones ocurren con mayor frecuencia en la LMMC que en otras entidades y que podrían tener un impacto pronóstico. Además se ha visto que, pese a la relativa uniformidad en el fenotipo y el pronóstico clínico, la LMMC muestra una enorme heterogeneidad molecular subyacente, con algunas mutaciones que afectan a vías convergentes. Las mutaciones de *CBL*, a través de la activación de *RAS*, producen efectos similares a las producidas por las mutaciones en este último. Del mismo modo, las mutaciones tanto de *TET2* como de *IDH* pueden conducir a una disminución en la hidroxilación de 5mC, las mutaciones en genes como *EZH2*, *UTX* y *DNMT3A* afectan a la metilación de histonas de forma funcionalmente similar a las mutaciones de *ASXL1*. Por todo ello, son necesarios nuevos estudios en series de pacientes más amplias que combinen todos estos hallazgos y que puedan determinar si estas mutaciones son críticas en la patogenia de la LMMC y si se puede establecer un diagnóstico molecular que permita seleccionar terapias dirigidas.

7. CONCLUSIONES

1. Casi un tercio (27%) de las LMMC con estudio citogenético valorable tienen anomalías cromosómicas, siendo la trisomía 8 y la pérdida del cromosoma Y las alteraciones más frecuentemente encontradas.
2. La relación entre las alteraciones citogenéticas y la supervivencia o la evolución a leucemia mieloide aguda nos llevó al reconocimiento de tres grupos de riesgo:
 - a. Riesgo bajo: cariotipo normal y pérdida del cromosoma Y
 - b. Riesgo intermedio: resto de alteraciones no incluidas en el riesgo bajo o alto.
 - c. Riesgo alto: trisomía del cromosoma 8, monosomías parciales o totales del cromosoma 7, cariotipo complejo.
3. Entre las variables evaluadas a la presentación de la enfermedad, hemos podido demostrar el valor pronóstico independiente de las alteraciones citogenéticas y confirmar el del recuento leucocitario en el punto de corte propuesto por la clasificación FAB de 1994 y la proporción de blastos en médula ósea y/o sangre periférica en el punto de corte propuesto por la clasificación de la OMS.
4. El modelo predictivo de supervivencia y de evolución a leucemia formado por la citogenética, los leucocitos y los blastos en médula ósea y/o sangre periférica fue refinado con la inclusión de la dependencia transfusional.
5. El nuevo modelo predictivo que proponemos para la LMMC es capaz de segregar cuatro grupos de riesgo con diferencias significativas en la supervivencia y en el riesgo de evolución a LMA.
6. El valor predictivo del índice pronóstico derivado de dicho modelo predictivo (CPSS) fue confirmado en una amplia serie independiente de pacientes con LMMC.
7. El CPSS muestra un poder discriminante mayor que otros modelos descritos previamente.
8. La presencia de mutaciones en los genes *FLT3*, *NPM1*, *KDR*, *FLT1*, *c-FMS*, *c-CBL* e *IDH2* no es frecuente en pacientes con LMMC. Los genes *JAK2* (mutación V617F) e *IDH1* (mutación R132) se encuentran mutados en un 8% y 3% de los pacientes estudiados, respectivamente. Sin embargo, no ha podido establecerse

una relación entre la presencia de mutaciones en estos últimos genes y las características de la enfermedad o el pronóstico.

8. BIBLIOGRAFÍA

A

Abbas HA, Maccio DR, Coskun S et al. Mdm2 is required for survival of hematopoietic stem cells/progenitors via dampening of ROS-induced p53 activity. *Cell Stem Cell*. 2010;7(5):606-617.

Anastasi J (2007). Myeloproliferative and "overlap" Myelodysplastic/Myeloproliferative Diseases In: *Haematopathology* (ed. By ED Hsi), p.483, Elsevier, Philadelphia, PA.

Apperley JF, Gardembas M, Melo JV et al. Response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloproliferative diseases with rearrangements of the platelet-derived growth factor receptor beta. *N Engl J Med*. 2002;347:481-487.

Asemissen AM, Giagounidis A. If it ain't broke, don't fix it! *Haematologica*. 2011 Nov;96(11):e44.

Aul C, Bowen DT, Yoshida Y. Pathogenesis, etiology and epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 1998;83:71-86.

