

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia



Universitat Autònoma
de Barcelona

Facultat de Biociències
Universitat Autònoma de Barcelona

ESTUDIO DE PERFILES MOLECULARES EN PACIENTES CON SÍNDROME MIELODISPLÁSICO

Memoria presentada por

VERA ADEMÀ LLOBET

para optar al Grado de

DOCTORA EN BIOLOGÍA

Tesis realizada bajo la dirección del **Dr. Francesc Solé Ristol**

y la tutoría del **Dr. Leonard Barrios Sanromà**

Vera Ademà Llobet

La doctoranda

Dr. Francesc Solé Ristol

El director de tesis

Bellaterra, 2015

El Dr. Francesc Solé Ristol, director de la Plataforma de Citogenética y Jefe del Grupo de Investigación en Síndromes Mielodisplásicos del Institut de Recerca Contra la Leucèmia Josep Carreras.

CERTIFICA

Que la tesis doctoral titulada “Estudio de perfiles moleculares en pacientes con síndrome mielodisplásicos”, presentada por Vera Ademà Llobet, para acceder al título de Doctora en Biología, ha sido realizada bajo su dirección y cumple los requisitos formales y científicos para ser defendida delante del tribunal correspondiente.

El trabajo ha sido realizado en el Laboratorio de Citogenética Molecular, Servicio de Patología (IMIM-Hospital del Mar) y en el Grupo de Investigación en síndromes mielodisplásicos (Institut de Recerca Contra la Leucèmia Josep Carreras).

Barcelona, 2015

Dr. Francesc Solé Ristol

Creo en todo hasta que algo lo desmienta. Creo en hadas, en mitos y en dragones. Todo existe, aunque sea en tu mente. ¿Quién va a decir que los sueños no son tan reales como el aquí y el ahora?

La realidad deja mucho para la imaginación

John Lennon

A l'Oriol i la Neus
L'Agnes i la Blanca

AGRADECIMIENTOS

“La manera de conocer la vida es amar muchas cosas”
Vincent Van Gogh

El moment dels agraïments és molt emocionant, miro enrere i he de dir que han estat uns anys espectaculars!! He après moltes i moltes coses, paraules impossibles, cèl·lules que fan el que volen i mil experiments al laboratori!! I tot gràcies a vosaltres, a tots amb els que vaig compartir els meus inicis a l'Hospital del Mar i a l'IMIMI i a tots amb els que compartim el dia a dia a Can Ruti i a l'IJC. Gràcies per haver-me ensenyat tantes i tantes coses, ho he disfrutat molt i he sigut molt feliç ☺

Tot i això, he de dir que aquests últims mesos han estat una mica complicats i hi ha hagut molt i molt estrès, i vull agrair primer de tot a la gent del meu laboratori, a la **Mar**, la **Laura**, el **Jordi**, la **Joao**, la **Paula**, la **Nuri**, la **Rocío**, la **Laura**, el **Josep** i el **Francisco**, per tot el suport que m'heu donat aquests mesos, per cuidar-me tant, per animar-me i per tots els cafès i xocolatines que ens hem pres. I no puc deixar-me al **Kiko** i al **Jordi Petriz**, moltíssimes gràcies per deixar-me els vostres despatxos per escriure, si nó hauria estat impossible!!

També vull agrair de manera especial a tots els pacients que tot i tenir un SMD confien en nosaltres i s'animen a col·laborar en la nostra investigació, sense la seva voluntat aquesta tesi no hauria estat possible. Al **Sr. Josep Carreras**, per tenir un somni i ser valent i dur-lo a terme. Per un futur sense leucèmia!!

Dit això, comencen els agraïments ☺

Primer de tot al **Kiko** (el jefe), recordo la primera vegada que ens vem veure i em vas dir que no podies agafar a cap més becària, i d'això ja en fa 6 anys, ja saps que t'agraeixo moltíssim que canviessis d' idea i que em donessis la oportunitat de formar part del teu equip!! Moltes gràcies per haver confiat en mi, per ensenyar-me, ajudar-me i motivar-me. Per enviar-me a tot arreu del món per aprendre dels millors i per discutir amb mi tot el que són les SMD, moltes gràcies per ser un suport i una inspiració.

A l'**Ana Ferrer**, he de dir-te que vas ser la meva primera jefa i això no s'oblida, moltíssimes gràcies per presentar-me uns limfos peluts molt graciosos i per ensenyar-me a ser estricta i a fer les bases de dades

com cal, i per introduir-me en el món de la hemato. A la **Lourdes**, per inspirar-me amb la passió que transmetes per aprendre i per la citologia. A Encarna por darle siempre el toque de humor a todas las sesiones. A la **Doctora Woessner**, perquè ha sigut un plaer poder compartir sessions a l'Hospital del Mar. A Leo por tener siempre presente nuestro proyecto y por resolver mis dudas. A la **Carme Pedro**, per pensar en el nostre projecte i per sempre estar disposada a col·laborar.

A la **Blanca** i a la **Marta**, per ensenyar-me a mirar FISH i citogenètiques, per totes les hores a la kikerà i pels esmorzars i dinars.

A l'**Eulàlia** i la **Lara**, per ensenyar-me el que eren els arrays i a saber-los interpretar, per tots els moments al PRBB i tots els cafès en el vostre despatx!! A les becaries grans, la **Rocío** i l'**Ana Belén**, per ser unes expertes en citogenètica i en molecular, i solucionar tots els dubtes d'una becaria petita. A la **Maria**, por ser la mejor técnico de SMD y por ayudarnos y reírnos al mismo tiempo.

A la **Dra María Diez-Campelo**, creo que nunca podré agradecerte lo suficiente tu implicación en el proyecto, por mandarnos muestras y fichas y ayudarnos con el proyecto, esta tesis no habría sido lo mismo sin ti!

A la **Mar**, moltes gràcies per haver-m'ho ensenyat absolutament tot, des de com calibrar un nanodrop o retolar eppendorfs ;) fins a com separar uns CD3+. Per tot el carinyo, per estar sempre allà, per solucionar dubtes, per guiar-me i animar-me en el món dels SMD i per fer-ho divertit.

A l'**Anna** he de dir-te que haver començat el doctorat amb tu va ser tot un luxe, quina enveja els teus anells de ficoll! I quantes aventures de dues mini becaries, et trobo a faltar sempre!!

A la **Laura**, perquè sense tu no hauria estat el mateix i de fet no hauria estat tan genial! per que crec que formem un equip espectacular. Per tots els projectes i pel dia a dia, per ser la millor pel projecte de les SMD, per les mil hores a cultius muntant el circuit, per tots els skyperes al voltant del món i per ser un suport sempre.

Al **Jordi**, per treure'm un somriure cada matí amb els moments de crisalida i amb el Visca Catalunya!! Pels nostres càlculs de dilucions, en el circuit i amb els primers, que ens deixin sols que ho sabem fer!! Per tots els cafès al solet parlant de coses importants i de ciència de tant en tant!

A la **Joao**, por explicarme tantas y tantas cosas de linfomas, de LLC y de estadística. Por ser una vecina genial y por nuestras charlas y risas matutinas en el coche.

A la **Paula** per cuidar de les SMD, per tenir tantes ganes de tecnicar i per disfrutar-ho!. A la **Nuri**, per ser la tècnic de SMD, per tot el suport diari i per recolzar-nos tant!.

A **Rocío** por ser la mejor de las mejores técnicos, gracias por hacerlo todo siempre tan fácil! Por estar a tope con el circuito y por nuestras risas por las tardes en horas intempestivas!

Al **Josep**, per preocupar-te per mi, per preguntar-me sempre i fer-me riure tant i portar-me tomàquets! A tu i al Francisco, gràcies per deixar-me un lloc a la vostra taula! Tota una experiència estar entre els bioinformàtics! Al **Francisco**, per fi un bioinformàtic!!! Per ajudar-me tant amb els anàlisis, aquí i als US, per fer-me scripts i figures molt molones!

Al **Jordi Petriz** i a la **Laura**, per inspirar-nos amb la citometria de flux, per ajudar-nos amb els CD3+ i amb el projecte de la FCA. Al **Jose** i a l'**Adri** per formar part dels guapos, per tots els esmorzars i per riure'ns tant! I a l'**Adri** per ensenyar-me a ser una mini-hacker, per haver fet mil canvis en el meu ordinador i entendre que és ell qui fa coses rares i no jo! Per compartir amb mi les oreos al cafè i per cuidar-me tant aquí, allà i sempre!

Al laboratori de Citogenètica, a la **Isabel**, el **Javier**, la **Neus**, l'**Adela** i la **Marisol**, per ajudar-nos tant quan vem arribar, per mirar-vos les CG dels displàsics amb carinyo i a la **Carmen** i la **Nani**, per ser les millors tècnics de CG, per fer-nos la vida tant fàcil, per la llibreta de SMD i per donar-me sempre un cop de mà per fer FISHos i CG i fer-ho sempre amb un somriure. Al laboratori de Molecular, a la **Lurdes** per introduir-me en el món de la molecular, per deixar-me venir al teu laboratori molt al principi i ensenyar-me a fer PCRs, per tot el teu suport amb el circuit, amb el NGS i amb aquesta tesi.

A la **Silvia** per tota l'ajuda sempre que baixo a molecular, i pels nostres moments de riure. A la **Marta** per tots els moments que compartim de dubtes i estrès amb els panells! A la **Diana**, por toda la ayuda con el circuito y por las risas en molecular. El vostre laboratori sempre és una parada obligatòria ☺

A la **Blanca**, per tenir sempre en compte les SMD i enviar-nos mostres, per tenir tanta energia i tantes ganes i per llegir-te amb tant carinyo la meva tesi. A la **Mireia** i a la **Olga**, per la vostra ajuda amb l'estadística, i a l'**Olga** especialment perquè jo crec que no hi ha manera possible en el món d'agrar-te tots els anàlisis estadístics que has fet pel meu projecte, per fer-los i refer-los i per rebre'm sempre amb un somriure!. A la **M^aJosé** por toda tu ayuda con la base de datos y la actualización de todas las fichas, que no han sido pocas!

Al **Jordi Juncà**, per tota l'ajuda amb els CD3+, al **Tomàs**, a la **Inés**, l'**Eulàlia** i tot l'equip de hematologia de Can Ruti, moltes gràcies pel vostre suport!

Als super-jefes al **Dr Evarist Feliu**, a la **Dra Millà** i al **Dr Ribera**, per preocupar-vos sempre de la meva investigació, per preguntar-me, animar-me i motivar-me a seguir endavant! Y a ti **Fuen** gracias por las imágenes de mis queridos megacariocitos!

A los grupos del **GESMD** por colaborar y creer en nuestro proyecto ☺
Al **Leo** per ser el meu tutor a l'autònoma, per ajudar-me a organitzar-ho tot plegat i per revisar-te la tesi.

Als grups de l'**IJC**, per tots els projectes que posem en marxa i en especial a la **Ruth** por solucionar millones de dudas del circuito y por contestar a todos los mails! A la Meritxell, per ajudar-nos tant i enviar-nos el d 5q!! A la gent de la Fundació per fer tantes coses i per donar llum a la nostra investigació, i sobretot a l'**Àlex** i a la **Marta**, per interessar-vos sempre pel què fem. A tots els grups de l'**IMPPC**, per ser una ajuda importantíssima quan vem arribar, per les hores de dinar i pels cafès al solet. I sobretot a la **Mar**, per tota l'ajuda a cultius!!!!

Als companys de viatge d'última hora, al **Josep Biayna** per compartir els dinars els caps de setmana, per xerrar de mil coses, per fer que aquests findes hagin estat més divertits! i amb l'**Ernest**, per compartir els tres tot l'estrès d'aquests últims mesos!. A la **Bàrbara**, per ser la millor Lab manager i ajudar-nos tant amb el projecte de panells. A la part d'administració que ens cuideu tant sempre i a la **Jessi** sobretot per les mil milions de coses que et demano! Al **Carles**, pel teu suport, per ajudar-me a marxar a San Diego i a Cleveland i per preocupar-te que tot vagi bé sempre.

Al **Dr Rafael Bejar** por darme la oportunidad de ir a San Diego, por enseñarme qué es y cómo analizar el NGS, por ser una inspiración para querer saber más y más de los SMD, por ser tan accesible y contestar a todas mis preguntas y por cuidarme tanto cuando estuve allí. A l'**Albert**, la **Roser**, el **Roger** i la **Laura**, per fer que SD fos una de les millors experiències, per fer-me sentir com a casa, llavors i totes les altres vegades!

To **Dr Jarek Maciejewski**, to push me every day and make me be a better scientist. To **Michel** and **Bart**, thanks for teaching me how to do the analyses. To **Bhumi**, **Cassie**, **Nita** and **Valeria** because without you my experience in CLE wouldn't have been as amazing as it was, thanks for helping me at the lab but also thanks for being as a family when I was there. Y a **Carlos** por compartir la aventura en Cleveland, por cuidarme tanto y por reírnos tanto con el toque made in Spain!.

A les meves amigues més amigues més amigues, l'**Esther**, la **Paula**, l'**Anna**, l'**Aina**, la **Mimi**, la **Elia** i l'**Aida** a vegades l'agraïment es queda curt, però gràcies per fer-me feliç i per animar-me, per què no importi siestic aquí o allà que sempre us tinc al meu costat donant-me força i ajudant-me a aconseguir els meus somnis! A l'**Álvaro** por ser mi amigo más amigo, por Londres por Kenya por los mil skypes y por darle siempre la vuelta a todo, por cuidarme tanto y por hacerme ver las cosas desde puntos de vista imposibles! Al **mini Jordi**, per ser el millor del món i per què les tardes de jocs són les més divertides!. I a la **Sabina** per fer l'edició de la tesi i aguantar tot el meu estrès!.

Als avis **Ademà** i **Llobet** per ser un exemple, per ser uns metges fantàstics i donar-me la curiositat per saber el perquè de les coses i amb les avies per cuidar-me tant, per animar-me i mimar-me sempre. A la **família Ademà** i a la **família Llobet** perquè els moments en família són fantàstics!.

Als meus pares, l'**Oriol** i la **Neus**, per fer-me com sóc valenta, curiosa i motivada, amb ganes de riure i de disfrutar de la vida, per cuidar-me, per ser un suport incondicional i per animar-me tant sempre. A les nenes l'**Agnes** i la **Blanca**, perquè no hi ha res millor que tenir germanes i jo en tinc dues, que em fan viure, riure, que em cuiden i m'ajuden a trencar el concepte!. Si he arribat fins aquí és gràcies a vosaltres!

Moltes gràcies per haver format part de l'aventura!!!

ÍNDICE

1. DISSERTATION SUMMARY / RESUMEN DE LA TESIS.....	25
2. NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS	35
2.1 NEOPLASIAS MIELOIDES	35
2.2 SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS	38
2.2.1. ORIGEN DE LOS SMD	38
2.2.2. EPIDEMIOLOGÍA I ETIOLOGÍA DE LOS SMD	40
2.2.3. DIAGNÓSTICO CLÍNICO Y MORFOLÓGICO	41
2.2.3.1. Diagnóstico de les SMD	
2.2.3.2. Estudios a realizar en el estudio de los SMD	
2.2.4. CLASIFICACIÓN DE LOS SMD	47
2.2.4.1. Clasificación French American British	
2.2.4.2. Clasificación World Health Organization	
2.2.5. CARACTERÍSTICAS CITOGENÉTICAS DE LOS SMD	62
2.2.6. PRONÓSTICO DE LES SMD	76
2.2.6.1. International Prognostic Scoring System for MDS (IPSS)	
2.2.6.2. WHO Classification-based Prognostic Scoring System (WPSS)	
2.2.6.3. Revised International Prognostic Scoring System for MDS (IPSS-R)	
2.2.7. MUTACIONES SOMÁTICAS EN LOS SMD	85
2.2.8. ARQUITECTURA CLONAL DE LOS SMD	91
2.2.9. TRATAMIENTO DE LOS SMD	93
2.2.9.1. Tratamiento de pacientes con SMD de alto riesgo	
2.2.9.2. Tratamiento de pacientes con SMD de bajo riesgo	
2.2.10. TÉCNICAS DE ESTUDIO DE LOS SMD	99
2.2.10.1. Citogenética Convencional	
2.2.10.2. Hibridación in situ fluorescente	
2.2.10.3. Microarrays genómicos	
2.2.10.3.1. Microarrays de CGH	

- 2.2.10.3.2. Microarrays de SNP
- 2.2.10.4. Técnicas de secuenciación del DNA
- 2.2.10.5. Secuenciación clásica de Sanger
- 2.2.10.6. Next-generation sequencing

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	117
4. RESULTADOS	123
4.1. EL CARIOTIPO COMPLEJO PERO NO EL CARIOTIPO MONOSÓMICO ES EL MARCADOR DE PEOR PRONÓSTICO EN PACIENTES CON SÍNDROME MIELODISPLÁSICO PRIMARIO	123
4.2. LA APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE FISH EN PACIENTES CON SÍNDROME MIELODISPLÁSICO SIN MONOSOMÍA 7 O DELECCIÓN 7Q POR CITOGÉNÉTICA CONVENCIONAL DE BANDAS-G.	127
4.3. ESTUDIO DE LA ARQUITECTURA MUTACIONAL DE LA DELECCIÓN 5Q MEDIANTE TÉCNICAS DE MICROARRAY GENÓMICO (SNP ARRAY) Y NEXT-GENERATION SEQUENCING	131
5. DISCUSIÓN	137
5.1. EL CARIOTIPO MONOSÓMICO EN LOS SMD ES ÚTIL PARA DEFINIR UN SUBGRUPO DE PEOR PRONÓSTICO EN LOS PACIENTES QUE PRESENTAN UN CARIOTIPO ALTERADO, YA SEA COMPLEJO O NO, Y POR LO TANTO SER DE UTILIDAD COMO EN LOS PACIENTES CON LMA	138
5.2. APLICABILIDAD Y UTILIDAD DE LAS TÉCNICAS DE CITOGÉNÉTICA CONVENCIONAL Y FISH DE 7Q PARA EL ESTUDIO DE LOS SMD.	144
5.3. LA ELEVADA HETEROGENEIDAD DE LA ARQUITECTURA MUTACIONAL DE LA DELECCIÓN 5Q MEDIANTE TÉCNICAS DE MICROARRAYS GENÓMICOS (SNP ARRAY) Y NEXT-GENERATION SEQUENCING.	148
5.3.1 DE LOS SMD DELECCIÓN 5Q Y SNP-A	

5.3.2. ESTUDIOS MOLECULARES

5.3.3. DELECIÓN 5Q, MUTACIONES EN TP53 Y RESPUESTA A LA LENALIDOMIDA

6. CONCLUSIONES 167

7. BIBLIOGRAFÍA 175

8. ANEXO219

8.1. ARTÍCULO CIENTÍFICO PUBLICADO CON PARTE DE LOS ESTUDIOS REALIZADOS MEDIANTE NEXT-GENERATION SEQUENCING: SCHNEIDER RK, ADEMÀ V, HECKL D, JÄRÅS M, MALLO M, LORD AM, CHU LP, MCCONKEY ME, KRAMANN R, MULLALLY A, BEJAR R, SOLÉ F, EBERT BL. ROLE OF CASEIN KINASE 1A1 IN THE BIOLOGY AND TARGETED THERAPY OF DEL(5Q) MDS. CANCER CELL. 2014 OCT 13;26(4):509-20.... **219**