B

Bacher U, Haferlach T, Kern W et al. A comparative study of molecular mutations in 381 patients with myelodysplastic syndrome and in 4130 patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2007;92(6):744-752.

Bain BJ. The relationship between the myelodysplastic syndromes and the myeloproliferative disorders. *Leuk Lymphoma*. 1999;34(5-6):443-449.

Baranger L, Szapiro N, Gardais J et al. Translocation t(5;12)(q31-q33;p12-p13): a non-random translocation associated with a myeloid disorder with eosinophilia. *Br J Haematol*. 1994;88(2):343-347.

Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*. 2011;364(26):2496-2506.

Bellamy WT, Richter L, Frutiger Y, Grogan TM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies. *Cancer Res.* 1999;59(3):728-733.

Bellamy WT. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor in multiple myeloma and other hematopoietic malignancies. *Semin Oncol.* 2001;28(6):551-559.

Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT et al. The chronic myeloid leukaemias: guidelines for distinguishing chronic granulocytic, atypical chronic myeloid, and chronic myelomonocytic leukaemia. Proposals by the French-American-British Cooperative Leukemia Group. *Br J Haematol.* 1994;87:746-754.

Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1982;51:189.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 1982;51:189-199.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 1985;103(3):460-2.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol.* 1976. Aug;33(4):451-8.

Björkman SE. Chronic refractory anemia with sideroblastic bone marrow; a study of four cases. *Blood.* 1956;11(3):250-259.

Block M, Jacobson LO, Bethard WT. Preleukemic acute human leukemia. *J Am Med Assoc.* 1953;152(11):1018-1028.

Bourgeade MF, Defachelles AS, Cayre YE. Myc is essential for transformation by TEL/platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFRbeta). *Blood.* 1998;91:3333-3339.

Braun T, Itzykson R, Renneville A, et al. Molecular predictors of response to decitabine in advanced chronic myelomonocytic leukemia: a phase 2 trial. *Blood*. 2011 Oct 6;118(14):3824-31.

Breccia M, Latagliata R, Mengarelli A et al. Prognostic factors in myelodysplastic and myeloproliferative types of chronic myelomonocytic leukemia: a retrospective analysis of 83 patients from a single institution. *Haematologica*. 2004;89(7):866-868.

C

Cain JA, Grisolano JL, Laird AD, et al. Complete remission of TEL-PDGFRB-induced myeloproliferative disease in mice by receptor tyrosine kinase inhibitor SU11657. *Blood*. 2004;104:561-564.

Caligiuri MA, Briesewitz R, Yu J et al. Novel c-CBL and CBL-b ubiquitin ligase mutations in human acute myeloid leukemia. *Blood*. 2007;110:1022-1024.

Cañizo del MC, Sanz G, San Miguel JF, et al. Chronic myelomonocytic leukaemia. Clinicobiological characteristics: a multivariate analysis in a series of 70 cases. *Eur J Haematol* 1989;42:466–73.

Carbuccia N, Murati A, Trouplin V et al. Mutations of ASXL1 gene in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2009;23(11):2183-2186.

Carroll M, Tomasson MH, Barker GF, et al. The TEL/platelet-derived growth factor beta receptor (PDGF beta R) fusion in chronic myelomonocytic leukemia is a transforming protein that self-associates and activates PDGF beta R kinase-dependent signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:14845-14850

Carroll M, Tomasson MH, Barker GF et al. The TEL/platelet-derived growth factor beta receptor (PDGF beta R) fusion in chronic myelomonocytic leukemia is a transforming protein that self-associates and activates PDGF beta R kinase-dependent signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(25):14845-1450.

Catalano L, Improta S, de Laurentiis M et al. Prognosis of chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica*. 1996;81(4):324-329.

Caudill JS, Sternberg AJ, Li CY et al. C-terminal nucleophosmin mutations are uncommon in chronic myeloid disorders. *Br J Haematol.* 2006;133(6):638-641.

Colombo E, Marine JC, Danovi D et al. Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nat Cell Biol.* 2002;4(7):529-533.

Cools J, DeAngelo DJ, Gotlib J et al. A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *N Engl J Med.* 2003;348(13):1201-1214.

Cox DR. Regression models and life tables (with discussion). *J R Stat Soc B* 1972; 34: 187-220

D

Dacie JV, Smith MD, White JC, et al. Refractory normoblastic anaemia: a clinical and haematological study of seven cases. *Br J Haematol.* 1959;5(1):56-82.

Dameshek W, Sideroblastic Anemia, is this a malignancy? *Brit. J. Haemat.* 1965; 2:52—58.

de Vries P, Brasel KA, McKenna HJ et al. Thymus reconstitution by c-kit-expressing hematopoietic stem cells purified from adult mouse bone marrow. *J Exp Med.* 1992; 176(6):1503–1509.

Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med.* 2009;360(22):2289-2301.

Dewar AL, Cambareri AC, Zannettino AC et al. Macrophage colony-stimulating factor receptor c-fms is a novel target of imatinib. *Blood.* 2005;105:3127-3132.

Döhner K, Schlenk RF, Habdank M et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood.* 2005;106(12):3740-3746.

Dreyfus B. Preleukemic states. I. Definition and classification. II. Refractory anemia with an excess of myeloblasts in the bone marrow (smoldering acute leukemia). *Nouv Rev Fr Hematol Blood Cells.* 1976;(1-2):33-55.

Dunbar TS, Gentry GA, Olson MO. Interaction of nucleolar phosphoprotein B23 with nucleic acids. *Biochemistry*. 1989;28(24):9495-9501.

Dunbar AJ, Gondek LP, O'Keefe CL et al. 250K single nucleotide polymorphism array karyotyping identifies acquired uniparental disomy and homozygous mutations, including novel missense substitutions of c-Cbl, in myeloid malignancies. *Cancer Res*. 2008;68:10349-10357.

Dvorak HF. Angiogenesis: update 2005. *J Thromb Haemost*. 2005;3(8):1835-1842.

F

Falini B, Mecucci C, Tiacci E et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med*. 2005;352(3):254-266.

Fenaux P, Preudhomme C. Molecular abnormalities and clonality in myelodysplastic syndromes. *Pathol Biol*. 1997 ;45(7):556-560.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003;9(6):669-76.

Fiedler W, Graeven U, Ergün S et al. Vascular endothelial factor, a possible paracrine growth factor in human acute myeloid leukemia. *Blood* 1997;89(6):1870-1875.

Figuroa 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):553-567.

Fine JP, Gray RJ. A proportional hazards model for subdistribution of a competing risk. *Journal of American Statistical Association* 1999, 94: 496-509.

Fisher CL, Pineault N, Brookes C et al. Loss-of-function Additional sex combs like-1 mutations disrupt hematopoiesis but do not cause severe myelodysplasia or leukemia. *Blood*. 2010;115(1):38-46.

Fröhling S, Schlenk RF, Breitnick J et al. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia

and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood*. 2002;100(13):4372-4380.

G

Gabrilovich D, Ishida T, Oyama T et al. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood*. 1998;92(11):4150-4166.

Geary GC, Catovsky D, Wiltshaw E, et al. Chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1975; 30:289-302

Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adélaïde J et al. Genome profiling of chronic myelomonocytic leukemia: frequent alterations of RAS and RUNX1 genes. *BMC Cancer*. 2008;8:299.

Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adélaïde J et al. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2009;145(6):788-800.

Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Roquain J et al. ASXL1 mutation is associated with poor prognosis and acute transformation in chronic myelomonocytic leukemia. *Br J Haematol*. 2010;151(4):365-375.

Germing U, Gattermann N, Minning H, Heyll A, Aul C..Problems in the classification of CMML-dysplastic versus proliferative. type. *Leuk Res* 1998;22:871.

Germing U, Gattermann N, Strupp C et al. Validation of the WHO proposals for a new classification of primary myelodysplastic syndromes: a retrospective analysis of 1600 patients. *Leuk Res*. 2000;24(12):983-992.

Germing U, Kündgen A, Gattermann N. Risk assessment in chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Leuk Lymphoma*. 2004;45(7):1311-1318.

Germing U, Strupp C, Aivado M, Gattermann N. New prognostic parameters for chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2002;100(2):731-732.

Germing U, Strupp C, Knipp S et al. Chronic myelomonocytic leukemia in the light of the WHO proposals. *Haematologica*. 2007;92(7):974-977.