8.2. OTRAS PUBLICACIONES ELABORADAS DURANTE LA REALIZACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL**221**

8.3. PRESENTACIÓN EN CONGRESOS DEL TRABAJO REALIZADO DURANTE LA TESIS DOCTORAL**222**

8.4. COLABORACIÓN EN LA REALIZACIÓN DEL CAPÍTULO DE UN LIBRO**224**

ABREVIATURAS

A

ADN	Ácido desoxiribonucleico
AR	Anemia refractaria
AREB	Anemia refractaria con exceso de blastos
AREB-T	Anemia refractaria con exceso de blastos en transformación
AREB-t	AREB en transformación
ARN	Ácido ribonucleico
ARSA	Anemia refractaria con sideroblastos en anillo
ARSA-T	Anemia refractaria con sideroblastos en anillo con trombocitosis

C

CC	Citogenética Convencional
CHIP	Hematopoyesis clonal de potencial indeterminado (Clonal hematopoiesis of indeterminate potential)
CNN-LOH	Pérdida de heterocigosidad sin cambio en el número de copias
CRDU	Citopenia refractaria con displasia unilínea
CRDM	Citopenia refractaria con displasia multilínea

D

dNTPs	Deoxinucleotidos trifosfato
ddNTPs	Dideoxinucleotidos trifosfato

F

FAB	French American British Classification
FISH	Fluorescence in situ hybridization, hibridación in situ fluorescente

H

HSC	Hematopoyetic stem cell, célula madre hematopoyetica
-----	--

I

ICUS	Idiopathic Cytopenia of Undetermined/uncertain Significance
------	---

L

LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMC	Leucemia Mielocítica Crónica
LMCa	Leucemia Mielocítica Crónica atípica
LMMC	Leucemia Mielomonocítica Crónica
LOH	Pérdida de heterocigosidad

M

MFP	Mielofibrosis Primaria
MO	Medula ósea

N

NGS	Next-generation sequencing o secuenciación masiva
NMP	Neoplasias Mieloproliferativas
NMP-I	Neoplasias Mieloproliferativas Inclasificables
NR	Neutropenia refractaria

P

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PV	Policitemia Vera

R

RAN	Recuento Absoluto de Neutrófilos
-----	----------------------------------

S

SA	Sideroblastos en Anillo
SG	Supervivencia Global
SMD	Síndromes mielodisplásicos
SMD-U	Síndromes mielodisplásicos inclasificables

T

TE	Trombocitemia esencial
TR	Trombocitopenia refractaria

W

WHO	World health Organization
-----	---------------------------

1 DISSERTATION SUMMARY

MYELODYSPLASTIC SYNDROMES are clonal hematopoietic stem cell disorders highly heterogeneous. This disease is characterized by bone marrow failure that led to peripheral blood cytopenias. The outcome of these patients is closely related to cytopenias and to an increased risk to acute myeloid leukemia (AML) progression. Nowadays, these patients are classified according to the revised version (2008) of the *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, which includes 7 subcategories. However, due to the high heterogeneity inside each subcategory, risk scoring systems have been developed in order to better determine the overall survival (OS) of these patients and their risk to progress. This scoring system is known as IPSS-R (*International Prognostic Scoring System*) and includes 3 variables, cytopenias at peripheral blood, bone marrow blast percentage and karyotype. The last one has shown a high influence in the IPSS-R.

We hypothesize that alterations detected by molecular techniques could help us to better define patients with MDS. In order to elucidate this hypothesis, we studied three groups of MDS patients with different karyotypic alterations, patients with MDS and monosomal karyotype, patients with alterations in chromosome 7 by FISH and patients with MDS or AML and del(5q). Monosomal karyotype and alterations of chromosome 7 are included in high risk MDS, whether patients with isolated del(5q) are included in low risk MDS, with better OS and less AML risk progression. However, when the alteration is detected in a complex karyotype, the outcome is significantly worse.

These three group of patients were studied separately. First we studied the effect of monosomal karyotype. We studied a total of 1,054 adult patients with MDS and altered karyotype. Our main objective was to describe the incidence, characteristics and prognosis of patients with monosomal karyotype and its relation with OS and the progression risk to AML. This study helped us to determine that the worse prognosis related to patients with monosomal karyotype (included in a complex

karyotype) is because of the high correlation between monosomal and complex karyotype. Being the karyotype complexity the one that have a negative impact on patient's prognosis with lower OS and higher risk to AML progression.

Second, we studied by FISH a total of 820 patients with MDS without monosomy 7 or 7q deletion by conventional cytogenetics. Our objective was to define the impact of FISH detection (7- or 7q-) in the outcome of MDS patients. A total of 5.2% of cases were positive by FISH. This is of note because -7 and 7q- are related with worse outcome and more aggressive treatments. This study allowed us to determine that patients with an intermediate morphologic risk (according to WHO 2008) would benefit from a FISH study in order to better classify their prognosis. Due to the high correlation between chromosome 7 alterations and worse prognosis, it would be highly recommended to apply FISH 7q in patients with chromosome 7 alterations by conventional cytogenetics who doesn't fulfill clonally criteria.

Last group of patients studied were del(5q) patients, this alteration is one of the most common in MDS. We collected 228 patients with del(5q) with myeloid neoplasms (MDS and AML) by applying next-generation sequencing techniques. We were able to determine the 6 genes most commonly mutated: *TP53*, *DNMT3A*, *CSNK1A1*, *SF3B1*, *PRPF8* and *ASXL1*. Both *TP53* and *DNMT3A* were related to worse prognosis. *TP53* and *DNMT3A* had a negative impact on the OS, but only *DNMT3A* retained its prognostic impact on the multivariate analysis. Although we couldn't define a mutational profile for patients with del(5q), it would be important to perform initial studies to define patients with a better outcome. Especially when *CSNK1A1* is mutated due to its correlation with a good lenalidomide's treatment response. In contrast, patients with mutations in *TP53* should be closely followed for its well-known negative impact on OS and lenalidomide response. Moreover, due to the high negative impact of *DNMT3A* mutations in our series. It is worth noted that further studies are needed to clarify its impact on del(5q) patients.

RESUMEN DE LA TESIS

Los **SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS (SMD)** son una enfermedad heterogénea clonal de células madre hematopoyéticas. Esta enfermedad se caracteriza por presentar una médula ósea ineficaz que produce citopenias en sangre periférica. La severidad de estas citopenias y el riesgo incrementado a progresar a una leucemia mieloide aguda determinarán la evolución de la enfermedad y al mismo tiempo la del paciente. Actualmente estos pacientes se clasifican de acuerdo con 7 subcategorías que establece la revisión del 2008 de la clasificación de la *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Aun así, cada subcategoría presenta una elevada heterogeneidad y hace necesarios sistemas de puntuación para evaluar la supervivencia global (SG) de los pacientes así como la probabilidad de progresión a leucemia mieloide aguda. Este sistema para medir el riesgo se conoce como IPSS-R (*International Prognostic Scoring System*) e incluye 3 variables, las citopenias en sangre periférica, el porcentaje de blastos en médula ósea y el cariotipo. Este último presenta una gran importancia en el sistema pronóstico IPSS-R.

La hipótesis global del trabajo que se presenta es que las alteraciones detectadas mediante técnicas moleculares permiten mejorar la definición del pronóstico de los pacientes con SMD. Para dilucidar la hipótesis general, se han estudiado tres grupos de pacientes con distintas características citogenéticas: pacientes con SMD y cariotipo monosómico y/o complejo, pacientes con el cromosoma 7 mediante FISH y pacientes con delección 5q [del(5q)]. Los pacientes con cariotipo monosómico y los pacientes con alteraciones en el cromosoma 7 se incluyen en el grupo de SMD de alto riesgo. En cambio, pacientes con del(5q), cuando esta se detecta de manera aislada, se incluyen en el grupo de SMD de bajo riesgo, que incluye los pacientes con mejores SG. Cuando la del(5q) se determina en un cariotipo complejo su pronóstico pasa a ser desfavorable.

Estos tres grupos de pacientes fueron estudiados por separado. Prim-

ero analizamos el efecto del cariotipo monosómico, para ello estudiamos un total de 1.054 pacientes adultos con SMD y cariotipo alterado con el objetivo de describir la incidencia, características y pronóstico del cariotipo monosómico, y sobretodo su relación con la SG y el riesgo de progresión a LMA. Este estudio nos ha permitido determinar que el mal pronóstico asociado a los pacientes con cariotipo monosómico, en el contexto de un cariotipo complejo, se debe a la estrecha relación que éstos presentan con el cariotipo complejo, sugiriendo que es la complejidad en el cariotipo lo que les confiere un peor pronóstico, es decir peor SG y mayor riesgo de progresión a LMA.

Segundo, estudiamos mediante la técnica de FISH un total de 820 pacientes con SMD que por citogenética convencional no mostraron la monosomía 7 o la delección 7q. El objetivo del estudio era determinar si la detección mediante FISH de estas alteraciones afectaba a su clasificación. El 5,2% de los casos fueron positivos mediante la técnica de FISH. Esto presenta una importante relevancia ya que la monosomía 7 o la del(7q) se relacionan con un impacto pronóstico negativo que requiere tratamientos más agresivos. Este estudio nos permitió determinar que pacientes con riesgo morfológico intermedio (de acuerdo con la WHO 2008) se beneficiarían de la aplicación de la técnica de FISH 7q, ya que se detectan diferencias estadísticamente significativas en la SG. Debido a la relación de estas alteraciones con un peor pronóstico, sería altamente recomendable analizar mediante FISH todas aquellas alteraciones del cromosoma 7 que no cumplan criterios para ser determinadas como clonales.

El último grupo de pacientes que estudiamos presentaban la del(5q), esta es una de las alteraciones más comunes en los SMD. Estudiamos un total de 228 pacientes con neoplasias mieloides (SMD y LMA) y del(5q). Mediante el estudio por secuenciación masiva del exoma pudimos determinar los 6 genes más mutados en nuestra serie: *TP53*, *DNMT3A*, *CSNK1A1*, *SF3B1*, *PRPF8* y *ASXL1*. *TP53* y *DNMT3A* presentaron un efecto negativo en la SG de los pacientes, pero sólo *DNMT3A*, retuvo la influencia independiente en la SG, en el análisis multivariado.

Aunque todavía no hemos podido determinar un perfil mutacional para los pacientes con del(5q), sería importante hacer estudios iniciales en pacientes con *CSNK1A1* mutado, por su relación con una buena respuesta a la lenalidomida. Por otra parte, los pacientes con *TP53* deberían ser controlados de manera frecuente, por el impacto negativo en la SG de mutaciones en este gen. Y, por último, mutaciones en *DNMT3A* deberían estudiarse en más pacientes con del(5q) para esclarecer su relación con esta alteración.

Así pues, actualmente la citogenética convencional sigue siendo la técnica “*gold estándar*” para estudiar los pacientes con SMD, ya que el cariotipo es una de las variables con más peso en el estudio del pronóstico. Aun así, la aplicación de técnicas moleculares complementarias nos pueden ayudar a definir mejor los SMD y, como a lo largo de este trabajo, nos permitirá profundizar en el conocimiento de pacientes con SMD.

INTRODUCCIÓN

“Nos gusta llamar testarudez a la perseverancia ajena pero le reservamos el nombre de perseverancia a nuestra testarudez”

Alphonse Karr

LA HEMATOPOYESIS es el mecanismo fisiológico responsable de la formación continuada de las células sanguíneas y de su mantenimiento en la sangre periférica, mediante la diferenciación y proliferación de las células madre hematopoyéticas.

En los mamíferos, durante la etapa embrionaria y fetal, el sistema hematopoyético se desarrolla en distintas localizaciones anatómicas, en las etapas primarias extraembrionaria y luego embrionaria para finalmente localizarse en la médula ósea. En el adulto, la hematopoyesis se desarrolla en la médula ósea, que proporciona a las células madre hematopoyéticas un soporte físico y un punto de adhesión (nicho) para cada tipo celular y a su vez el microambiente adecuado para desarrollarse y diferenciarse en células maduras. En la Figura 1 se muestra un esquema de la hematopoyesis.

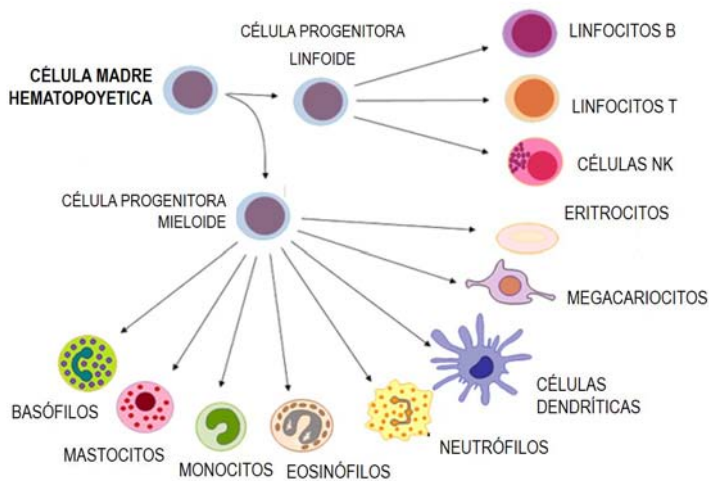


Figura 1_ Esquema de la hematopoyesis. Adaptado de Atlas Genetics Oncology.

Cuando alguno o algunos de los elementos implicados en la hematopoyesis se ven afectados por procesos malignos se desarrollan las **NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS**.

2 NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

Las **NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS** son procesos malignos que afectan al sistema hematopoyético, a nivel de sangre periférica, médula ósea y tejidos linfáticos. Las neoplasias hematológicas se dividen en dos grandes grupos: las neoplasias linfoides y las neoplasias mieloides.

Las **neoplasias mieloides** son enfermedades clonales de células madre hematopoyéticas o células madre progenitoras mieloides, que resultan de alteraciones genéticas y epigenéticas que modifican el proceso de autorenovación, proliferación y diferenciación. El término mieloides incluye todas las células que forman parte de la serie granulocítica (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), monocítica y macrófágica, eritroide, megacariocítica y mastocítica. Los criterios de clasificación de estas neoplasias se basan en estudios en sangre periférica y médula ósea previos a tratamiento.

En la introducción de esta tesis se hará referencia únicamente a las neoplasias mieloides, y se describirá de manera más exhaustiva los síndromes mielodisplásicos (SMD), motivo de estudio del presente trabajo.

2.1 NEOPLASIAS MIELOIDES

Esta categoría incluye de acuerdo con la clasificación revisada en 2008 de la World Health Organization u Organización Mundial de la Salud, que clasifica los tumores de tejidos hematopoyéticos y linfoides (WHO 2008) (Swerdlow et al., 2008) cinco entidades:

- _ Neoplasias mieloproliferativas crónicas
- _ Neoplasias mieloides y linfoides con eosinofilia y alteraciones en los genes PDGFRA, PDGFRB o FGFR1
- _ Neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas
- _ Síndromes mielodisplásicos
- _ Leucemia mieloides aguda

A continuación, se hará una descripción breve de cada una de las entidades comentadas y los SMD se describirán más extensamente en el punto 1.2.

Las **neoplasias mieloproliferativas** son un desorden clonal¹ de células madre hematopoyéticas caracterizado por la proliferación de una o más líneas mieloides. Inicialmente se caracterizan por una medula ósea (MO) con elevada hiper celularidad y maduración hematopoyética ineficaz que conlleva un elevado número de granulocitos, eritrocitos y/o plaquetas en sangre periférica (SP). La esplenomegalia y la hepatomegalia son comunes y se deben al exceso de células en SP o a la proliferación anómala de las células hematopoyéticas. Esta entidad incluye:

- _ Leucemia mieloide crónica (BCR-ABL positiva) (LMC)
- _ Leucemia neutrofílica crónica
- _ Policitemia Vera (PV)
- _ Mielofibrosis primaria (MFP)
- _ Trombocitemia esencial (TE)
- _ Leucemia eosinofílica crónica
- _ Mastocitosis
- _ Neoplasias mieloproliferativas inclasificables (NMP-I)

Las **neoplasias mieloides y linfoides con eosinofilia y alteraciones en los genes *PDGFRA*, *PDGFRB* o *FGFR1*** se determinan por la detección de alteraciones debido a translocaciones en los genes *PDGFRA*, *PDGFRB* o *FGFR1*, que producirán un gen de fusión que que codifica una tirosina quinasa aberrante.

Las neoplasias **mielodisplásicas/mieloproliferativas** incluyen desordenes clonales de neoplasias mieloides que en su presentación tienen características clínicas, morfológicas o de laboratorio que apoyan el diagnóstico de la vertiente mielodisplásica y otras que apoyan la vertiente mieloproliferativa. Normalmente se caracterizan por una MO hiper celular debido a la proliferación de una o más líneas mieloides. La

¹ Desorden clonal_ Conjunto de células que provienen de un ancestro común en el que se identifica una lesión genética distintiva.

proliferación es eficaz en algunas líneas, con números incrementados de células circulantes, que pueden ser morfológicamente y/o funcionalmente displásicas. El porcentaje de blastos² en la MO es siempre inferior al 20%. Aunque la hepatoesplenomegalia es común, las características clínicas y de laboratorio varían entre la vertiente mielodisplásica y la mieloproliferativa. Esta entidad incluye 5 subcategorías:

- _ Leucemia mielomonocítica crónica (LMMC)
- _ Leucemia mieloides crónica atípica, BCR-ABL negativa (LMCa)
- _ Leucemia mielomonocítica crónica juvenil (LMMJ)
- _ SMD/neoplasias mieloproliferativas inclasificables (SMD/NMP-I)
- _ Entidad provisional: anemia refractaria con sideroblastos en anillo (SA)³ con trombocitosis (ARSA-T)

La **leucemia Mieloide Aguda (LMA)** es el resultado de la expansión clonal de blastos mieloides (o mieloblastos) en SP, MO o tejido. Presenta una elevada heterogeneidad clínica, morfológica y genética, pudiendo involucrar a una o más líneas mieloides. Los requisitos para el diagnóstico son la determinación de más de un 20% de mieloblastos en SP o MO, pero también se clasifican en esta entidad si presentan alguna de las siguientes alteraciones: t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13.1q22), t(16;16)(p13.1;q22) o t(15;17)(q22;q12) (aunque no presenten más de un 20% de blastos en MO). Las LMA se clasifican en 7 subcategorías:

- _ Leucemia mieloides aguda con alteraciones genéticas recurrentes
- _ Leucemia mieloides aguda con cambios relacionados con la mielodisplasia
- _ Neoplasia mieloides relacionada con el tratamiento
- _ Leucemia mieloides no categorizable
- _ Sarcoma mieloides
- _ Proliferaciones mieloides relacionadas con el Síndrome de Down
- _ Neoplasias de células dendríticas plasmocitoides blásticas

2 Blasto_ Célula inmadura de linaje mieloides o linfoides.

3 Sideroblastos en anillo_ Células precursoras eritroides (normoblastos) con acumulación de gránulos de hierro en forma de anillo dentro de las mitocondrias que se localizan al rededor del núcleo.