Golub TR, Barker GF, Lovett M, Gilliland DG. Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell*. 1994;77(2):307-316.

González-Medina I, Bueno J, Torrequebrada A et al. Two groups of chronic myelomonocytic leukaemia: myelodysplastic and myeloproliferative. Prognostic implications in a series of a single center. *Leuk Res*. 2002;26(9):821-824.

Gooley TA, Leisenring W, Crowley JA, Storer BE. Estimation of failure probabilities in the presence of competing risks: New representations of old estimators. *Stat Med* 1999; 18: 665-706.

Grand FH, Hidalgo-Curtis CE, Ernst T, et al. Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2009 Jun 11;113(24):6182-92.

Green A, Beer P. Somatic mutations of IDH1 and IDH2 in the leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2010;362(4):369-370.

Greenberg P, Anderson J, de Witte T et al. Problematic WHO reclassification of myelodysplastic syndromes. Members of the International MDS Study Group. *J Clin Oncol*. 2000;18:3447-3452.

Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997;89:2079.

Greenberg PL. Biologic and clinical implications of marrow culture studies in the myelodysplastic syndromes. *Semin Hematol*. 1996;33:163-175.

Greenberg PL. Biologic nature of the myelodysplastic syndromes. *Acta Haematol*. 1987;78 Suppl 1:94-99.

Groupe Français de Cytogénétique Hématologique. Chronic myelomonocytic leukemia: single entity or heterogeneous disorder? A prospective multicenter study of 100 patients. Groupe Français de Cytogénétique Hématologique. *Cancer Genet Cytogenet*. 1991;55(1):57-65.

Gunby RH, Cazzaniga G, Tassi E et al. Sensitivity to imatinib but low frequency of the TEL/PDGFRbeta fusion protein in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica*. 2003;88:408-415.

H

Haase D, Germing U, Schanz J et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood*. 2007;110(13):4385-4395.

Hamilton-Paterson JL. Preleukemic anemia. *Acta Haematol* 1949; 2:309-16

Harris NL, Jaffe ES, Diebold J et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting. *J Clin Oncol*. 1999;17:3835-3849.

I

Invernizzi R, Travaglino E, Benatti C, et al. Survivin expression, apoptosis and proliferation in chronic myelomonocytic leukemia. *Eur J Haematol*. 2006 Jun;76(6):494-501.

J

Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (Eds.): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC. Press: Lyon 2001.

Jankowska AM, Makishima H, Tiu RV, et al. Mutational spectrum analysis of chronic myelomonocytic leukemia includes genes associated with epigenetic regulation: UTX, EZH2, and DNMT3A. *Blood*. 2011 Oct 6;118(14):3932-41.

Jankowska AM, Szpurka H, Tiu RV et al. Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2009;113(25):6403-6410.

Jones AV, Kreil S, Zoi K et al. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005;106:2162-2168.

K

Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 53: 457-481.

Ko M, Huang Y, Jankowska AM et al. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature*. 2010;468(7325):839-843.

Kohlmann A, Grossmann V, Klein HU et al. Next-generation sequencing technology reveals a characteristic pattern of molecular mutations in 72.8% of chronic myelomonocytic leukemia by detecting frequent alterations in TET2, CBL, RAS, and RUNX1. *J Clin Oncol*. 2010;28(24):3858-3865.

Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Cheok M et al. TET2 gene mutation is a frequent and adverse event in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica*. 2009;94(12):1676-1681.

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):3285-3291.

Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Slama L et al. Mutations of IDH1 and IDH2 genes in early and accelerated phases of myelodysplastic syndromes and MDS/myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2010;24(5):1094-1096.

Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood*. 2001;98(6):1752-1759.

Kralovics R, Passamonti F, Buser AS et al. A Gain-of-Function Mutation of JAK2 in Myeloproliferative Disorders. *N Engl J Med* 2005;352:1179-1790.

Krause DS, Van Etten RA. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med*. 2005;353(2):172-87.

Kuo MC, Liang DC, Huang CF et al. RUNX1 mutations are frequent in chronic myelomonocytic leukemia and mutations at the C-terminal region might predict acute myeloid leukemia transformation. *Leukemia*. 2009;23(8):1426-1431.

L

Lai JL, Fenaux P. [Cytogenetics of myelodysplastic syndromes]. *Pathol Biol (Paris)*. 1997;45:550-555.

Langemeijer SM, Aslanyan MG, Jansen JH. TET proteins in malignant hematopoiesis. *Cell Cycle*. 2009;8(24):4044-4048.

Lee BH, Tothova Z, Levine RL et al. FLT3 mutations confer enhanced proliferation and survival properties to multipotent progenitors in a murine model of chronic myelomonocytic leukemia. *Cancer Cell*. 2007;12(4):367-380.

Lee YK, Bone ND, Strege AK et al. VEGF receptor phosphorylation status and apoptosis is modulated by a green tea component, epigallocatechin-3-gallate (EGCG), in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2004;104(3):788-794.

Levine RL, Loriaux M, Huntly BJ et al. The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2005;106(10):3377-3379.

Liang H, Fairman J, Claxton DF et al. Molecular anatomy of chromosome 7q deletions in myeloid neoplasms: evidence for multiple critical loci. *Proc Natl Acad Sci*. 1998;95(7):3781-3785.

Loh ML, Martinelli S, Cordeddu V et al. Acquired PTPN11 mutations occur rarely in adult patients with myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia. *Leuk Res*. 2005;29(4):459-462.

Luna-Fineman S, Shannon KM, Lange BJ. Childhood monosomy 7: epidemiology, biology, and mechanistic implications. *Blood*. 1995;85(8):1985-1999.

Lyman SD, Jacobsen SE. c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood*. 1998;91(4):1101-1134.

M

Macdonald D, Reiter A, Cross NC. The 8p11 myeloproliferative syndrome: a distinct clinical entity caused by constitutive activation of FGFR1. *Acta Haematol*. 2002;107(2):101-107.

Magnusson MK, Meade KE, Nakamura R, et al. Activity of STI571 in chronic myelomonocytic leukemia with a platelet-derived growth factor beta receptor fusion oncogene. *Blood*. 2002;100:1088-1091.

Makishima H, Cazzolli H, Szpurka H et al. Mutations of e3 ubiquitin ligase cbl family members constitute a novel common pathogenic lesion in myeloid malignancies. *J Clin Oncol*. 2009;27:6109-6116.

Makishima H, Cazzolli H, Szpurka H, et al. Mutations of e3 ubiquitin ligase cbl family members constitute a novel common pathogenic lesion in myeloid malignancies. *J Clin Oncol*. 2009 Dec 20;27(36):6109-16.

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 Aug 10;25(23):3503-10.

Mantel N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother Rep*. 1966; 50: 163-170.

Mardis ER, Ding L, Dooling DJ et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med*. 2009;361(11):1058-1066

Martiat P, Michaux JL, Rodhain J. Philadelphia-negative (Ph-) chronic myeloid leukemia (CML): comparison with Ph+ CML and chronic myelomonocytic leukemia. The Groupe Français de Cytogénétique Hématologique. *Blood*. 1991;78(1):205-211.

Maru Y, Yamaguchi S, Shibuya M. Flt-1, a receptor for vascular endothelial growth factor, has transforming and morphogenic potentials. *Oncogene*. 1998;16(20):2585-2595.

Maschek H, Georgii A, Kaloutsi V et al. Myelofibrosis in primary myelodysplastic syndromes: a retrospective study of 352 patients. *Eur J Haematol*. 1992;48(4):208-214.

Maschek H, Kaloutsi V, Rodriguez-Kaiser M. Hypoplastic myelodysplastic syndrome: incidence, morphology, cytogenetics, and prognosis. *Ann Hematol*. 1993;66(3):117-122.

McKenna HJ, Stocking KL, Miller RE et al. Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood*. 2000;95(11):3489-3497.

Meshinchi S, Stirewalt DL, Alonzo TA et al. Activating mutations of RTK/ras signal transduction pathway in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood* 2003;102:1474-1479.

Michaux JL, Martiat P. Chronic myelomonocytic leukemia (CMML). A myelodysplastic or myeloproliferative syndrome?. *Leuk Lymphoma* 1993;9:35.

Miescher PA, Farquett JJ. Chronic myelomonocytic leukemia in adults. *Sem Hematol*. 1974;11(2):129-139.