2.2 LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS (SMD)

Los **síndromes mielodisplásicos o SMD**, son un grupo heterogéneo de desórdenes clonales que predominan en edades avanzadas. Este conjunto de síndromes se caracterizan por una hematopoyesis ineficaz, citopenias¹ en SP y riesgo elevado de progresión a LMA (Cazzola et al., 2011a; Swerdlow et al., 2008; Tefferi and Vardiman, 2009). La clasificación morfológica, mediante el estudio de la MO, es uno de los principales criterios para la clasificación de la enfermedad junto con la citogenética convencional que nos permite detectar alteraciones en metafase en alrededor del 50% de los casos (Haase et al., 2007; Solé et al., 2000, 2005). En la mayoría de SMD podemos detectar alteraciones moleculares, tanto alteraciones en el número de copia como mutaciones puntuales (70% y 90%, respectivamente). Los avances científicos y técnicos (Gondek et al., 2008; Makishima and Maciejewski, 2011) y la ampliación reciente en el estudio de las alteraciones moleculares, nos permiten entender mejor la fisiopatología de los SMD, descubriendo nuevas vías biológicas y proporcionando nuevos recursos para determinar la complejidad de sus fenotipos (Cazzola et al., 2013; Corey et al., 2007). El avance en el diagnóstico, la estimación del pronóstico y la predicción de la respuesta terapéutica nos proporciona la capacidad de desarrollar nuevas terapias en estos pacientes, en los que el número de tratamientos es limitado (Bejar et al., 2011a, 2011b).

2.2.1 ORIGEN DE LOS SMD

A principios del siglo XX se describe por primera vez un estado de anemia que precede a la aparición de una LMA (Weber, 1904). Durante las siguientes décadas se identificó un grupo de pacientes con anemia refractaria a suplemento vitamínico² (Bjorkman, 1956; Block et al., 1953; Hamilton-Paterson, 1949; Rheingold et al., 1963). No fue hasta 1982 que un grupo cooperativo francés, americano y británico, estableció un criterio para definir esta entidad como síndromes mielodisplásicos, dentro del marco de la clasificación morfológica de la FAB (*French-Ameri-*

1 Citopenias_ Recuento de células sanguíneas en SP por debajo de la normalidad.

2 Suplemento vitamínico_ En ese momento los pacientes eran tratados con vitamina B6.

can-British Classification) (Bennett et al., 1982).

Más recientemente, los SMD fueron definidos por la World Health Organization (en el año 2001 y en su revisión en 2008) (Jaffe et al., 2001; Swerdlow et al., 2008) como un grupo heterogéneo de desórdenes clonales de células madre hematopoyéticas, caracterizadas por una hematopoyesis ineficaz que produce citopenias en SP, mielodisplasia³ y un incremento en el riesgo de progresión a LMA. Aunque la mielodisplasia supone una de las principales características, no está restringida a esta entidad y no se considera criterio.

En los SMD, una célula madre hematopoyética alterada adquiere una ventaja en el crecimiento respecto a las otras células (Raza and Galili, 2012). Como resultado las células hijas ocupan la MO constituyendo lo que se conoce como MO clonal. Estas células se caracterizan por tener la habilidad de diferenciarse o madurar (Anastasi et al., 1993). Además, presentan una apoptosis excesiva (Raza et al., 1995, 1996). Cuando la capacidad de madurar y la apoptosis incrementada se pierden, es cuando se produce la progresión a LMA (Parker et al., 1998, 2000) (Figura 2).

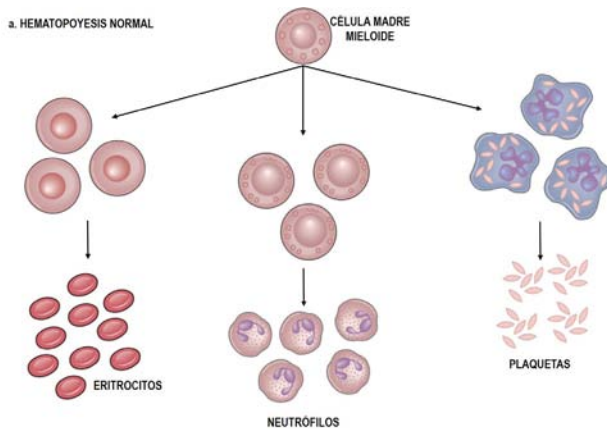


Figura 2_ Esquema de Hematopoyesis en condiciones normales.

³ Mielodisplasia_ Alteraciones o displasias (desorden en el crecimiento que resulta de una célula con morfología alterada, como el tamaño, la forma o el núcleo hipocromático) en una o más líneas celulares mieloides, que permiten detectar un estado premaligno.

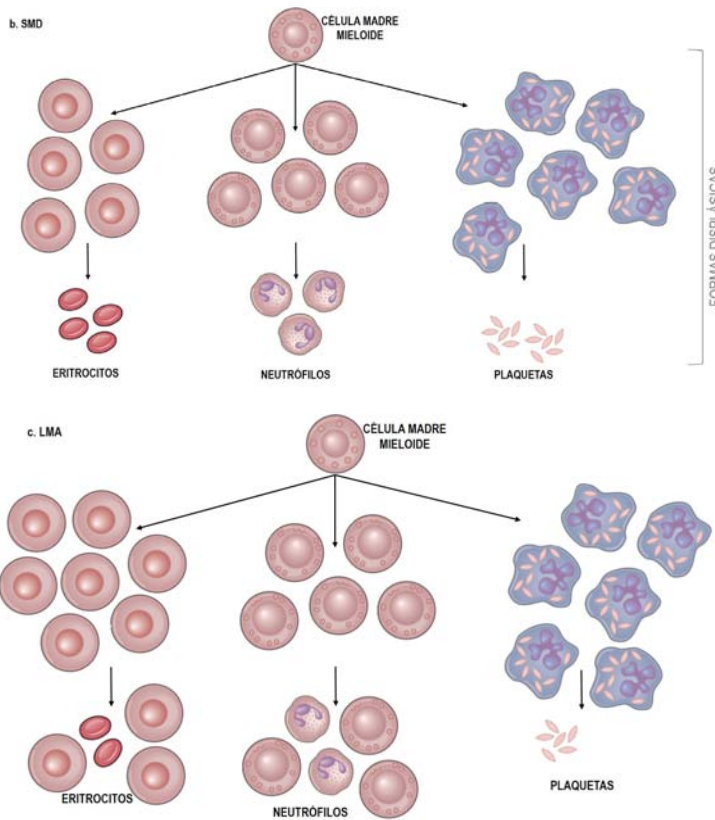


Figura 2_ Esquema de Hematopoyesis con afectación de una o más líneas en los SMD i Hematopoyesis en progresión a LMA.

Debido a la elevada heterogeneidad que presentan los SMD, no tan sólo a nivel morfológico, citogenético y molecular, sino también a nivel de supervivencia global (SG) y del riesgo de progresión a LMA, son muchos los índices pronóstico que se han establecido (se describen en el apartado 1.2.6) (Greenberg et al., 1997, 1998, 2012; Morel et al., 1993; Mufti et al., 1985; Sanz et al., 1989; Toyama et al., 1993).

2.2.2 EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOLOGÍA DE LOS SMD

Los SMD son enfermedades que se relacionan con la edad avanzada, con una media de edad al diagnóstico cercana a los 70 años (Germing

et al., 2004; Strom et al., 2008) y que se detecta mayoritariamente en varones. Actualmente la incidencia en Europa es de 4 casos por cada 100.000 personas por año, pero el número de casos se incrementa a 40-50 por cada 100.000 personas en mayores de 70 años (Aul et al., 1992; Neukirchen et al., 2011; Williamson et al., 1994). No se conocen diferencias étnicas en la incidencia de los SMD, pero en las poblaciones asiáticas se desarrollan en edades más jóvenes y normalmente con una MO hipocelular (Matsuda et al., 1998; Qu et al., 2012).

La etiología de los **SMD primarios o de novo** sólo se conoce en un 15% de los casos. En los SMD en edad pediátrica se describe un tercio de predisposición hereditaria, como: el Síndrome de Down, la anemia de Fanconi y la Neurofibromatosis. La predisposición hereditaria es menos frecuente en adultos pero debería estudiarse en casos de adultos jóvenes o en familias con casos de SMD, LMA o anemias aplásicas. Aun así, la relación existente entre los SMD y el incremento de edad sugiere un daño genético que puede ser causado por la edad propiamente o por factores ambientales, como la exposición a benceno (Aksoy et al., 1987; Natelson, 2007; Nisse et al., 2001; Rigolin et al., 1998; Rollison et al., 2008; Strom et al., 2008).

Los **SMD secundarios** pueden ser debidos a quimioterapia (Czader and Orazi, 2009), como por ejemplo, de agentes alquilantes, inhibidores de la topoisomerasa o análogos de la purina, o a radioterapia (Cardis et al., 2005; Iwanaga et al., 2011; Leone et al., 2011). Los pacientes con SMD secundario presentan alteraciones citogenéticas en el 80% de los casos y se caracterizan por presentar un pronóstico adverso.

2.2.3 DIAGNÓSTICO CLÍNICO Y MORFOLÓGICO DE LOS SMD

2.2.3.1 Diagnóstico de los SMD

Se sospecha la presencia de un SMD cuando existe un hemograma alterado y su diagnóstico se confirma mediante un aspirado de MO. Ésto nos permite hacer un análisis detallado de la morfología celular y del porcentaje de blastos (Heaney and Golde, 1999; Valent et al., 2007; Vallespi et al., 1998). La hematopoyesis ineficaz determina un fracaso

progresivo de la MO o un curso clínico caracterizado por la progresión del SMD a una LMA.

Los síntomas más comunes que presentan estos pacientes derivan de las citopenias, especialmente de la anemia (hemoglobina $<100\text{g/L}$)¹. En la mayoría de los pacientes es sintomática y provoca cansancio y disnea de esfuerzo. La neutropenia (recuento absoluto de neutrófilos (RAN) $< 1,8 \times 10^9/\text{L}$)¹, también se acompaña de defectos funcionales en los neutrófilos, lo que hace más vulnerable al paciente a padecer infecciones (especialmente por bacilos gram negativos, cocos gram positivos y hongos) (Adès et al., 2014; Toma et al., 2012). Otros signos pueden ser las hemorragias (petequias, hematomas) debido a la trombocitopenia (cifra de plaquetas $< 100 \times 10^9/\text{L}$)¹ que normalmente se asocia a una disfunción plaquetar. Aun así, un amplio número de pacientes con SMD son asintomáticos y su diagnóstico se produce de manera accidental. Algunos pacientes pueden presentar elevada la enzima lactato deshidrogenasa (LDH)² como consecuencia del incremento de la muerte celular en la MO (niveles elevados de LDH suponen un peor pronóstico) (Drabick et al., 2001; GESMD and SEHH, 2012).

El diagnóstico de los SMD se basa en unas **consideraciones preliminares** (Tabla 1) y en un **diagnóstico diferencial**. En la Figura 3 podemos ver una superposición de los SMD y otras enfermedades clonales y benignas que pueden semejar un SMD. Así pues, será importante excluir la existencia de otras enfermedades³ o condiciones que puedan presentar características comunes con los SMD.

1 Valores de referencia_ Hemoglobina: ♂: 140-180g/L ♀: 120-160g/L; Recuento absoluto de neutrófilos: 2,5-8,00 x 10⁹/L; Plaquetas: ♂ y ♀: 150-400/L.

2 Valores normales de LDH_ 105-333 UI/L.

3 Otras enfermedades_ Anemia macrocítica debido a un déficit de vitamina B12 o por falta de ácido fólico, debido a toxicidad por el alcohol o hipotiroidismo, con la anemia hemolítica y con otras causas de anemia como puede ser la leucemia aguda, anemias aplásicas, citopenias inducidas por medicamentos, trombocitopenias inmunes e infiltraciones en MO de diferentes tumores.

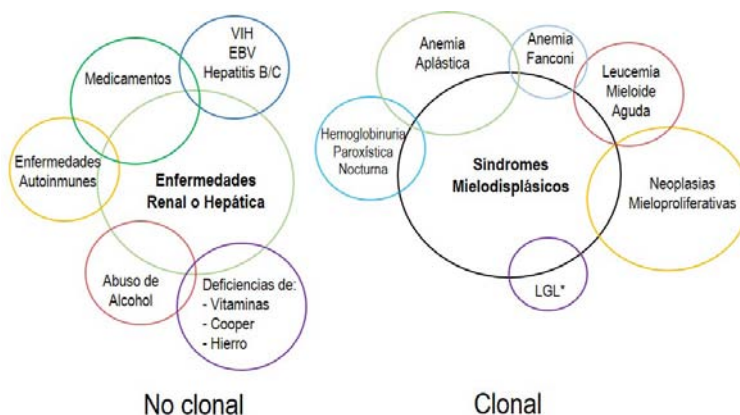


Figura 3_ Superposición del diagnóstico entre los SMD y otros desordenes clonales y condiciones benignas que pueden semejar un SMD. Adaptación Bejar y cols (Bejar, 2015) (*LGL: leucemia de linfocitos grandes granulares).

En la Tabla 1 se detallan los criterios mínimos para el diagnóstico de los SMD, presentados en la *International Working Conference on MDS en el año 2007* (Valent et al., 2007).

Tabla 1_ Prerrequisitos y criterios diagnósticos mínimos per determinar los SMD.

Prerrequisitos
_ Citopenia constante en una o más de las siguientes líneas: eritroide (Hb<11/L), neutrofílica (RAN <1,5 x10 ⁹ /L) o megacariocítica (plaquetas <100 x 10 ⁹ /L) ⁴
_ Exclusión de todos los otros desordenes hematológicos y no hematológicos que puedan ser causa principal de las citopenias y/o la mielodisplasia
Criterios
_ Displasia mínima del 10% (Bowen et al., 2003) en células de la línea eritroide, neutrofílica o megacariocítica en la extensión de MO, o presencia superior al >15% de SA (tinción de Perls)
_ 5%-19% de blastos en la extensión de la MO
_ Alteraciones cromosómicas que puedan ser representativas de la enfermedad por citogenética convencional o hibridación in situ fluorescente (FISH) (5q-, -7/7q-, +8, 20q-, otras)

⁴ Valores de referencia_ Hemoglobina: ♂: 140-180g/L ♀: 120-160g/L; Recuento absoluto de neutrófilos: 2,5-8,00 x 10⁹/L; Plaquetas: ♂y ♀: 150-400/L.

El diagnóstico de los SMD es un diagnóstico integrado que se establece cuando se cumplen los prerequisites y como mínimo un criterio decisivo de la enfermedad.

Cuando se cumplen los prerequisites pero no los criterios decisivos, los co-criterios adquieren relevancia (Tabla 2).

Tabla 2_ Co-criterios para el diagnóstico de un SMD.

Co-criterios
_ Fenotipo atípico en MO por citometría de flujo que indique la presencia de una población monoclonal
_ Datos moleculares de clonalidad: HUMARA1, perfil genético, mutaciones puntuales (por ejemplo: gen RAS)
_ Disminución de la formación de colonias de MO y SP en el cultivo de progenitores

El diagnóstico de los SMD puede ser difícil cuando las citopenias son moderadas y la displasia en MO también es moderada. En estos pacientes, la detección de alteraciones cromosómicas (Bejar et al., 2011b; Iwanaga et al., 2011; Vardiman et al., 2009; Westers et al., 2012) en células de la MO nos puede indicar la presencia de un desorden clonal, y por lo tanto que nos encontramos en el contexto de un SMD en estadios tempranos. En ausencia de alteraciones clonales, incluiremos estos pacientes bajo la terminología **ICUS** (citopenias idiopáticas de significado incierto, *Idiopathic Cytopenia of Undetermined/Uncertain Significance*). Esta entidad se determinó en el octavo Simposium Internacional de SMD en Nagasaki, Japón en el año 2005 (Valent et al., 2012; Wimazal et al., 2007) para clasificar aquellos pacientes con citopenias persistentes de más de 6 meses, en una de las líneas mieloides, pero sin criterios decisivos para ser clasificados como SMD.

Recientemente Steensma y cols (Steensma et al., 2015) han propuesto

¹ HUMARA_ Human androgen receptor X-chromosome inactivation assay: ensayos para la determinación de la clonalidad mediante estudios de inactivación de los genes codificados en el cromosoma X.

una nueva terminología la *hematopoyesis clonal de potencial indeterminado (CHIP, Clonal hematopoiesis of indeterminate potential)* para describir individuos con características asociadas a hematopoyesis malignas con mutaciones somáticas clonales en MO o SP, pero sin criterios diagnósticos para determinar una neoplasia hematológica, y que no presente criterios diagnósticos de hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS) o linfocitosis B monoclonal (LBM).

Esta nueva entidad, nos permite incluir a los pacientes con ICUS pero con una hematopoyesis clonal en la terminología CHIP, diferenciándose de los pacientes de SMD de bajo riesgo por la ausencia de displasia y un riesgo indeterminado. Los pacientes con CHIP, a su vez podrán incluir pacientes con hematopoyesis clonal y no maligna que curse con citopenia, por ejemplo, citopenias inmunes, enfermedades del hígado o deficiencias nutricionales que no serían consideradas ICUS, debido a la presencia de una clona, pero que pueden presentar un curso clínico distinto.

2.2.3.2 Estudios a realizar para el diagnóstico de los SMD

De acuerdo con las Guías Españolas sobre los SMD (GESMD and SEHH, 2012), es imprescindible tener presente que la mielodisplasia no es un sinónimo de SMD y que cualquier causa de citopenia y displasia transitoria debe ser excluida. Para ello se recogen los datos para la historia clínica, como la sintomatología, los antecedentes personales y la exposición a tóxicos. En la Tabla 3 se describen los estudios que se realizarán en el laboratorio:

Tabla 3_ Estudios a realizar para el diagnóstico de los SMD.

Estudios en Sangre Periférica

_ Hemograma completo: recuento absoluto de leucocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y plaquetas. Cifra de hemoglobina (Hb) y hematocrito (Hto). Parámetros de la serie eritroide, como el volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de HCM (CHCM), distribución eritrocitaria (ADE) y recuento de reticulocitos

-
- _ Frotis de SP, sin anticoagulante y con tinción May-Grünwald-Giemsa¹

 - _ Recuento porcentual diferencial de 200 leucocitos

 - _ Valoración de la mielodisplasia: diseritropoyesis, disgranulopoyesis y distrombopoyesis

 - _ Diagnóstico diferencial con otras causas de anemias: Test de Coombs (prueba de la antiglobulina directa), LDH, vitamina B12, ácido fólico, sideremia, ferritina, etc.

Estudios en Médula Ósea

-
- _ Aspirado medular para el estudio morfológico: tinción May-Grünwald-Giemsa¹

 - _ Contaje de 500 células nucleadas

 - _ Valoración de la proporción de blastos y porcentaje de la displasia en las series mieloides (eritroide, granulocítica y megacariocítica)

 - _ Tinción de Perls: valoración de los depósitos de hierro medular, recuento porcentual de SA

 - _ Biopsia medular: en casos con:
 - _ Aspirado medular hipoplásico (celularidad insuficiente)
 - _ Sospecha de mielofibrosis por punción seca
 - _ ICUS (citopenias idiopáticas de significado incierto)
-

2.2.4 CLASIFICACIÓN DE LOS SMD

Actualmente los SMD se clasifican de acuerdo con los criterios establecidos por la *World Health Organization* que publicó su primera clasificación el año 2001 (Jaffe et al., 2001) y su revisión en 2008 (Swerdlow et al., 2008). Previamente, los SMD se clasificaban de acuerdo con la clasificación de la FAB o *French-American-British classification* (Bennett et al., 1982).