Mithat Gonen and Glenn Heller. (2005). Concordance probability and discriminatory power in proportional hazards regression. *Biometrika*, 92, 4, pp.965-970

Miyauchi J, Asada M, Sasaki M et al. Mutations of the N-ras gene in juvenile chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 1994;83:2248-2254.

Molica S, Iannaccaro P, Alberti A. Chronic myelomonocytic leukemia: a test of a proposed staging system. *Am J Hematol*. 1990;35(2):129-130.

Morerio C, Acquila M, Rosanda C et al. HCMOGT-1 is a novel fusion partner to PDGFRB in juvenile myelomonocytic leukemia with t(5;17)(q33;p11.2). *Cancer Res*. 2004;64:2649-2651.

Murugan AK, Bojdani E, Xing M. Identification and functional characterization of isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) mutations in thyroid cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;393(3):555-559.

N

Nakao M, Yokota S, Iwai T et al. Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1996;10(12):1911-1918.

Neukirchen J, Blum S, Kuendgen A et al. Platelet counts and haemorrhagic diathesis in patients with myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol*. 2009 Nov;83(5):477-82.

Neukirchen J, Blum S, Kuendgen A, et al. Platelet counts and haemorrhagic diathesis in patients with myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol.* 2009 Nov;83(5):477-82.

Ngo NT, Lampert IA, Naresh KN. Bone marrow trephine morphology and immunohistochemical findings in chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2008;141(6):771-781.

Nösslinger T, Reisner R, Grüner H et al. Dysplastic versus proliferative CMML--a retrospective analysis of 91 patients from a single institution. *Leuk Res.* 2001;25(9):741-747.

Nunn MF, Seeburg PH, Moscovici C, et al. Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene. *Nature.* 1983;306:391-395.

O

Okamoto T. Immunological abnormalities in myelodysplastic syndromes. *Ryoikibetsu Shokogun Shirizu.* 1998;(22):213-216.

Onida F, Kantarjian HM, Smith TL et al. Prognostic factors and scoring systems in chronic myelomonocytic leukemia: a retrospective analysis of 213 patients. *Blood.* 2002;99(3):840-849.

Orazi A, Bennett JM, Germing U, et al. In: Swerdlow S, Campos E, Lee Harris N, Jaffe E, Pileri S, Stein H, Thiele J, Vardiman J, editors. *World Health Organization Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues.* Lyon, France. IARC press, World Health Organization; 2008: p.76-81.

Oscier D. Atypical chronic myeloid leukemia, a distinct clinical entity related to the myelodysplastic syndrome?. *Br J Haematol* 1996;92:582.

Oscier D. Atypical chronic myeloid leukemias. *Pathol Biol* 1997;45(7):587.

Padua RA, Guinn BA, Al Sabah AI et al. RAS, FMS and p53 mutations and poor clinical outcome in myelodysplasias: a 10-year follow-up. *Leukemia.* 1998;12:887-892.

P

Parker JE, Mufti GJ. Excessive apoptosis in low risk myelodysplastic syndromes (MDS). *Leuk Lymphoma*. 2000;40(1-2):1-24.

Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI et al. IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication. *J Clin Oncol*. 2010;28(22):3636-3643.

Pfeilstöcker M, Reisner R, Nösslinger T et al. Cross-validation of prognostic scores in myelodysplastic syndromes on 386 patients from a single institution confirms importance of cytogenetics. *Br J Haematol*. 1999;106(2):455-63.

Pich A, Riera L, Sismondi F et al. JAK2V617F activating mutation is associated with the myeloproliferative type of chronic myelomonocytic leukaemia. *J Clin Pathol*. 2009;62(9):798-801.

Pitini V, Arrigo C, Teti D et al. Response to STI571 in chronic myelomonocytic leukemia with platelet derived growth factor beta receptor involvement: a new case report. *Haematologica*. 2003;88:ECR18.

Pruneri G, Bertolini F, Soligo D et al. Angiogenesis in myelodysplastic syndromes. *Br J Cancer*. 1999;81(8):1398-1401.

Q

Quesnel B, Guillermin G, Vereecque R et al. Methylation of the p15(INK4b) gene in myelodysplastic syndromes is frequent and acquired during disease progression. *Blood*. 1998;91:2985-2990.

R

Ramshaw HS, Bardy PG, Lee MA, et al. Chronic myelomonocytic leukemia requires granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for growth in vitro and in vivo. *Exp Hematol*. 2002;30:1124-1131.

Reindl C, Quentmeier H, Petropoulos K et al. CBL exon 8/9 mutants activate the FLT3 pathway and cluster in core binding factor/11q deletion acute myeloid

leukemia/myelodysplastic syndrome subtypes. *Clin Cancer Res.* 2009;15:2238-2247.

Rheingold JJ, kaufman R, Andelson E, et al. Smoldering acute leucemia. *N Engl J Med* 1963; 268: 812-5.

Rhoads CP, Barker WH. Refractory anemia: An análisis of one hundred cases. *J Am Med Assoc.* 1938;110(11):794-796.

Ricci C, Fermo E, Corti S et al. RAS mutations contribute to evolution of chronic myelomonocytic leukemia to the proliferative variant. *Clin Cancer Res.* 2010;16(8):2246-2256.

Ridge SA, Worwood M, Oscier D, et al. FMS mutations in myelodysplastic, leukemic, and normal subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(4):1377-1380.

Rosati S, Mick R, Xu F et al. Refractory cytopenia with multilineage dysplasia: further characterization of an 'unclassifiable' myelodysplastic syndrome. *Leukemia.* 1996;10(1):20-26.

Roussel MF, Downing JR, Rettenmier CW, et al. A point mutation in the extracellular domain of the human CSF-1 receptor (c-fms proto-oncogene product) activates its transforming potential. *Cell.* 1988;55:979-988.

S

Saarmi MI, Linman JW. Preleukemia. The hematologic syndrome preceding acute leucemia. *Am J Med* 1973; 55: 38-48

Sanada M, Suzuki T, Shih LY et al. Gain-of-function of mutated C-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms. *Nature.* 2009;460:904-908.

Sanz GF, Sanz MA, Vallespi T, et al. Two regression models and a scoring system for predicting survival and planning treatment in myelodysplastic syndromes: a multivariate analysis of prognostic factors in 370 patients. *Blood.* 1989;74(1):395-408.

Sargin B, Choudhary C, Crosetto N et al. Flt3-dependent transformation by inactivating c-Cbl mutations in AML. *Blood.* 2007;110:1004-1012.

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.

Schnittger S, Schoch C, Kern W et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood.* 2005;106(12):3733-3739.

Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet.* 1971; 2(7731):971-972.

Sexauer J, Kass L, Schnitzer B. Subacute myelomonocytic leukemia. Clinical, morphologic and ultrastructural studies of 10 cases. *Am J Med.* 1974;57(6):853-861.

Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ, eds: *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature.* S. Karger, Basel 2009.

Shannon KM, O'Connell P, Martin GA et al. Loss of the normal NF1 allele from the bone marrow of children with type 1 neurofibromatosis and malignant myeloid disorders. *N Engl J Med.* 1994;330:597-601.

Shibuya M. Structure and dual function of vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1). *Int J Biochem Cell Biol.* 2001;33(4):409-20.

Shih LY, Huang CF, Lin TL et al. Heterogeneous patterns of CEBPalpha mutation status in the progression of myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia to acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res.* 2005;11:1821-1826.

Sipos K, Olson MO. Nucleolin promotes secondary structure in ribosomal RNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;177(2):673-678.

Sjöblom T, Jones S, Wood LD et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science.* 2006 ;314(5797):268-274.

Smith AE, Mohamedali AM, Kulasekararaj A et al. Next-generation sequencing of the TET2 gene in 355 MDS and CMML patients reveals low-abundance mutant clones with early origins, but indicates no definite prognostic value. *Blood.* 2010;116(19):3923-3932.

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.

Steer EJ, Cross NC. Myeloproliferative disorders with translocations of chromosome 5q31-35: role of the platelet-derived growth factor receptor Beta. *Acta Haematol*. 2002;107:113-122.

Swerdlow S, Campo E, Harris NL, et al. (Eds.): WHO Classification of tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC, Lyon 2008.

T

Tarapore P, Okuda M, Fukasawa K. A mammalian in vitro centriole duplication system: evidence for involvement of CDK2/cyclin E and nucleophosmin/B23 in centrosome duplication. *Cell Cycle*. 2002;1(1):75-81.