2.2.4.1 French-American-British (FAB) classification, 1982

Se desarrolló entre los años 1974 y 1975. El objetivo era intentar definir la nomenclatura y la clasificación de los SMD y LMA. En su publicación

¹ Tinción May-Grünwald-Giemsa_ Mezcla de eosina y azul de metileno en alcohol metílico con función de fijador (May-Grünwald) y el colorante Giemsa que combina la eosina y otros derivados del azul de metileno. En función de la naturaleza ácida o básica de las estructuras se diferencian coloraciones, estructuras ácidas en rosa o rojizas y estructuras basófilas de color azul.

enfaticaron que no todos los pacientes que presentaban un SMD progresaban a una LMA, pero que normalmente presentaban complicaciones debidas a una hematopoyesis ineficaz y a un deterioro progresivo de la MO (Bennett et al., 1982). En el año 1982, el grupo de la FAB introdujo formalmente el nombre de Síndromes mielodisplásicos y propuso unas guías para su diagnóstico y clasificación, basándose en las **características morfológicas en SP y MO**. De esta manera se establecieron 5 subcategorías pronósticas, que permitían clasificar a pacientes de avanzada edad, con anemias refractarias adquiridas y/o otras citopenias en SP, y con alteraciones clonales en la MO. Durante 18 años la clasificación de la FAB ha demostrado su utilidad y su influencia en el pronóstico de los pacientes y ha sido validada por numerosos estudios (Bennett et al., 1982; Kerkhofs et al., 1987; Mufti et al., 1985; Ribera et al., 1987; Sanz et al., 1989). La clasificación de la FAB se describe en la Tabla 4.

Tabla 4_ Clasificación FAB, 1982.

Subcategoría SMD	Blastos en SP (%)	Blastos en MO (%)	Sideroblastos en anillo en MO (%)	Monocitos en SP	Presencia Bastones de Auer en MO
AR	< 1	< 5	≤ 15	< 1x10 ⁹ /L	No
ARSA	< 1	< 5	> 15	< 1x10 ⁹ /L	No
AREB	< 5	5-20	Indiferente	< 1x10 ⁹ /L	No
AREB-T	< 5	21-30	Indiferente	< 1x10 ⁹ /L	No
LMMC *	< 5	≤ 20	Indiferente	> 1x10 ⁹ /L	No

AR_ Anemia refractaria; ARSA_ AR con sideroblastos en anillo; AREB_ AR con exceso de blastos; AREB-T_ AREB en transformación; LMMC_ Leucemia mielomonocítica crónica; * Variantes de la LMMC_ Mielodisplásica (MD): leucocitos <13X10⁹/L y Mieloproliferativa (MP): leucocitos >13X10⁹/L.

Aunque la reproducibilidad y fiabilidad de la FAB, ha sido ampliamente demostrada, ésta presentaba ciertos puntos débiles (Germinig et al.,

2000a):

_ **Significado pronóstico de los bastones de Auer**¹: algunos estudios determinaron que su presencia no implicaba necesariamente un mal pronóstico (Seymour and Estey, 1995).

_ **Heterogeneidad de las ARSA**, esta incluía pacientes que se diferenciaban claramente en dos grupos, tanto a nivel citológico como morfológico (Garand et al., 1992; Gattermann et al., 1990; Germing et al., 2000b).

_ **Criterio mínimo para el diagnóstico de la AR**, ya que incluía pacientes con una clínica y resultados sugestivos de SMD pero que no presentaban características morfológicas concluyentes (Matsuda et al., 1998; Rosati et al., 1996).

_ **Porcentaje de blastos en las AREB**: el número de blastos era muy amplio, por lo que pacientes con pronósticos muy distintos quedaban incluidos en la misma subcategoría (Aul et al., 1992, 1994; Sanz et al., 1989).

_ **Difícil diferenciación entre AREB-T y LMA**: algunos estudios habían demostrado que la supervivencia de ambos grupos era muy similar (Nösslinger et al., 2010).

_ **La clasificación de las LMMC**, definir si tenían un componente displásico (leucocitos $<13 \times 10^9/L$) o un componente mieloproliferativo (leucocitos $>13 \times 10^9/L$). La inclusión de esta entidad fue problemática, ya que algunos pacientes presentaban una clínica similar a una NMP, mientras que otros presentaban una marcada displasia y la clínica se asemejaba a un SMD (Bennett et al., 1994; Germing et al., 1998; Michaux and Martiat, 1993).

_ **SMD inclasificable, SMD hipoplásico** (Tuzuner et al., 1995), **SMD con mielofibrosis, SMD relacionados con el tratamiento**: aunque este grupo compartía similitudes diferían en la supervivencia global² y

1 Bastones de Auer_ Inclusiones en forma de bastón que se tiñen en el citoplasma de precursores granulocíticos.

2 Supervivencia global_ Tiempo que transcurre desde el diagnóstico de la enfermedad hasta la muerte del paciente.

las alteraciones citogenéticas.

_ **Faltaba incorporar datos citogenéticos** que demostraban su importancia diagnóstica y pronóstica.

En el año 1997 un grupo de hematólogos y hematopatólogos se reunió en el contexto de la *World Health Organization* (WHO) para revisar la clasificación de las neoplasias hematológicas e integrar nuevas informaciones biológicas, genéticas y clínicas en el marco de la clasificación de la FAB.

2.2.4.2 World Health Organization classification (WHO)

En el año 2001 se publicó la nueva clasificación de los SMD (Tabla 5) a cargo de la *World Health Organization* (Jaffe et al., 2001). Esta clasificación WHO 2001 utilizó la información clínica, morfológica, citoquímica, inmunofenotípica, genética así como otras informaciones biológicas específicas con significado clínico. Los criterios de la WHO para clasificar las neoplasias mieloides se basan en el diagnóstico en SP y MO obtenidas previamente a cualquier tratamiento.

Para establecer la línea afectada de las células mieloides malignas y evaluar su maduración se determinan las características morfológicas, citoquímicas y/o inmunofenotípicas (Harris et al., 1999). Además, en la clasificación de la WHO de 2001, se incluyen bajo la terminología mieloides todas las células pertenecientes a la fracción granulocítica (neutrófilos, basófilos y eosinófilos), monocitos/macrófagos, eritrocitos, megacariocitos y linajes de mastocitos.

Algunas de las controversias detectadas en la clasificación de la FAB fueron solucionadas en la clasificación de la WHO 2001 (Tabla 5), como por ejemplo:

_ **Las AR se subdividen** en función de la presencia o ausencia de una displasia multilineal, y las AR se restringen a la línea eritroide, con o sin SA (Matsuda et al., 1998; Rosati et al., 1996).

_ **Aparece un nuevo subgrupo**, la citopenia refractaria con displasia

multilínea (CRDM), no considerada en la clasificación de la FAB y con importancia pronóstica (Matsuda et al., 1998; Rosati et al., 1996; Sanz et al., 1989).

_ **La subcategoría AREB se divide** en función del porcentaje de blastos en MO (ya que se había demostrado el factor pronóstico independiente de los blastos) AREB-1 (5%-9% blastos en MO y < de un 5% en SP) y AREB-2 (10%-19% de blastos en MO o entre un 5-19% en SP) (Greenberg et al., 1997, 1998; Sanz et al., 1989). La presencia de los bastones de Auer (Seymour and Estey, 1995) pasó a ser diagnóstico para el subgrupo AREB-2.

_ **Se eliminó el subtipo AREB-T** de esta clasificación debido a las similitudes con la LMA. Los pacientes con más de un 20% de blastos tenían un pronóstico comparable a la LMA (Vardiman, 2012).

_ **Se clasifican como LMA** a pacientes con alteraciones citogenéticas específicas: t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13.1q22), t(16;16)(p13.1;q22), t(15;17)(q22;q12) o alteraciones en 11q23 (gen MLL), aunque el porcentaje de blastos sea menor al 20%.

_ **Se excluyó la LMMC** mieloproliferativa con leucocitos $>13 \times 10^9/L$ de la clasificación de los SMD y se creó una nueva entidad SMP/SMD que incluía la LMMC, la LMMC juvenil y la LMC atípica (Germing et al., 2000a, 2007).

_ **Se define una nueva subcategoría** de pacientes con AR y delección aislada en 5q, el "Síndrome 5q-" (Van den Berghe et al., 1974; Boulwood et al., 1994).

_ **Se crea una nueva subcategoría de SMD** inclasificables (SMD-I), para pacientes con características mielodisplásicas en la MO pero que no incluye otros criterios.

Tabla 5_ Clasificación de los SMD según WHO, 2001.

Subcategoría	Citopenias	% blastos en SP	% blastos en MO	Sideroblastos en anillo en MO (%)	Displasia
AR	Anemia	< 1	< 5	< 15	Eritroide
ARSA	Anemia	0	< 5	≥ 15	Eritroide
CRDM	Bi o pancitopenia	< 1	< 5	< 15	Mínimo dos líneas
CRDM-SA	Bi o pancitopenia	< 1	< 5	≥ 15	Mínimo dos líneas
AREB-1	Citopenias	< 5	5 -9	Indiferente	Indiferente
AREB-2	Citopenias	5 -19	10 - 19	Indiferente	Indiferente
“Síndrome 5q”	Anemia	< 5	< 5	Indiferente	Indiferente
SMD inclasificable	Citopenias	< 1	< 5	Indiferente	Una línea

AR_ Anemia refractaria; ARSA_ AR con sideroblastos en anillo; CRDM_ Citopenia Refractaria con Displasia Multilínea; CRDM-SA_ CRDM con sideroblastos en anillo; AREB_ Anemia Refractaria con exceso de blastos tipo 1 y 2.

Esta clasificación permitió reducir el número de pacientes inclasificables y agrupar a los pacientes en categorías más homogéneas que proporcionaron una información pronóstica más precisa. La clasificación de la WHO 2001 fue validada por muchos grupos de investigación (Germing et al., 2006; Howe et al., 2004).

En el año 2008 (Swerdlow et al., 2008; Vardiman et al., 2009) se publica la revisión de la WHO 2001; los cambios más significativos fueron:

_ Pacientes con citopenia(s) refractarias con sospecha de SMD, pero que no presentan características morfológicas de SMD, se consideran SMD si presentan alguna de las alteraciones citogéné-

ticas detalladas en la Tabla 6.

Tabla 6_ Alteraciones citogenéticas en los SMD.

Alteración cromosómica		
Número de copias	-7 o 7q-	-5 o 5q-
	i(17q) o t(17p)	-13 o 13q-
	12p- o t(12p)	11q-
	9q-	idic(X)(q13)
Translocaciones	t(11;16)(q23;p13.3)	t(2;11)(p21;q23)
	inv(3)(q21q26.2)	t(3;21)(q26.2;q22.1)
	t(1;3)(p36.3;q21.2)	t(6;9)(p23;q34)

_ Se incorpora la citopenia refractaria con displasia unilínea (CRDU) que engloba pacientes con displasia unilínea asociada a anemia refractaria (AR), neutropenia refractaria (NR) o trombocitopenia refractaria (TR), y que además presentan menos de 1% de blastos en SP y menos de 5% de blastos en MO (Cazzola et al., 2011b; Germing et al., 2000a).

_ La subcategoría de CRDM deja de dividirse en dos subcategorías en función de los SA (Germing et al., 2000a).

_ Se define una nueva categoría provisional, la citopenia refractaria de la infancia, para incluir a niños con citopenia(s) con menos de un 2% y un 5% de blastos en SP y MO, respectivamente, y evidencia de displasia en 2 o más líneas. En el caso de niños que presenten entre 2%-19% de blastos en SP y/o de un 5%-19% de blastos en MO, la clasificación del SMD se hará de acuerdo con los criterios establecidos para los adultos.

_ La definición de Síndrome 5q- queda restringida a un subgrupo de pacientes con unas características clínicas específicas y se crea una nueva subcategoría más amplia, los SMD con delección aislada en 5q.

Así pues la revisión de la WHO 2008 define 7 subcategorías de SMD en el adulto. Las características de cada una se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7_ Clasificación de la WHO, 2008.

Subcategoría	Citopenias	% blastos en SP	% blastos en MO	Sideroblastos en anillo en MO (%)	Displasia
CRDU:					
AR	Anemia	< 1	< 5	< 15	Eritroide
NR	Neutropenia	< 1	< 5	< 15	Granulocítica
TR	Trombocitopenia	< 1	< 5	< 15	Megacariocítica
ARSA	Anemia	0	< 5	≥ 15	Eritroide
CRDM	Bi o pancitopenia	< 1	< 5	Indiferente	Mínimo dos líneas
AREB-1 *	Citopenias	< 5	5 - 9	Indiferente	Uni/Multi-línea
AREB-2	Citopenias	5 - 19	10 - 19	Indiferente	Uni/Multi-línea
SMD con delección aislada 5q	Anemia	< 5	< 5	Indiferente	Megacariocitos hipolobulados
SMD inclasificable	Citopenias	≤ 1	<5	Indiferente	Una línea

*sin bastones de Auer

En la definición de cada subcategoría siempre hay que tener presente que, cuando se hace un recuento de 200 precursores eritroides, 200 precursores neutrofilicos y como mínimo 30 megacariocíticos tanto en la extensión de SP como MO, más de un 10% de las células de la línea afectada tienen que ser displásicas. Los valores recomendados para definir las citopenias son:

- _Anemia: hemoglobina <100g/dL
- _Neutropenia: cifra de neutrófilos <1,8 x 10⁹/L
- _Trombocitopenia: cifra de plaquetas <100 x 10⁹/L

La ausencia de citopenias no excluye un SMD si hay evidencias morfológicas y/o citogenéticas de la presencia de un SMD. En casos en los que no se pueda demostrar la existencia de una alteración clonal, se esperará 6 meses antes de establecer el diagnóstico de SMD.

A continuación se detallan las características de cada subcategoría:

CITOPENIA REFRACTARIA CON DISPLASIA UNILÍNEA (CRDU)

- _ **SP:** Uni- o bicitopenias, <1% de blastos
- _ **MO:**
 - _ Displasia unilínea en $\geq 10\%$ de las células en una línea mieloide
 - _ <5% blastos
 - _ <15% de precursores eritroides con sideroblastos en anillo

Representa entre un 10%-20% de todos los casos con SMD (Germi et al., 2006; Malcovati et al., 2005) y la sintomatología se relaciona con el tipo de citopenia (Howe et al., 2004). La CRDU incluye los SMD que presentan una citopenia refractaria con displasia unilínea que incluye: anemia refractaria (AR), neutropenia refractaria (NR) y la trombocitopenia refractaria (TR). Incluye bicitopenias refractarias acompañadas de una displasia unilínea, pero no incluye pancitopenias refractarias con displasia unilínea (SMD-I).

Se observan alteraciones citogenéticas hasta en el 50% de casos con AR, siendo las más comunes las que incluyen la del(20q), +8, y altera-

ciones en los cromosomas 5 y 7 (Solé et al., 2005). El curso clínico de estos pacientes es largo. La SG mediana es aproximadamente de 66 meses y la tasa de progresión a LMA a los 5 años es de aproximadamente el 2%.

Anemia refractaria: es el subtipo más común de CRDU. En el recuento de 200 células, los precursores eritroides en MO presentan diseritropoyesis de leve a moderada y una displasia mínima del 10%. Podemos detectar SA pero en menos de un 15% de los precursores eritroides. Los neutrófilos y megacariocitos acostumbran a ser normales o pueden presentar una mínima displasia, pero siempre por debajo del 10% en ambas líneas.

Neutropenia refractaria: se caracteriza por presentar un 10% o más de neutrófilos en SP o MO. El resto de líneas mieloides no presenta una displasia significativa (< 10%).

Trombocitopenia refractaria: se caracteriza por presentar un 10% o más de megacariocitos displásicos después de evaluar como mínimo 30 células. Los megacariocitos displásicos normalmente sobrepasan el límite del 10%. Las otras líneas mieloides no presentan una displasia significativa (<10%). Los megacariocitos pueden estar aumentados o disminuidos. Los estudios citogenéticos en estos casos serán de mucha ayuda.

ANEMIA REFRACTARIA CON SIDEROBLASTOS EN ANILLO (ARSA)

_ **SP:** Anemia y ausencia de blastos

_ **MO:**

_ Sólo displasia eritroide

_ < 5% de blastos

_ ≥ 15% de precursores eritroides presentan sideroblastos en anillo

Representa entre un 3%-11% de los casos con SMD (Breccia et al., 2006; Germing et al., 2006; Malcovati et al., 2005). Los SA se localizan en precursores eritroides (normoblastos) con una acumulación anómala

de hierro dentro de la mitocondria y una disposición de éstas alrededor del núcleo (Cazzola et al., 2003; Grasso et al., 1980).

Esta subcategoría se caracteriza por anemia, displasia en la morfología de la serie eritroide y más de un 15% de SA (Figura 4) en los precursores eritroides en MO. No se detecta displasia significativa en las series no eritroides. Los mieloblastos no representan más del 5% de las células nucleadas en MO y no están presentes en SP.

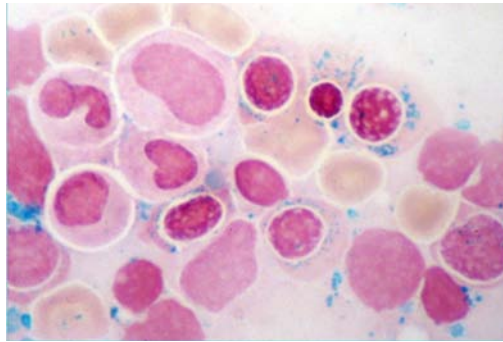


Figura 4_ Extensión de MO mostrando sideroblastos en anillo (tinción de Perls).

Las alteraciones cromosómicas clonales se determinan entre un 5%-20% de los casos con ARSA, y cuando están presentes involucran generalmente un sólo cromosoma (Breccia et al., 2006; Germing et al., 2000b).

La SG mediana de estos pacientes es de entre 69-108 meses aproximadamente y entre un 1%-2% de los casos evolucionan a una LMA (Germing et al., 2000b).

CITOPENIA REFRACTARIA CON DISPLASIA MULTILÍNEA (CRDM)

_ SP:

- _ Citopenia (-s)
- _ Sin o raramente blastos (<1%)
- _ Sin bastones de Auer
- _ $1 \times 10^9/L$ monocitos

_ MO:

- _ Displasia en $\geq 10\%$ de las células en \geq de dos líneas mieloides (eritroide, granulocítica o megacariocítica)
- _ $<5\%$ de blastos
- _ Sin bastones de Auer
- _ $\pm 15\%$ de sideroblastos en anillo

Incluyen un 30% de los SMD, y normalmente se detecta en individuos de edad avanzada y parece predominar en varones (Germing et al., 2006; Malcovati et al., 2005).

Esta subcategoría de SMD cursa con una o más citopenias y cambios displásicos en dos o más líneas mieloides: eritroide, granulocítica y megacariocítica (Rosati et al., 1996). Se presentan con menos de un 1% y un 5% de blastos en SP y MO, respectivamente. No hay presencia de bastones de Auer y el número de monocitos en SP es $<1 \times 10^9/L$. Algunos casos pueden tener un 15% o más de SA (Germing et al., 2006; Malcovati et al., 2005).

Las alteraciones citogenéticas clonales se detectan hasta en un 50% de los pacientes e incluyen: +8, -7, 7q-, -5, 5q- y 20q- así como el cariotipo complejo (cariotipos con tres o más alteraciones citogenéticas) (Germing et al., 2006; Greenberg et al., 1997, 1998).

El curso clínico de estos pacientes es bastante bueno, aunque la mayoría presenta un pronóstico relacionado con el grado de displasia y de citopenia. En general la SG es de unos 30 meses, aunque la supervivencia de los pacientes con cariotipo complejo se asemeja más a la de los pacientes con AREB. La tasa de progresión a LMA a los 2 años es de alrededor del 10% (Germing et al., 2006).

ANEMIA REFRACTARIA CON EXCESO DE BLASTOS (AREB)

Afecta a individuos de más de 50 años y normalmente engloba un 40% de los pacientes con SMD.