Tefferi A, Lim KH, Levine R. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*. 2009;361(11):1117-1178.

Tefferi A. JAK inhibitors for myeloproliferative neoplasms: clarifying facts from myths. *Blood*. 2012 Jan 25. [Epub ahead of print]

Tefferi A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2,MPL,TET2,ASXL1,CBL,IDH and IKZF1. *Leukemia*. 2010;24(6):1128-1138.

Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME et al. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;187(3):1579-1586.

Tessema M, Langer F, Dingemann J et al. Aberrant methylation and impaired expression of the p15(INK4b) cell cycle regulatory gene in chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Leukemia*. 2003;17:910-918.

Thiede C, Koch S, Creutzig E et al. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2006;107(10):4011-4020.

Thiede C, Steudel C, Mohr B et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*. 2002;99(12):4326-4335.

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):1668-1674.

Tien HF, Tang JH, Tsay W et al. Methylation of the p15(INK4B) gene in myelodysplastic syndrome: it can be detected early at diagnosis or during disease progression and is highly associated with leukaemic transformation. *Br J Haematol*. 2001;112:148-154.

Tobal K, Pagliuca A, Bhatt B et al. Mutation of the human FMS gene (M-CSF receptor) in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1990;4(7):486-489.

Tomasson MH, Williams IR, Hasserjian R et al. TEL/PDGFBetaR induces hematologic malignancies in mice that respond to a specific tyrosine kinase inhibitor. *Blood*. 1999;93:1707-1714.

Tyner JW, Erickson H, Deininger MW et al. High-Throughput sequencing screen reveals novel, transforming RAS mutations in myeloid leukemia patients. *Blood*. 2009;113(8):1749-1755.

Tyner JW, Walters DK, Willis SG et al. RNAi screening of the tyrosine kinome identifies therapeutic targets in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008;111(4):2238-2245.

U

Uchida T, Kinoshita T, Nagai H et al. Hypermethylation of the p15INK4B gene in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997;90:1403-1409.

V

Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002;100(7):2292-2302.

Vizmanos JL, Novo FJ, Roman JP et al. NIN, a gene encoding a CEP110-like centrosomal protein, is fused to PDGFRB in a patient with a t(5;14)(q33;q24) and an imatinib-responsive myeloproliferative disorder. *Cancer Res.* 2004;64:2673-2676.

Voglová J, Chrobák L, Neuwirtová R et al. Myelodysplastic and myeloproliferative type of chronic myelomonocytic leukemia--distinct subgroups or two stages of the same disease?. *Leuk Res.* 2001;25(6):493-499.

W

Ward PS, Patel J, Wise DR et al. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell.* 2010;17(3):225-234.

Wheadon H, Welham MJ. The coupling of TEL/PDGFBetaR to distinct functional responses is modulated by the presence of cytokine: involvement of mitogen-activated protein kinases. *Blood.* 2003;102:1480-1489.

Wlodarska I, Aventin A, Inglés-Esteve J et al. A new subtype of pre-B acute lymphoblastic leukemia with t(5;12)(q31q33;p12), molecularly and cytogenetically distinct from t(5;12) in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood.* 1997;89(5):1716-1722.

Wlodarska I, Mecucci C, Marynen P et al. TEL gene is involved in myelodysplastic syndromes with either the typical t(5;12)(q33;p13) translocation or its variant t(10;12)(q24;p13). *Blood.* 1995;85(10):2848-2852.

Worsley A, Oscier DG, Stevens J, et al. Prognostic features of chronic myelomonocytic leukaemia: a modified Bournemouth score gives the best prediction of survival. *Br J Haematol.* 1988 Jan;68(1):17-21.

Y

Yan H, Parsons DW, Jin G et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med.* 2009;360(8):7657-73.

Yarden Y, Escobedo JA, Kuang WJ et al. Structure of the receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors. *Nature*. 1986;323:226-232.

Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 2011;478(7367):64-69.

Yoshida Y, Mufti GJ. Apoptosis and its significance in MDS: controversies revisited. *Leuk Res*. 1999 Sep;23(9):777-785

Z

Zhang LJ, Shin ES, Yu ZX, Li SB. Molecular genetic evidence of Y chromosome loss in male patients with hematological disorders. *Chin Med J*. 2007;120(22):2002-2005.