Presentan entre un 5%-19% de blastos en MO o entre 2%-19% de blastos en SP. Debido a las diferencias en la SG y en la progresión a LMA, esta subcategoría (Germing et al., 2006; Greenberg et al., 1997, 1998) se divide en: AREB-1 y AREB-2.

ANEMIA REFRACTARIA CON EXCESO DE BLASTOS 1 (AREB-1)

_ SP:

- _ Citopenia (s)
- _ <5% de blastos
- _ Sin bastones de Auer
- _ <1x10⁹/L monocitos

_ MO:

- _ Displasia uni- o multilínea
- _ 5%-9% de blastos
- _ Sin bastones de Auer

ANEMIA REFRACTARIA CON EXCESO DE BLASTOS 2 (AREB-2)

_ SP:

- _ Citopenia (s)
- _ 5%-19% de blastos
- _ ± presencia de bastones de Auer
- _ <1x10⁹/L monocitos

_ MO:

- _ Displasia uni- o multilínea
- _ 10%-19% de blastos
- _ ± presencia de bastones de Auer

Entre un 30% hasta un 50% de los casos con AREB presentan alteraciones citogenéticas clonales que incluyen la +8, -5, del(5q), -7, del(7q), del(20q) y los cariotipos complejos, siendo el cariotipo complejo el más frecuente en esta subcategoría (Germing et al., 2006).

La mediana de SG es aproximadamente de 16 meses en pacientes con AREB-1 y de 9 meses en pacientes con AREB-2. Ambas se caracterizan por una insuficiencia de la MO y el incremento de citopenias (Germing

et al., 2006), aun así, pacientes con un porcentaje de blastos entre un 5%-19% en SP presentan una mediana de supervivencia de 3 meses, similar a la de las LMA secundarias a SMD (Strupp et al., 2003). Por el contrario, pacientes clasificados como AREB-2 debido a la presencia de bastones de Auer tienen una mediana de supervivencia de 12 meses, parecida a los pacientes con AREB-1 y 2%-4% de blastos en SP. La progresión a LMA es aproximadamente del 25% de casos con AREB-1 y del 33% de casos con AREB-2. El resto fallece por insuficiencia medular (Strupp et al., 2003).

SÍNDROME MIELODISPLÁSICO CON DELECIÓN AISLADA 5q

_ SP:

- _ Anemia con o sin otras citopenias
- _ Cifra de plaquetas normal o incrementado
- _ Sin o <1% blastos

_ MO:

- _ Número de megacariocitos con núcleo hipolobulado normal o incrementado
- _ Delección aislada de 5q como alteración citogenética única
- _ Sin bastones de Auer

Esta subcategoría es más frecuente en mujeres de mediana edad (67 años), se caracteriza por una anemia con o sin otras citopenias y/o trombocitosis y por la presencia de la delección 5q como única alteración. El porcentaje de mieloblastos es menor al 1% y al 5% en SP y MO, respectivamente, y no presenta bastones de Auer (Boulwood et al., 1994; Giagounidis et al., 2005).

Normalmente cursa con una MO hiper celular o normocelular con frecuente hipoplasia eritroide (Washington et al., 2002). Los megacariocitos están incrementados en número y son normales o ligeramente más pequeños de tamaño y visiblemente hipolobulados o no lobulados (Figura 5). En cambio la displasia en la línea eritroide y granulocítica es poco frecuente (Boulwood et al., 1994; Giagounidis et al., 2005).

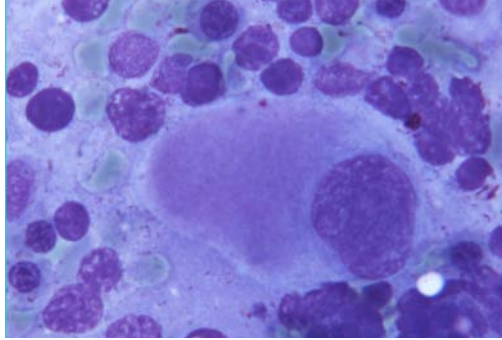


Figura 5_ Extensión de MO que muestra megacariocito de pequeño tamaño y mononucleado característico de la del(5q) (tinción May-Grünwald-Giemsa).

Estos pacientes presentan una SG de alrededor de 145 meses, una de las supervivencias más prolongadas de la clasificación de la WHO. La progresión a LMA se da en menos del 10% de pacientes. Aquellos pacientes con alteraciones acompañantes al 5q o con exceso de blastos quedan excluidos de esta subcategoría (Giagounidis et al., 2004a; Mallo et al., 2011).

Dentro de esta subcategoría se restringe la categoría morfológica del “**Síndrome 5q-**” (de la anterior clasificación, WHO 2001 (Jaffe et al., 2001)) asociada a un fenotipo clínico diferenciado que se describió por primera vez por Van Den Berghe y cols en 1974 (Van den Berghe et al., 1974). Presenta una alta incidencia en mujeres (Boulwood et al., 1994; Sokal et al., 1975). Se caracteriza por anemia macrocítica severa, cifra de plaquetas normal o elevada, cifra de neutrófilos normal o reducida, hipoplasia en MO y micromegacariocitos (Van den Berghe et al., 1974). El porcentaje de blastos es inferior al 1% y al 5% en SP y MO, respectivamente (Boulwood et al., 1994). El riesgo de progresión a LMA de estos pacientes es menor que otras subcategorías de SMD (5%-16% vs. 30%-45%, respectivamente). La principal causa de mortalidad de estos pacientes es debido a la sobrecarga férrica, por el alto número de transfusiones de concentrados de hematíes que reciben.

SÍNDROME MIELODISPLÁSICO INCLASIFICABLE (SMD-I)

_ **SP:**

- _ Citopenias
- _ $\leq 1\%$ blastos

_ **MO:**

- _ Displasia en $< 10\%$ de las células en una o más líneas mieloides cuando se acompañan de alteraciones citogenéticas que presentan evidencia del diagnóstico de SMD
- _ $< 5\%$ blastos

Subcategoría de SMD aplicable a aquellos pacientes que inicialmente no presenta los criterios diagnósticos de SMD. La incidencia y la SG son desconocidas (Knipp et al., 2008).

El grupo de pacientes incluidos en esta subcategoría son:

- _ Pacientes con características de CRDU o CRDM que presentan un 1% de blastos en SP (Knipp et al., 2008).
- _ Casos con SMD y displasia unilínea que están asociados a pancitopenia, que no se pueden incluir en la CRDU, ya que ésta sólo permite una o dos citopenias.
- _ Pacientes con citopenias persistentes con $\leq 1\%$ de blastos en SP y $< 5\%$ en MO y displasia evidente en $< 10\%$ de las células en una o más líneas mieloides y que presentan alteraciones citogenéticas sugestivas de SMD.

Aun así, en la validación de la revisión de la clasificación de la WHO 2008 en el año 2013 por Maassen y cols (Maassen et al., 2013), los pacientes que presentaban un diagnóstico más parecido a la CRDU o CRDM con un 1% de blastos en SP tenían una SG alrededor de los 35 meses y una probabilidad de progresar a LMA a los 5 años de un 13,9%. En casos con displasia unilínea asociada a pancitopenia presentaban una mediana de SG de 30 meses y una progresión a LMA a los 5 años del 17,6%. En este estudio recomiendan eliminar esta subcategoría y reclasificar a estos pacientes en el grupo de CRDM (Maassen et al., 2013).

Los pacientes clasificados como SMD-I deberían ser controlados más frecuentemente para poder detectar cambios que puedan permitir re-clasificarlos en una subcategoría más específica de SMD.

2.2.5 CARACTERÍSTICAS CITOGÉNÉTICAS DE LOS SMD

La **Citogenética convencional de bandas-G (CC)** se realiza en células en metafase y nos proporciona una visión completa del genoma, el cariotipo. Normalmente se evalúan un total de 20 metafases que pueden mostrar distintas alteraciones como ganancias, pérdidas, translocaciones, inversiones, etc (Solé et al., 2005). Estas alteraciones se definen de acuerdo con el *International System for Human Cytogenetics Nomenclature* (ISCN 2013, (Shaffer et al., 2013)). Una vez se interpretan las alteraciones se integran con la historia clínica y las características citológicas, siendo el cariotipo crucial en el diagnóstico y en la clasificación de los SMD y, a su vez, de gran importancia para establecer el pronóstico (García-Manero, 2014; Haase et al., 2007; Schanz et al., 2012; Solé et al., 2005).

Alrededor de un 50% de pacientes con SMD de novo presentan un cariotipo alterado (Haase et al., 2007; Schanz et al., 2011; Solé et al., 2005; Vallespí et al., 1998). Este porcentaje se eleva hasta el 80% en pacientes con SMD secundario¹ (Olney and Le Beau, 2007; Smith et al., 2003).

En general los SMD presentan alteraciones que implican la pérdida de material genético, ya sea en forma de deleciones o monosomías o mediante la ganancia de material genético total o parcial (trisomías) (Haase et al., 2007; Schanz et al., 2011; Solé et al., 2005; Vallespí et al., 1998). En menor frecuencia, podemos detectar translocaciones desequilibradas, sobretudo en cariotipos con múltiples alteraciones, que suponen la pérdida o ganancia de material genético (Haase, 2008; Haase et al., 2007; Solé et al., 2005). Así pues, parece que el mecanismo primario de

¹ SMD secundario_ Son debidos a quimioterapias (agentes alquilantes, inhibidores de topoisomerasas, análogos de la purina) o radioterapias (radiaciones ionizantes) previas. Estos pacientes generalmente presentan factores pronósticos adversos.

los SMD puede involucrar la pérdida o inactivación de un gen supresor de tumores, ya que parece que la activación de un oncogén es menos relevante en los SMD.

En la Figura 6 se puede observar la diversidad de alteraciones cromosómicas más comunes en los SMD.

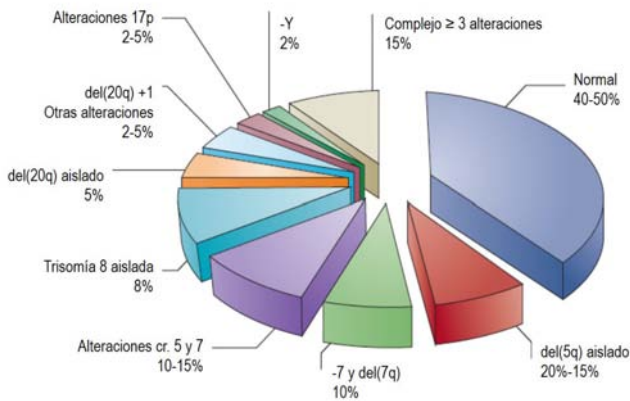


Figura 6_ Incidencia de las alteraciones cromosómicas en los SMD, adaptada de Raza y cols (Raza and Galili, 2012).

Las alteraciones citogenéticas únicas más comunes en los SMD son la deleción 5q (15%) (Gondek et al., 2008; Graubert et al., 2009; Heinrichs et al., 2009), la monosomía 7 o la deleción de 7q (10%) (Asou et al., 2009; Le Beau et al., 1996; Döhner et al., 1998), la trisomía 8 (8%) (Lim et al., 2007; Sloand et al., 2008), la deleción 20q (5%) (Bench et al., 2000; Wang et al., 2000) y la pérdida del cromosoma Y (2%), esta pérdida también se ha asociado a edades avanzadas (Haase, 2008; Haase et al., 2007; Nybakken and Bagg, 2014; Solé et al., 2005; Vardiman et al., 2009). Las alteraciones citogenéticas se pueden describir en tres situaciones, como alteración aislada, junto con otra alteración o formando parte de un cariotipo complejo².

Los cariotipos complejos se observan en un 15% de los pacientes con
 2 Cariotipo complejo en SMD_ Presencia de 3 o más alteraciones.

SMD y cariotipo alterado. Éstos pueden ser el resultado de un proceso con distintas fases que producen una acumulación secuencial de alteraciones (Haase, 2008). En ocasiones se puede establecer la **evolución clonal**, ya que detectamos clones celulares con alteraciones primarias y otros con alteraciones primarias y secundarias en función del momento en el que se realiza el estudio. Aun así, el primer estudio citogenético del paciente, ya puede presentar múltiples alteraciones citogenéticas y dificulta establecer esta relación (Schoch et al., 2005; Trost et al., 2006).

Las alteraciones citogenéticas se pueden detectar a distinta frecuencia según la subcategoría de la WHO en la que estén incluidas. Esta frecuencia se detalla en la Tabla 8 y fue descrita por Haase y cols en el año 2007 (Haase et al., 2007).

Tabla 8_ Frecuencia de las alteraciones citogenéticas según las subcategorías de la clasificación de la WHO, 2001(Jaffe et al., 2001).

Clasificación WHO 2001	Cariotipo					
	Normal	del (5q)	-7/del(7q)	+8	-20/del(20q)	Complejo
AR	67,9%	6,5%	10,9%	2,2%	2,2%	13%
ARSA	88,5%	0,0%	0,0%	3,8%	0,0%	0,0%
CRDM	53,7%	6,7%	12,2%	7,3%	4,8%	11,0%
AREB-1	45,7%	17,8%	11,1%	5,6%	4,4%	16,7%
AREB-2	49,6%	9,1%	6,6%	10,7%	4,1%	15,7%
SMD con del (5q) aislada	0,0%	100%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%

La inclusión de pacientes en esta tesis se ha basado en el estudio de la citogenética convencional. Los grupos que han centrado el estudio se describen a continuación.

CK VS. MK

El **cariotipo complejo (CK)** y el **cariotipo monosómico (MK)** se han definido para identificar dos subgrupos de pacientes que presentan un mal pronóstico.

Se define como **CK** a la presencia de 3 o más alteraciones (Greenberg et al., 1997, 1998, 2012; Haase et al., 2007; Malcovati et al., 2007). Este grupo, ha sido recientemente dividido por Schanz y cols (Schanz et al., 2012) en dos grupos en función del número de alteraciones, el CK que presenta 3 alteraciones y el cariotipo muy complejo que presenta más de 3 alteraciones, dado que estos dos grupos presentan una SG significativamente diferente (15,6 vs. 5,7 mediana en meses, respectivamente) (Figura 7a) y diferencias significativas en el riesgo de progresión a leucemia (*Hazard Ratio*¹ (HR) de 4,9 vs. 5,1, $P < 0,01$, respectivamente) (Figura 7b).

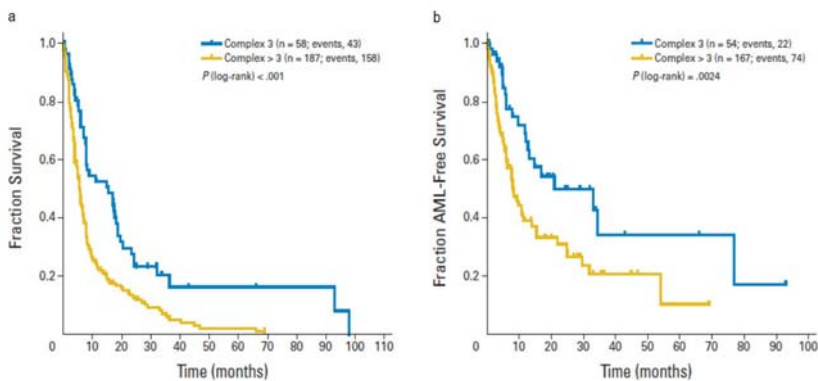


Figura 7_ a. Curva de SG b. Curva de SG libre de progresión leucemia en pacientes con un cariotipo complejo de 3 alteraciones y en pacientes con > 3 alteraciones (Schanz et al., 2012).

¹ Hazard Ratio_ En nuestro caso se refiere al incremento del riesgo de eventos terminales, es decir, la probabilidad incrementada de progresar a LMA.

El **MK** se describe por la presencia de dos o más monosomías de cromosomas autosómicos o por la monosomía de un cromosoma autosómico y una alteración estructural (Breems et al., 2008). Actualmente se discute si el efecto del MK es diferente en función de los cromosomas que conforman la monosomía.

El valor pronóstico independiente del MK en la SG y la supervivencia libre de progresión leucemia es controvertido (Belli et al., 2011; Breems et al., 2008; Patnaik et al., 2011; Vaidya et al., 2011) y la independencia en el pronóstico del MK no está del todo clara (Belli et al., 2011; Breems et al., 2008; Patnaik et al., 2011; Schanz et al., 2013; Vaidya et al., 2011). La controversia sobre el valor pronóstico del MK, reside en el hecho de que éste está frecuentemente incluido dentro del CK, que es el que realmente tiene una influencia negativa en la evolución de la enfermedad. En esta situación el MK no añade un peor pronóstico al paciente (Patnaik et al., 2011).

-7/7q-

Las alteraciones en el cromosoma 7, como la monosomía 7 (-7) o la deleción intersticial del brazo largo del cromosoma 7 (del(7q) o 7q-) se detectan aproximadamente entre un 5%-10% de pacientes con SMD de novo y en un 50% de SMD secundarios, en los que frecuentemente se acompaña de alteraciones en el cromosoma 5 (del(5q)) y mutaciones en el gen RUNX1 (Christiansen et al., 2004; Haase et al., 2007; Pedersen-Bjergaard et al., 2006).

La presencia de -7 o 7q-, es un marcador de mal pronóstico tanto en los SMD como en la LMA, ya que se asocia a una peor SG. Aun así, la del(7q) presenta un pronóstico más favorable que la monosomía 7 en términos de SG (20 vs. 15,8 mediana de meses, respectivamente) así como un menor riesgo de progresar a LMA con un HR 1,19 vs. 1,86,

$P < 0,05$, respectivamente. En la figura 8a se pueden observar las curvas de SG entre los pacientes que presentan la monosomía o la deleción del cromosoma 7, y la SG libre de progresión¹ a leucemia en la figura 8b (Schanz et al., 2012).

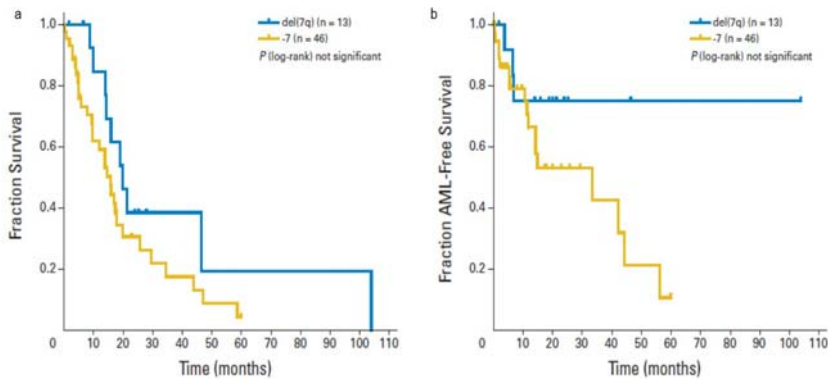


Figura 8_ a. SG y b. Supervivencia libre de progresión a leucemia en pacientes con del(7q) en comparación con los que presentan monosomía 7 (Schanz et al., 2012).

Estas alteraciones, han sido ampliamente estudiadas y, en el caso de la del(7q) se ha determinado una región comúnmente delecionada (CDR) en 7q22, en 7q32-33 y 7q35-36 (Le Beau et al., 1996; Fischer et al., 1997), lo que nos permite identificar genes candidatos a supresores de tumores (Le Beau et al., 1996). La del(7q) es normalmente de gran tamaño y la haploinsuficiencia² de unos cuantos genes que mapean en esta región puede contribuir a la patogénesis de la enfermedad. Aun así, se desconoce el mecanismo molecular que comporta la del(7q). Las mutaciones en genes localizados en 7q, pueden ser únicos y producir una inactivación hemicigota que podrá o no verse afectada por una expresión haploinsuficiente. Las mutaciones somáticas más recurrentes hasta la actualidad, y que suponen una expresión haploinsuficiente afectan a los genes: *CUX1* (7q22), *LUC7L2* (7q34) o *EZH2* (7q36).

De acuerdo con modelos animales mutaciones en el gen *CUX1* (7q22.1) (Boulwood, 2013; McNerney et al., 2013) parecen asociarse a NMP con

1 Supervivencia libre de progresión_ Mide el tiempo entre el diagnóstico y la progresión a leucemia.
2 Haploinsuficiencia_ situación en la cual la proteína producida por una sola copia de un gen normal, no es suficiente para garantizar una función normal.

una gran expansión de neutrófilos. Este gen codifica para un factor de transcripción que regula un gran número de genes y microARNs involucrados en la replicación del ADN, la respuesta al daño en el ADN y la progresión del ciclo celular (Hulea and Nepveu, 2012; Nepveu, 2001). *LUC7L2* (7q34) es una de las subunidades que interacciona con la subunidad U1 snRNP, que forma parte del spliceosoma, para poder reconocer zonas no consenso del splicing (Howell et al., 2007; Singh et al., 2013). La mayoría de mutaciones en este gen, codifican para un codón STOP prematuro (Hosono et al., 2014). Por último, *EZH2* (7q35-q36) se acostumbra a presentar en un contexto de CNN-LOH¹ y no en monosomía o deleción del cromosoma 7 (Makishima et al., 2010a). La pérdida de función de este gen también puede deberse a la haploinsuficiencia. Las mutaciones en este gen se han relacionado con la pérdida de la actividad catalítica (Ernst et al., 2010; Makishima et al., 2010a).

5q-

La deleción 5q es la alteración más común en los SMD, y se puede detectar aislada, acompañada de otra alteración (5%) o formando parte de un cariotipo complejo. Además sirve para definir una de las subcategorías de la WHO 2008 (SMD con deleción 5q aislada) (Swerdlow et al., 2008). La **deleción 5q (del(5q) o 5q-)** es una alteración muy heterogénea que presenta distintos tamaños, por lo que puede afectar un mayor o menor número de genes. El hecho de tener una única copia de los genes localizados en la zona delecionada o mutaciones somáticas localizadas en la zona retenida del cromosoma 5 no delecionado, implica que existen mecanismos patogénicos y, en definitiva, una heterogeneidad clínica de estos pacientes.

¹ CNN-LOH_ Copy Number Neutral LOH: La pérdida de heterocigosidad (LOH) es la pérdida de uno de los alelos de un gen. La CNN-LOH representa una pérdida de heterocigosidad sin cambio en el número de copias.

La deleción del brazo largo del cromosoma 5 (del(5q) o 5q-) , es una deleción intersticial². Está presente alrededor de un 20%-30% de los pacientes con cariotipo alterado. Esta alteración la podemos detectar aislada (15%), acompañada de otra alteración (5%) o formando parte de un cariotipo complejo (10%) (Ebert, 2010; Giagounidis et al., 2006; Heim and Mitelman, 1986; Mallo et al., 2011; Solé et al., 2000). Es una alteración muy heterogénea, ya que la región delecionada puede presentar distintos tamaños. Determinar la longitud de la zona delecionada será importante para limitar el número de genes involucrados y las consecuencias de disponer de una sola copia de un gen o presentar mutaciones en genes localizados en la región retenida (no delecionada) en el cromosoma 5. En última instancia toda esta información nos permitirá resolver la heterogeneidad clínica de estos pacientes.

Estudios anteriores han determinado que aunque la deleción 5q puede tener un tamaño variable normalmente presenta una **región comúnmente delecionada** (*common deleted region*, CDR), mínima necesaria para desarrollar el fenotipo clínico (Ebert, 2011; Horrigan et al., 2000; Zhao et al., 1997).

Podemos diferenciar dos CDR: una afecta una región más telomérica en 5q32-q33.2 y se relaciona con un mejor pronóstico y con el “Síndrome 5q-” (CDR1: Síndrome 5q-), y la otra más centromérica (5q31.2-5q31.3) que se asocia con un peor pronóstico, cariotipo complejo y alto riesgo (CDR2: SMD/LMA) (Figura 9) (Nybakken and Bagg, 2014). Hasta la actualidad no se ha descrito ningún paciente con una deleción bialélica en esta región (Gondek et al., 2008; Graubert et al., 2009; Heinrichs et al., 2009; Jerez et al., 2012; Mallo et al., 2013).

² Intersticial. Se producen dos puntos de rotura en el brazo del cromosoma, de manera que el material genético entre ellos está ausente y las partes restantes del cromosoma se fusionan.

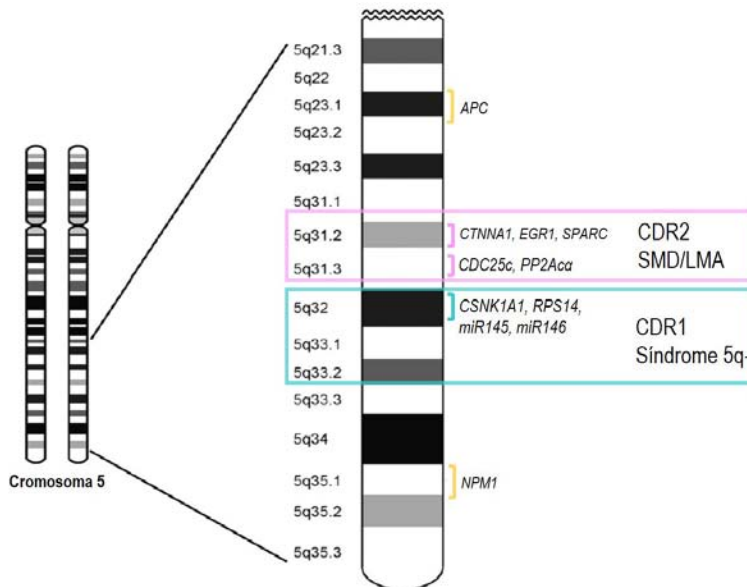


Figura 9_ Esquema de las CDR en el cromosoma 5q en SMD y los genes principales afectados, adaptado de Ebert y cols 2011 (Ebert, 2011).

Esta región fue definida por Boulwood y cols mediante FISH (Boulwood et al., 1994) y de esta manera se pudieron dirigir estudios moleculares a genes candidatos en esta región. Posteriormente Ebert y cols (Ebert et al., 2008), mediante ARN de interferencia estudiaron todos los genes localizados en la CDR1 (5q32-q33.2) de pacientes con “Síndrome 5q-” y demostraron la importancia de la haploinsuficiencia del gen *RPS14* (proteína ribosomal (gen *RPS14*¹ localizado en 5q32)), ya que presenta un papel importante en el desarrollo de la anemia que caracteriza al “Síndrome 5q-”.

La haploinsuficiencia de *RPS14* en células madre hematopoyéticas tiene como resultado un bloqueo en la diferenciación eritroide. Esto se debe a una biogénesis ribosomal defectuosa producida por la haploinsuficiencia de *RPS14*, que produce una liberación nuclear de proteínas

¹ *RPS14*_ Codifica para la proteína *RPS14* (Ribosomal protein S14), importante para el procesamiento del precursor ribosomal del ARN (pre-ARN) 18S y para la formación de la subunidad ribosomal 40S.

ribosomales. Estas se unen y promueven la degradación de MDM2, un regulador negativo clave del gen *TP53* (Barlow et al., 2010; Ferreira-Cerca and Hurt, 2009; McGowan et al., 2008). Esto produce una acumulación de la proteína p53, que promueve la acumulación de p21; esta acumulación produce el arresto del ciclo celular de los precursores eritroides y, por lo tanto, una eritropoyesis inefectiva (Boulton, 2011; Fang et al., 2000; McGowan et al., 2008; Panić et al., 2007). En la Figura 10 adaptada de Pellagatti y Boulton, se representa el resultado de la haploinsuficiencia de *RPS14* (Pellagatti and Boulton, 2015).

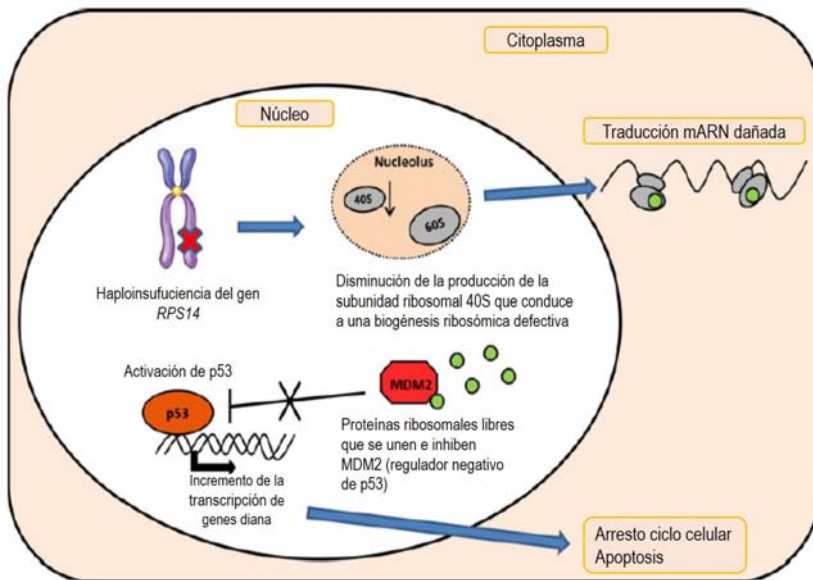


Figura 10_ Esquema del resultado de la haploinsuficiencia del gen *RPS14*. Adaptada de Pellagatti y Boulton (Pellagatti and Boulton, 2015).

Si se produce una expresión forzada del gen *RPS14* en células de MO primaria de pacientes con “Síndrome 5q-”, el fenotipo de los precursores eritroides se rescata, es decir se reestablece una eritropoyesis efectiva (Pellagatti et al., 2010; Wei et al., 2013). Además, estudios realizados en modelos murinos que presentan la haploinsuficiencia de *RPS14* y las características del “Síndrome 5q-” (incluyendo la anemia macrocítica) cuando se cruzan con ratones p53 deficientes, consiguen rescatar el

desarrollo ineficaz de los precursores eritroides en la MO. Así pues, se sugiere un mecanismo dependiente de *RPS14* y de p53 y la patofisiología del “Síndrome 5q-” (Barlow et al., 2010).

En pacientes con la del(5q) aislada, se detectan mutaciones en el gen *TP53* (17p13) entre un 7%-19% (Jädersten et al., 2009). Estas mutaciones suponen una pérdida de función de la proteína p53. Técnicas de secuenciación masiva o de nueva generación (NGS, Next-generation Sequencing) han permitido determinar subclones de células hematopoyéticas con mutaciones en *TP53*, en estadios iniciales de la enfermedad, en aproximadamente un 20% de los SMD. Las mutaciones en *TP53* se relacionan con un peor pronóstico, una peor SG y con un riesgo incrementado de progresión a LMA (Kantarjian et al., 2009; Mallo et al., 2011), ya que *TP53* podría estar involucrado en la evolución clonal de SMD con del(5q) a LMA. Además también se le relaciona con una posible resistencia al tratamiento con lenalidomida¹, tratamiento de primera línea en pacientes con SMD con del(5q) aislada (Fidler et al., 2004; Jädersten et al., 2011).

En la misma región que *RPS14* se encuentran dos genes de microARNs que codifican para *miR-145* y *miR-146a* (Figura 8) (Kumar et al., 2011; Starczynowski et al., 2010). La expresión de estos microARNs es menor en pacientes con SMD y 5q- que en otros pacientes con el cromosoma 5 intacto (Kumar et al., 2011; Starczynowski et al., 2010). Cuando ambos microARNs son bloqueados en células madre hematopoyéticas de ratones, se produce trombocitosis, ligera neutropenia y displasia megacariocítica (megacariocitos hipobulados) características del “Síndrome 5q-” (Starczynowski et al., 2010). Estos microARNs presentan dianas específicas, como reguladores de la respuesta inmune innata (*TIRAP*) y factores de necrosis tumoral (*TRAF6*). Al mismo tiempo, la disminución de la expresión de *miR-145* causa un incremento de los niveles de *FLI-1* que codifica para un factor de transcripción involucrado en la megacariopoyesis, que incrementa la producción de megacariocitos (Kumar et

¹ Lenalidomida_ Fármaco inmunomodulador con diversos mecanismos de acción que afectan directamente a los clones de SMD.

al., 2011; Starczynowski et al., 2010).

Recientemente, nuestro grupo ha participado en un proyecto que ha permitido describir un nuevo gen involucrado en esta enfermedad, y que se localiza en la CDR1, el gen *CSNK1A1* (5q32) que codifica para la caseína quinasa 1 α (CK1 α) y que presenta un papel central en la patogénesis de los SMD con 5q- (Schneider et al., 2014). Este gen ha sido descrito como un gen supresor de tumores en cáncer de colon y melanoma, controlando la proliferación por su papel central como regulador de la actividad de la β -catenina y de MDM2 (Figura 11a) (Elyada et al., 2011; Sinnberg et al., 2010). La β -catenina es responsable de la progresión del ciclo celular y la proteína MDM2 es responsable de la inactivación de p53.

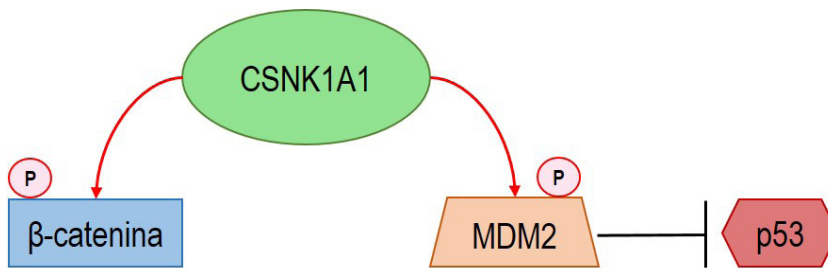


Figura 11a_ Esquema de actividad normal de *CSNK1A1*.

Se han identificado mutaciones en el gen *CSNK1A1* en un 7% de pacientes con SMD y 5q-. Estudios realizados en modelos murinos demuestran que la inactivación heterocigota de *Csnk1a1* (Figura 11b) causa la expansión de células madre hematopoyéticas, lo cual sugiere que la haploinsuficiencia de *CSNK1A1* puede ser un mecanismo indicador de la expansión clonal en pacientes con “Síndrome 5q-”. Además, esta haploinsuficiencia sensibiliza las células a inhibidores de caseína quinasa, indicando que *CSNK1A1* es una potencial diana terapéutica para pacientes con SMD y 5q- (Schneider et al., 2014).

En cambio, deleciones homocigotas en *Csk1a1* (Figura 11c) suponen

una acumulación de p53, una disminución significativa de las cifras hemoperiféricas en SP (aumento del arresto del ciclo celular e incremento de la apoptosis) que evidencia la insuficiencia de la MO y un desenlace fatal a corto plazo (Schneider et al., 2014). Así pues, la ablación completa de *Csnk1a1* conduce a apoptosis celulares tempranas y tardías.

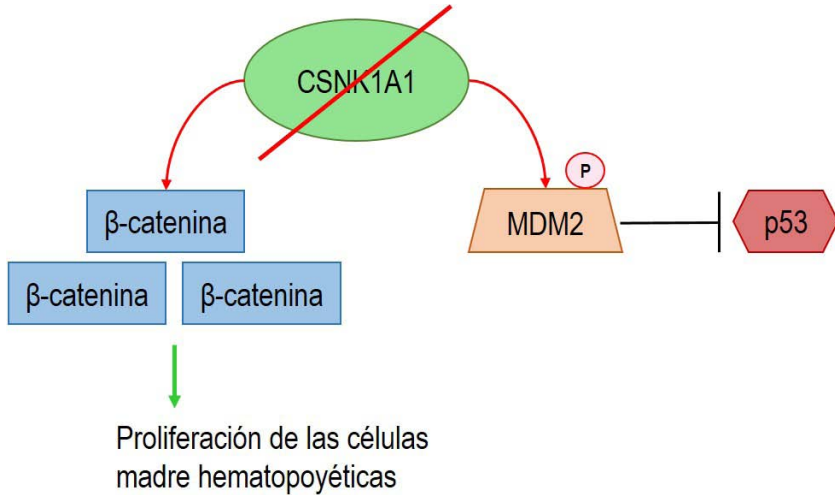


Figura 11b_ Esquema del efecto de la delección heterocigota de *CSNK1A1*.

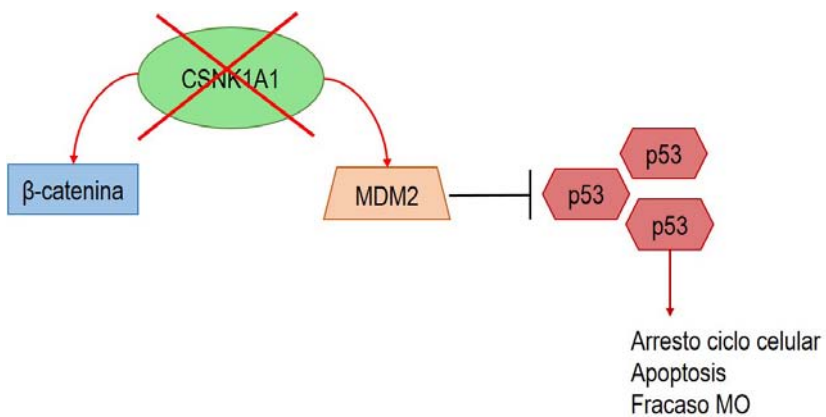


Figura 11c_ Esquema del efecto de la delección homocigota de *CSNK1A1*.

La CDR2 (5q31-q33) se relaciona con pacientes de peor pronóstico, e incluye otros genes candidatos como el factor de transcripción *EGR1* (5q31.2). En modelos murinos, la inactivación heterocigota de *egr1* muestra un incremento en la proliferación y movilización de células madre hematopoyéticas en MO, por lo que se piensa que este gen puede tener un papel funcional en la patogénesis de los SMD o LMA con 5q- (Joslin et al., 2007). Otro gen localizado en esta región es *SPARC* (5q31.3q32), es un gen supresor de tumores que codifica para factores reguladores de la interacción célula-estroma con una función anti-adhesiva, que promueve la apoptosis. La haploinsuficiencia de *SPARC* incrementa la adhesión de las células malignas proporcionando una ventaja proliferativa de la clona 5q-. Los niveles de expresión de *SPARC* se ven incrementados durante el tratamiento con la lenalidomida, hecho que permite restaurar su actividad apoptótica (Boulwood et al., 2007; Pellagatti et al., 2007; Raaijmakers et al., 2010). Otro supresor de tumores localizado en CDR2 es *CTNNA1* (5q31.2) que presenta una expresión reducida o ausente (Liu et al., 2007) debido al silenciamiento epigenético, que proporciona una ventaja proliferativa en pacientes con SMD/LMA y 5q- (Kask et al., 2011), además esta pérdida de expresión también se ha asociado a la progresión leucémica o a la transformación de SMD a LMA (Hemmat et al., 2014).

En esta región también encontramos dos reguladores clave en la fase G2 del ciclo celular *PP2A α* (5q31.1) y *CDC25c* (5q31.3). En haploinsuficiencia la regulación del ciclo celular queda alterada permitiendo la supervivencia y la proliferación, a la vez que sensibiliza estas clonas a la acción de la lenalidomida, reforzando la detención del ciclo celular en G2 y la apoptosis (Wei et al., 2009). Otros estudios han determinado que los pacientes no respondedores a la lenalidomida presentan una sobreexpresión de *CDC25c* y de *PP2A α* (Wei et al., 2009).

Otros genes descritos en el cromosoma 5 pero no en las CDR también tienen importancia en las neoplasias mieloides. El gen *APC* (5q23) se encuentra deletado en más del 95% de los casos con SMD y 5q-, y actúa como regulador negativo de la β -catenina (Lane et al., 2010). Otro

gen frecuentemente mutado en LMA es *NPM1* (5q35). La haploinsuficiencia de *NPM1* causa defectos eritroides e inestabilidad genómica (Falini et al., 2005; Grisendi et al., 2005).

Así pues, parece ser que múltiples eventos genéticos son necesarios para el desarrollo del “Síndrome 5q-” (Boulwood et al., 2010).

2.2.6 PRONÓSTICO DE LOS SMD

Los SMD se caracterizan por una alta heterogeneidad, que se refleja en una amplia variedad de manifestaciones hematológicas, que a la vez presentan diferencias importantes en la SG y progresión a LMA (Raza and Galili, 2012). Mientras que algunos pacientes pueden morir en pocos meses después del diagnóstico (debido a complicaciones por una MO ineficaz o por la progresión a LMA) otros presentan un curso estable y sobreviven muchos años (Corey et al., 2007). Estas diferencias hacen necesario un sistema de evaluación del riesgo para cada paciente, combinando distintas características con pronóstico independiente, en el caso de los SMD es el IPSS o *International Prognostic Scoring System*.

2.2.6.1 *International Prognostic Scoring System (IPSS)*

En el año 1997 el *International MDS Risk Analysis Workshop (IMRAW)* desarrolló un nuevo sistema de estratificación para predecir la supervivencia y el riesgo de progresión a LMA en pacientes con SMD (Greenberg et al., 1997, 1998). Este sistema fue el resultado de la combinación de la citogenética, citopenias y una mejor subdivisión del porcentaje de blastos en MO, que permitió diferenciar 4 grupos con pronóstico diferenciado.

Se estudiaron retrospectivamente 816 pacientes con SMD *de novo* sin tratamiento previo y con un largo periodo de seguimiento. Se incluyeron las variables de edad, sexo, clasificación de la FAB, número de citopenias, valores de hemoglobina, recuento absoluto de neutrófilos, cifra absoluta de plaquetas, porcentaje de blastos en MO, citogenética y la

clasificación del riesgo de Lille y la Española (Morel et al., 1993; Sanz et al., 1989). El análisis multivariado permitió determinar que las características clínicas con valor pronóstico independiente y significativo en el pronóstico de los pacientes, como el porcentaje de blastos, el número de citopenias y la citogenética, y así otorgar una puntuación o score (Tabla 9) (Greenberg et al., 1997, 1998). La citogenética, además se subdividió en tres grupos pronósticos:

- _ Bueno: cariotipo normal, -Y, del(5q), del(20q), todas como alteración única
- _ Malo: cariotipo complejo (≥ 3 alteraciones) o alteraciones en el cromosoma 7
- _ Intermedio: todas las otras alteraciones

Tabla 9 _ Puntuación para las variables con valor pronóstico independiente en la SG y riesgo de progresión a LMA en pacientes con SMD.

Variable pronóstica	Valores de puntuación				
	0	0,5	1,0	1,5	2,0
% blastos en MO	< 5	5 - 10	-	11 - 20	21 - 30
Cariotipo	Bueno	Intermedio	Malo	-	-
Citopenias	0/1	2/3	-	-	-

Aunque la edad no retuvo su independencia pronóstica en el análisis multivariado, si resultó importante en pacientes clasificados de Bajo riesgo o Intermedio-1, ya que los menores de 70 años presentaban mejor SG, pero no menor probabilidad de progresión a LMA.

Así el IPSS determinó 4 grupos pronóstico: Bajo, Intermedio-1, Intermedio-2 y Alto riesgo con diferente SG y riesgo de progresión a LMA (Tabla 10).

Tabla 10_ IPSS, grupos pronósticos de riesgo.

Grupo de riesgo	Puntuación Total
Bajo	0
Intermedio -1	0,5 - 1,0
Intermedio -2	1,5 - 2,0
Alto	≥ 2,5

El valor pronóstico del IPSS ha sido evaluado y validado de manera independiente por muchos grupos (Haase et al., 2007; Müller-Berndorff et al., 2006; Solé et al., 2000) y ha sido el sistema de estratificación más utilizado para pacientes con SMD hasta la aparición de su versión revisada (*IPSS-Revised (IPSS-R)*) en el año 2012 (Greenberg et al., 2012).

2.2.6.2 WHO Classification-based Prognostic Scoring System (WPSS)

Aunque el IPSS gozó de gran aceptación y aplicabilidad presentaba ciertas limitaciones:

_ Se basaba en datos recogidos al diagnóstico y no se podía utilizar para el seguimiento o progresión (Greenberg et al., 1997, 1998)

El porcentaje de blastos era la variable más importante, haciendo que pacientes con citogenéticas muy desfavorables y pocos blastos presentaran puntuaciones más bajas

_ Un 30% de los pacientes presentaba un cariotipo intermedio, ya que eran pocas las alteraciones con un pronóstico determinado, y muchas las que se incluían en el grupo intermedio

_ La clasificación de referencia fue la FAB y no la WHO, que es la más utilizada

Así pues se define una nueva estratificación del riesgo basada en la clasi-

ficación de la WHO y dependiente del tiempo en el año 2007, la *WPSS* o *WHO Classification-Based Prognostic Scoring System* (Malcovati et al., 2007). Para desarrollar esta nueva clasificación todos los diagnósticos de los pacientes se reclasificaron de acuerdo con los criterios de la WHO y se recogió el historial transfusional (Malcovati et al., 2005). Las variables utilizadas fueron:

- _ Categoría de la WHO 2001
- _ Grupo de riesgo citogenético (grupos citogenéticos del IPSS)
- _ Necesidades transfusionales (posible factor indicador de la gravedad de la enfermedad) (Deschler et al., 2006)

La combinación de estas variables con una puntuación determinada (Tabla 11), para cada grupo, permite clasificar a los pacientes (Tabla 12) y predecir la SG y el riesgo de progresión a LMA.

La mejora más significativa, se observó en los pacientes con exceso de blastos, debido a la fuerte influencia de la inclusión de la dependencia transfusional. El WPSS también fue capaz de identificar un grupo de pacientes con muy mal pronóstico, aunque el punto de corte de los blastos en la MO era inferior en la WHO para definir la LMA (Vardiman et al., 2002).

Tabla 11 _ Valores de estratificación mediante la WPSS.

Variable pronóstica	Valores de puntuación			
	0	1	2	3
Clasificación WHO 2001	AR, ARSA, Síndrome 5q-	CRDM, CRDM-SA	AREM-1	AREB-2
Cariotipo	Bueno	Intermedio	Malo	-
Requerimiento transfusional *	No	Regular	-	-

* Requerimiento transfusional: mínimo de 1 transfusión de concentrado de hematíes cada 8 semanas en un periodo de 4 meses.

Tabla 12_ WPSS, grupos pronósticos de riesgo

Grupo de riesgo	Puntuación Total
Muy Bajo	0
Bajo	1
Intermedio	2
Alto	3 - 4
Muy Alto	5 - 6

La WPSS es un modelo dinámico que permite evaluar la efectividad de los tratamientos en cualquier momento después del diagnóstico, de manera que un paciente clasificado en un grupo de riesgo se mantiene en este riesgo si las condiciones no cambian y cambiará de grupo en el momento de la progresión de acuerdo con las nuevas características y puntuación asignada (Malcovati et al., 2007).

2.2.6.3 Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R)

En el año 2012 se publica la revisión del IPSS *Revised International Prognostic Scoring System, IPSS-R* (Greenberg et al., 2012) que mejora la clasificación del IPSS e incrementa el número de grupos, con influencia pronóstica, así como nuevos grupos citogenéticos (más grupos y más alteraciones) (Schanz et al., 2011, 2012).

El IPSS-R se basa en 5 grupos y no 4 como el anterior, así incrementa el poder predictivo en la SG (Figura 12a) y el riesgo de progresión a LMA (Figura 12b) (Greenberg et al., 1997, 1998). Las puntuaciones establecidas por cada uno de los 5 grupos, la puntuación final y el grupo de riesgo se detallan en las Tablas 13, 14 y 15.

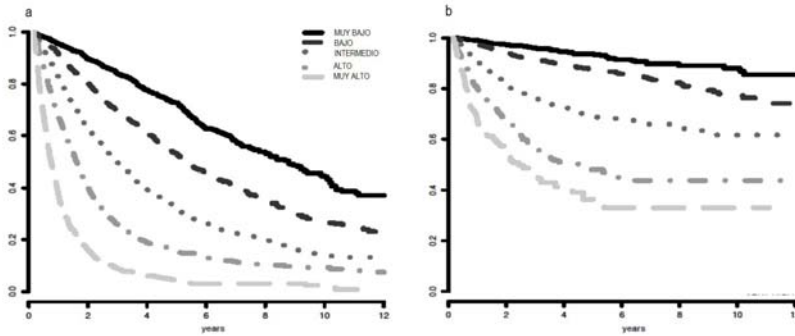


Figura 12_ a. SG basada en los grupos de riesgo del IPSS-R; b. Riesgo de progresión a LMA basada en los grupos de riesgo del IPSS-R.

Tabla 13_ SG y riesgo de progresión a LMA de los diferentes grupos de riesgo de acuerdo con el IPSS-R, adaptado de Greenberg y cols (Greenberg et al., 2012).

		Muy Bajo	Bajo	Intermedio	Alto	Muy Alto
Número Pacientes	7.012	19	38	20	13	10
SG		8,8	5,3	3,0	1,6	0,8
Hazard Ratio		0,5	1,0	2,0	3,2	8,0
(95% CI)		(0,46 - 0,59)	(0,93 - 1,1)	(1,8 - 2,1)	2,9 - 3,5)	(7,2 - 8,8)
Número Pacientes	6.485	19	37	20	13	11
LMA/25% *		NP	10,8	3,2	1,4	0,73
Hazard Ratio		0,5	1,0	3,0	6,2	12,7
(95% CI)		(0,4 - 0,6)	(0,9 - 1,2)	(2,7 - 3,5)	(5,4 - 7,2)	10,6 - 15,2)

* Indica el tiempo en el que el 25% de los pacientes han progresado a LMA. NP: no alcanzan progresión.

Tabla 14_ IPSS-R, parámetros de riesgo.

Variable Pronóstica	Puntuación						
	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Citogenética	Muy Buena	-	Buena	3,0	Inter-medio	Malo	Muy Malo
% blastos MO	≤ 2%	-	< 2% - <5%	-	5 - 10%	> 10	-
Hemoglobina	≥ 10	-	8 - < 10	< 8	-	-	-
Plaquetas	≥ 100	50 - <100	< 50	-	-	-	-
RAN *	≥ 0,8	< 0,8	-	-	-	-	-

* RAN: Recuento absoluto de neutrófilos.

Tabla 15_ IPSS-R, grupos pronósticos de riesgo.

Grupo de riesgo	Puntuación Total
Muy Bajo	≤ 1,5
Bajo	> 1,5 - 3
Intermedio	> 3 - 4,5
Alto	> 4,5 - 6
Muy Alto	> 6

Con la nueva clasificación los pacientes que presentaban un mejor pronóstico en el riesgo Intermedio-1 del IPSS pasan a formar parte del grupo de bajo riesgo del IPSS-R, y los que presentaban un peor pronóstico en el grupo Intermedio-2 (IPSS) pasan a formar parte del grupo de alto riesgo. Las diferencias básicas entre IPSS-R e IPSS son:

_ Blastos en MO: se dividen en nuevos grupos, que permiten categorizar mejor al paciente: ≤ 2%, > 2%-< 5%, 5-10%, >10-30% (Della Porta et al., 2011). En el IPSS-R, se incluyen en un mismo grupo los pa-

cientes con más de un 10% de blastos y 20% de blastos, ya que su valor pronóstico era similar, de acuerdo con la base de datos de IMRAW¹, que es la base de datos utilizada en el IPSS.

Alteraciones citogenéticas: se clasifican 19 alteraciones específicas (vs. 6 alteraciones en el IPSS) que se subdividen en 5 grupos (vs. 3 grupos en el IPSS) (Tabla 16): el incremento del número de pacientes estudiados permitió caracterizar alteraciones citogenéticas que antes se habían clasificado como “otras” y a la vez subdividir el grupo de Buen pronóstico en *Muy bueno* y *Bueno* y el grupo de mal pronóstico en *Malo* y *Muy malo*. Esta nueva clasificación está basada en un estudio cooperativo Alemán-Español (Schanz et al., 2011) sobre una serie de 2902 pacientes de los cuales 1258 presentaban alteraciones cromosómicas clonales. Así, se definieron un total de 19 alteraciones citogenéticas clasificadas en 5 grupos pronóstico (Tabla 14) (Schanz et al., 2011, 2012).

Tabla 16_ Clasificación pronóstica de las alteraciones citogenéticas.

Grupo Pronóstico					
Muy Bueno	Bueno	Intermedio	Malo	Muy Malo	
Única: del (11q) - Y	Normal única: del (5q) del (12p) del (20q) Doble con del (5q)	Única: del (7q) 8 i (17q) 19 Clones independientes Otras dobles	Única: inv(3) / t(3q) del(3q) -7 Doble con: - 7 o del (7q) Complejo de 3 alteraciones	Complejo de < 3 alteraciones - -	
60,8 0,5 (0,3 - 0,7)	48,6 1,0 (0,9 - 1,1)	26,0 1,6 (1,4 - 1,8)	15,8 2,6 (2,1 - 3,2)	5,9 4,2 (3,4 - 5,2)	SG * Hazard Radio
NP	NP	78,0 2,2 (1,8 - 2,7)	21,0 3,4 (2,5 - 4,6)	8,2 4,9 (3,6 - 6,7)	LMA * Hazard radios

* SG y riesgo de progresión a LMA expresado en mediana de meses. NP: No alcanzan progresión.

La nueva clasificación citogenética mejora la clasificación anterior para los pacientes con SMD de novo que no hayan recibido tratamiento. Cada grupo queda potenciado por unas alteraciones citogenéticas concretas y nos permite separar y clasificar mejor las alteraciones únicas y dobles.

Estudios recientes han validado la aplicabilidad de esta clasificación citogenética en pacientes con SMD que reciben un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (Deeg et al., 2012), de manera que los pacientes con un cariotipo complejo (en el grupo *Muy Mal pronóstico*) presentan una peor evolución.

_ Evaluación de las citopenias: el establecimiento de puntos de corte relevantes en la clínica y estadísticamente significativos ha demostrado ser útil en:

_ El grado de anemia que correlaciona con un peor pronóstico en los SMD (Kao et al., 2008) y parece ser una buena variable para sustituir al parámetro dependencia transfusional (Malcovati et al., 2011), de manera que niveles bajos de hemoglobina sustituyen la dependencia transfusional como parámetro pronóstico del índice WPSS.

_ La cifra absoluta de neutrófilos queda fijado en $0,8 \times 10^9/L$, ya que se asocia a un riesgo de infección más elevado en pacientes con SMD (respecto al valor fijado por el IPSS de $1,8 \times 10^9/L$) (Cordoba et al., 2012).

_ Las trombocitopenias severas se asocian a peores supervivencias en los SMD ($<50 \times 10^9/L$) (Gonzalez-Porras et al., 2011; Kantarjian et al., 2007).

_ Inclusión de nuevas características relevantes: edad, estado general, ferritina sérica, LDH, β_2 -microglobulina y mielofibrosis:

_ La edad es un parámetro con influencia en la SG, sobretodo en pacientes de bajo riesgo, pero que no influye en el riesgo de progresión a LMA (Greenberg et al., 1997, 1998; Nösslinger et al., 2010). El IPSS-R creó una fórmula: $[(\text{años} - 70) \times (0,05 - (\text{valor de la puntuación final IPSS-R} \times 0,005))]$ para ajustar el pronóstico de la supervivencia de pacientes con edades superiores o inferiores a 70 años (ya que ésta es la mediana de edad de los pacientes que se incluyen en el estudio).

_ El estado general, la ferritina sérica, LDH (Germing et al., 2005; Wimazal et al., 2001, 2008) y la β_2 -microglobulina (Gatto et al.,

2003; Neumann et al., 2009) tienen una influencia en la SG, pero menos importante que el que ejercen las otras variables.

— La mielofibrosis en MO tampoco demostró tener un valor pronóstico en la evolución clínica de estos pacientes, pero el número de pacientes estudiado fue bajo (Buesche et al., 2008; Della Porta et al., 2009; Verburch et al., 2003).

Los grupos más altos de esta serie de pacientes estudiados en el IPSS-R presentan mayor riesgo de muerte relacionada con leucemia. Además, se observa que las complicaciones relacionadas con la insuficiencia medular son más importantes en la progresión o muerte de pacientes de bajo riesgo y la progresión a LMA es importante en los pacientes de alto riesgo.

2.2.7 MUTACIONES SOMÁTICAS EN LOS SMD

Los SMD se relacionan con alteraciones citogenéticas recurrentes, pero un 50% de los pacientes presenta un cariotipo normal (Haase et al., 2007). Ambos grupos de pacientes (con y sin alteraciones citogenéticas) seguramente presentan mutaciones genéticas, pero éstas adquieren más relevancia cuando el cariotipo no es informativo (Bejar et al., 2011a, 2011b; Walter et al., 2011; Yoshida et al., 2011). Por ello es necesario realizar estudios moleculares que permitan analizar alteraciones genéticas con una mayor resolución, como pueden ser los SNP-arrays, la secuenciación clásica de Sanger y las técnicas de *Next-generation Sequencing* (NGS) (Bejar et al., 2011b; Walter et al., 2011; Yoshida et al., 2011).

En la última década se han estudiado ampliamente las mutaciones somáticas en los SMD, por lo que actualmente contamos con más de 40 genes mutados y recurrentes en los SMD y uno o más de uno se puede identificar en casi el 90% de pacientes (Kulasekararaj et al., 2013; Papaemmanuil et al., 2013). Aun así, y a diferencia de otras patologías (como por ejemplo, en las NMP con mutaciones conocidas en los genes *JAK2*, *CALR* y *MPL*) no hay ninguna mutación que sea dominante y específica de los SMD. Actualmente podemos entender que las mutaciones se relacionan con características de la enfermedad, como puede ser con los sideroblastos en anillo, con las citopenias, la monocitosis y las alteraciones cromosómicas. Numerosos estudios han validado el pronóstico independiente de las mutaciones en genes recurrentes

así como mutaciones que actúan como biomarcadores de respuesta a tratamientos específicos (Bejar et al., 2014; Itzykson et al., 2011; Steensma et al., 2015; Traina et al., 2014). Todos estos nuevos datos genéticos están cambiando la comprensión de la fisiopatología de los SMD.

Las **mutaciones somáticas** se producen en el genoma de las células madre hematopoyéticas (HSC, *Hematopoietic Stem Cell*) en una frecuencia baja pero detectable durante la replicación normal del ADN. Aunque hay muchas mutaciones que son rápidamente corregidas por los sistemas de reparación del ADN, hay otras que persisten en las HSC y se propagan a lo largo de los ciclos de autorenovación. Las HSC acumulan mutaciones exónicas con una tasa aproximada de 0,13 mutaciones por año (es decir 1,3 mutaciones cada 10 años), por lo tanto a los 60 años se habrán acumulado un total de 8 mutaciones (aproximadamente) con potencial para alterar la secuencia de ADN que codifica para una proteína determinada (Welch et al., 2012). Las “*driver mutations*” son mutaciones en células con capacidad de autorenovación que pueden causar una ventaja proliferativa respecto a otras células y proporcionar una dominancia clonal. Otras mutaciones que no presentan un impacto en la dominancia clonal se conocen como “*passenger mutations*”. La recurrencia de mutaciones somáticas en un gen en particular, con una frecuencia más elevada de lo que esperaríamos, nos proporciona información sobre su papel en la evolución de la enfermedad (Greaves, 2015; Greaves and Maley, 2012; Vogelstein et al., 2013). Los genes mutados en los SMD se clasifican según la función de la proteína que codifican (Tabla 17). Los genes que encontramos más frecuentemente mutados codifican para factores de *splicing*¹ como *SF3B1* (sobretudo asociado a SA), *U2AF1*, *ZRSR2*, *SRSF2*, *SF3A1*, *PRF40B* y *U2AF2* (Graubert et al., 2012; Papaemmanuil et al., 2011; Yoshida et al., 2011). También encontramos mutaciones en reguladores epigenéticos² que incluyen los genes *TET2*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*, *ASXL1*, *ATRX* y *EZH2*. Factores de transcripción³ como los genes *RUNX1* (asociado a

1 Factor de splicing_ Proteína involucrada en eliminar los intrones de la cadena del ARN mensajero, de manera que los exones quedan unidos. Este proceso se desarrolla en el spliceosoma.

2 Regulador epigenético_ Modificador de la expresión de genes o del fenotipo celular sin alterar la secuencia del ADN, es decir, que unen de manera covalente un grupo metilo.

3 Factor de transcripción_ Proteína que participa en la regulación de la transcripción del ADN pero que no forma parte de la ARN polimerasa.

trombocitopenia) y *ETV6* (Bejar et al., 2011b; Christiansen et al., 2004; Ernst et al., 2010; Kosmider et al., 2010; Nikoloski et al., 2010; Walter et al., 2011) y mutaciones que permiten la activación de la señal de las tirosina quinasas como *JAK2*, *NRAS/KRAS*, *PTPN11*, *MPL* y *CBL/CBLB* (Hirai et al., 1987; Liu et al., 1987; Loh et al., 2005; Sanada et al., 2009; Steensma et al., 2005). Además, como en muchas otras neoplasias, se han observado mutaciones del gen *TP53* asociado a cariotipos complejos, neoplasia relacionada con el tratamiento y disgranulopoyesis (Jädersten et al., 2011; Sugimoto et al., 1993).

La mayoría de mutaciones en los SMD también son comunes en otras neoplasias mieloides y, seguramente contribuyen a una ventaja selectiva del clon neoplásico. Hay un grupo de mutaciones en genes frecuentemente mutados en la LMA *de novo* que son relativamente raros en los SMD y que incluyen mutaciones en genes como *NPM1*, *CEBPA*, *WT1* y *FLT3* (Vainchenker et al., 2011). Las mutaciones en los genes *JAK2* y *MPL* son más comunes en NMP que en SMD y las mutaciones que interrumpen la diferenciación, como por ejemplo en el gen *RUNX1* y en el gen *SF3B1* son más comunes en SMD que en NMP (Yoshida et al., 2011).

Aunque la relación entre determinadas mutaciones somáticas y los SMD ha sido comprobada, estudios recientes de secuenciación a gran escala han determinado hematopoyesis clonales debido a la adquisición de mutaciones somáticas en personas sin enfermedades hematológicas (Genovese et al., 2014; Jaiswal et al., 2014; Xie et al., 2014). Jaiswal y cols (Jaiswal et al., 2014) observaron un elevado porcentaje de mutaciones somáticas en los genes *DNMT3A*, *TET2* y *ASXL1* en hematopoyesis clonales de personas con recuentos hematológicos normales, sin ninguna enfermedad aparente y que no desarrollaron ningún cáncer en un periodo de tiempo cercano. En este estudio, determinaron que la asociación de mutaciones somáticas con enfermedades no hematológicas, pueden deberse a consecuencias asociadas a la edad o a variables desconocidas actualmente. Es por eso que no recomiendan un estudio genético prematuro en personas sanas, ya que el valor predictivo de estas mutaciones para presentar un cáncer o desarrollarlo es baja (Jaiswal et al., 2014).

Tabla 17_ Mutaciones somáticas en los SMD, adaptado de Adés y cols (Adés et al., 2014), Lindsley y Ebert (Lindsley and Ebert, 2013), Davids y Steensma (Davids and Steensma, 2010) y.

Mutación genética	Localización cromosómica	Frecuencia en los SMD	Función	Pronóstico	Fenotipo clínico
<i>Maquinaria Splicing</i>					
SF3B1	2q33.1	15-30% SMD y 65% SMD-SA	Proteína esencial para el ensamblaje del <i>spliceosoma</i>	Buen pronóstico Bajo riesgo de progresión a LMA	Asociado a la presencia de SA
SRSF2	17q25.1	10 - 15%	Proteína esencial para el ensamblaje del <i>spliceosoma</i>	Peor SG Mayor riesgo de progresión a LMA	Asociado con CRDM y AREB Más común en la LMMC (40%) donde puede estar co-mutado con <i>TET2</i>
U2AF1	21q22.3	8 - 12%	Proteína esencial para el ensamblaje del <i>spliceosoma</i> . Detención ciclo celular	Mayor riesgo de progresión a LMA	Asociado a CRDM o AREB
ZRSR2	Xp22.1	5 -10%	Proteína esencial para el ensamblaje del <i>spliceosoma</i>	No definido	En el cromosoma X; normalmente se detecta más mutado en hombres
<i>Regulación Epigenética</i>					
TET2	4q24	20 -25%	Hidroximetilación del ADN: conversión defectuosa de 5-metilcitosina a 5- hidroximetilcitosina (requerido por la mielopoiesis), incremento de la autorenovación	No se ha descrito impacto en la SG, pero predice la respuesta a agentes hipometilantes	Elevada frecuencia de mutación (50-60%) en LMMC. También es común en LMA, MIP y neoplasias linfoides Zona susceptible a presentar CNN-LOH
DNMT3A	2p23.3	12 -18%	Metilación del ADN: establecimiento inicial de los patrones de metilación y regeneración del ADN hemimetilado durante la replicación	Peor pronóstico, SG disminuida y mayor riesgo de progresión LMA	En la mayoría de SMD, co-mutado con SF3B1 en ARSA (la presencia de SF3B1 mitiga su efecto negativo). Común en LMA (25%)

IDH1 / IDH2	2q33.3 15q26.1	2 - 5%	Hidroximetilación del ADN y modificación de las histonas. Producción del oncometabolito 2-hydroxiglutarato, inhibición de la función de la proteína <i>Tet2</i>	Diferenciación defectuosa, clínica desfavorable	Asociado a CRDM y AREB. En LMA alrededor del 20%
ASXL1	20q11.2	15 - 25%	Modificación de histonas	Asociado a peor pronóstico en neoplasias mieloides (SMD, SMD/NMP, NMP) Normalmente monoalélico	Asociado a CRDM o AREB, elevada frecuencia (40%) en LMMC Presente en LMA
EZH2	7q36.1	5 - 10%	Modificador de histonas: disminución H3K27me3	Peor evolución clínica en todas las neoplasias mieloides	Asociado a CRDM o AREB. Más común en LMMC (12%). Normalmente bialélico o susceptible a CNN-LOH
Factores de Transcripción					
RUNX 1	21q22	10 - 15%	Deferenciación defectuosa	Peor pronóstico. Aparece en estadios más avanzados de la enfermedad (blastos elevados y plaquetas bajas)	Asociado a CRDM o AREB y en pacientes con SMD secundario
ETV6	12p13.2	2 - 5%	Deferenciación defectuosa	Diferenciación defectuosa	En algunos casos puede ser una mutación germinal
TP53	17p13.1	5 - 12% > 20% en riesgo alto	Respuesta al daño en el ADN defectuosa, inestabilidad genómica asociada a cariotipo complejo y cromotripsis	Peor pronóstico y menor SG, mayor riesgo de progresión a LMA. Asociado a etapas avanzadas de la enfermedad (blastos elevados y plaquetas bajas) y a cariotipos complejos. Predice peor respuesta al tratamiento con lenalidomida	Mutado en un 7-19% de pacientes con SMD con del(5q) aislada
BCOR/BCOR-L1	Xp11.4	5 - 6 %	Represor transcripcional	Asociado a peor pronóstico	Asociado a CRDM o AREB

Mutación genética	Localización cromosómica	Frecuencia en los SMD	Función	Pronóstico	Fenotipo clínico
Senyalización por quinasas					
NRAS/ KRAS	1P13.2 12P12.1	5 - 10%	Activación señalización quinasas	Peor pronóstico, blastos elevados, plaquetas bajas, mayor riesgo de progresión a LAM Normalmente subclonal	Asociado a diferentes subtipos de SMD LMMC (15%), LMA (10%)
JAK2	9P24.1	3 - 5% 90% PV, 40% TE y 60% MFP	Activación señalización quinasas	Desconocido	Frecuente en NIMP
c-CBL	11q23.3	2 - 5%	Degradación del receptor de las tirosina quinasas por ubiquitinización	Desconocido	Asociado a diferentes subtipos de SMD En la LMMC (20%) Sobre todo en Alto Riesgo, como conduce a la proliferación es más frecuente en NIMP y NIMP/SMD que no en SMD
Cohesinas					
STAG2	Xq25	2 - 5%	Unión de las cromátidas hermanas durante la metafase. Papel en la regulación transcripcional	Peor pronóstico	Asociado a CRDM o AREB. Mutado en un 4% de los pacientes con LMA
Otras					
SETBP1	18q21	< 5%	Replicación del ADN	Asociado a peor SG y mayor riesgo de progresión a LAM	25% de pacientes con LMC atípica y subtipos de pacientes con SMD o LMMC (30%) avanzados

2.2.8 ARQUITECTURA CLONAL DE LOS SMD

Actualmente los estudios moleculares con NGS nos permiten detectar lesiones genéticas que pueden ser potenciales dianas terapéuticas. Sin embargo, la rápida adaptabilidad que presentan las células cancerígenas supone una limitación para las terapias dirigidas.

El cáncer es una enfermedad que resulta de la acumulación de alteraciones genéticas. En el caso de los SMD, siguen un modelo de células madre que podemos observar en la Figura 13. Estas células madre se diferencian a un grupo de células hijas con un potencial proliferativo limitado y que retienen las mutaciones oncogénicas de sus predecesoras.

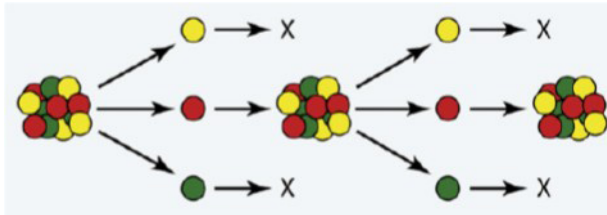


Figura 13_ Esquema del modelo de cáncer de células madre que presenta un grupo minoritario de células que contienen distintas subpoblaciones (rojo: células tumorales, amarillo y verde: células no tumorales) organizadas jerárquicamente. Figura adaptada de Magee y cols (Magee et al., 2012)

Los clones evolucionan gracias a la interacción de alteraciones ventajosas o driver mutations, alteraciones neutrales como las passenger mutations y alteraciones deletéreas (*hitchhiker mutations*¹) (Greaves and Maley, 2012). La *fitness*² de estas células se verá afectada por el número de cambios genéticos (Bozic et al., 2010) y los cambios en el microambiente (Barcellos-Hoff et al., 2005). El dinamismo o plasticidad genética de estos clones permite desarrollar un cáncer gracias a la adquisición sucesiva de alteraciones, que a su vez son seleccionadas positivamente en el genoma de las células neoplásicas (Greaves, 2015; Hanahan and

1 Hitchhiker mutation_ Este concepto de biología evolutiva es equivalente a una passenger mutation en la biología del cáncer.

2 Fitness_ Es la tasa de replicación, diferencia entre la tasa de nacimiento de células y la muerte de las células.

Weinberg, 2011) en la Figura 14 podemos ver un ejemplo.

Se han observado casos con evolución convergente, es decir, diferentes mutaciones somáticas en un mismo gen que afectan de manera diferente a los subclones (Landau et al., 2014; Waanders et al., 2012). Estos estudios sugieren que las lesiones que detectamos a nivel de grandes poblaciones de células cancerígenas, son un conjunto de alteraciones genéticas que se establecen mediante “prueba-error”. El elevado grado de variabilidad genética proporciona las bases para un complejo proceso de evolución, en el que los subclones tienen que adaptarse a la disponibilidad de recursos y a presiones externas, como pueden ser las terapias. Por lo tanto, la progresión en el cáncer presenta una diversificación mutacional acompañada de una selección clonal (Greaves and Maley, 2012; Merlo et al., 2006).

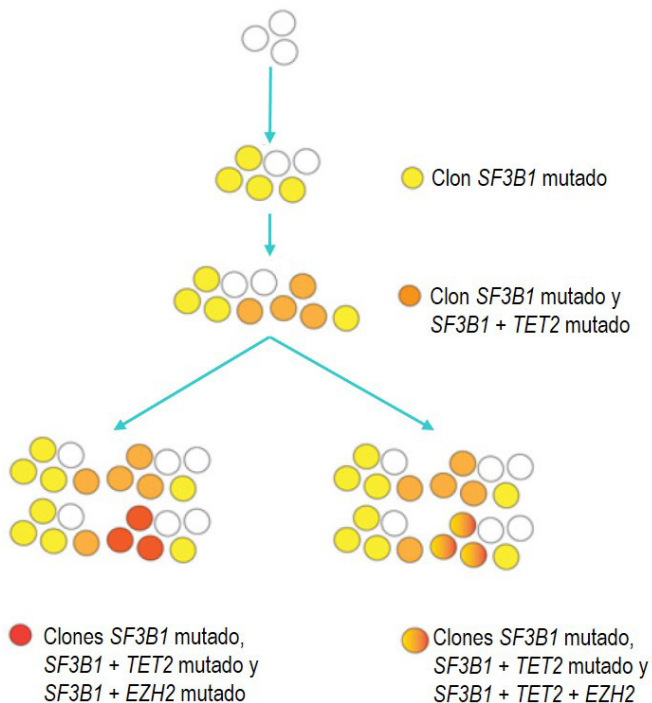


Figura 14_ Ejemplo de estructura clonal en un paciente con SMD, imagen adaptada de Bejar y cols (Bejar and Abdel-Wahab, 2013).

Como la plasticidad en el cáncer es conducida por la heterogeneidad clonal, hay que tener en cuenta qué características conducen o alimentan la generación de la heterogeneidad clonal (Greaves and Maley, 2012; Hanahan and Weinberg, 2011):

- _ La inestabilidad genética es una pieza clave (Hanahan and Weinberg, 2011)
- _ La adquisición de nuevas mutaciones (fuertemente asociada a la necesidad de diversificación de la población neoplásica) proporciona potencial evolutivo, junto con otras características como puede ser el tamaño de la población (Cairo et al., 2010; Loeb, 2011)
- _ Incremento o mayor permisividad de mutaciones somáticas que eliminen puntos de control críticos, como puede ser mutaciones en el gen *TP53* (Bouwman and Jonkers, 2012)

Los nuevos, estudios de NGS basados en una única célula permitirán entender la compleja heterogeneidad genética que presenta la enfermedad y su capacidad evolutiva, de manera que podremos mejorar las estrategias terapéuticas en el tratamiento de los SMD.

2.2.9 TRATAMIENTO DE LOS SMD

El tratamiento de los SMD requiere una división previa de los pacientes en dos grupos en función del riesgo. En pacientes con un **SMD de alto riesgo**, el objetivo es modificar la historia natural de la enfermedad y alargar la supervivencia (Crawford et al., 2002; Hellström-Lindberg and Malcovati, 2008; Kantarjian et al., 2007). En cambio, en los pacientes con un **SMD de bajo riesgo** el objetivo es mejorar la calidad de vida, controlar los síntomas y el tratamiento de las citopenias (básicamente la anemia). Aun así, la probabilidad de éxito varía notablemente en función de las características de cada paciente y de su enfermedad.

Hasta la actualidad, la única alternativa con capacidad curativa en los SMD es el **trasplante alogénico de progenitores hematopoyé-**

ticos (alo-TPH), pero que, por su elevada mortalidad, es aplicable a una minoría de pacientes, ya que la edad media de los pacientes con SMD es de 70 años (Estey, 2007).

Las Guías Españolas de SMD (GESMD and SEHH, 2012) recomiendan adaptar el tratamiento en función del grupo de riesgo al que pertenece el paciente.

2.2.9.1 Tratamiento de pacientes con SMD de Alto Riesgo

El objetivo es modificar el curso natural de la enfermedad, ya que presentan una menor SG y un mayor riesgo de progresión a LMA. Estos pacientes se benefician de alo-TPH, fármacos demetilantes y menos frecuentemente de quimioterapia (combinaciones de antraciclina con citarabina).

La Figura 15 muestra el algoritmo propuesto por las guías Españolas de SMD (GESMD and SEHH, 2012):

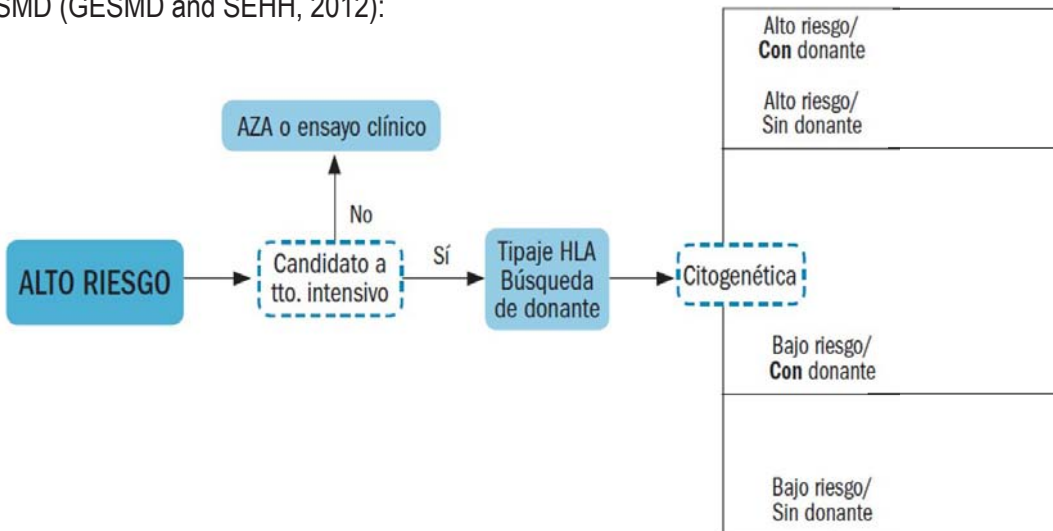
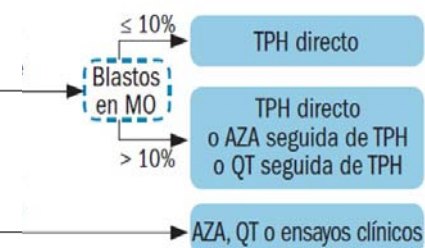
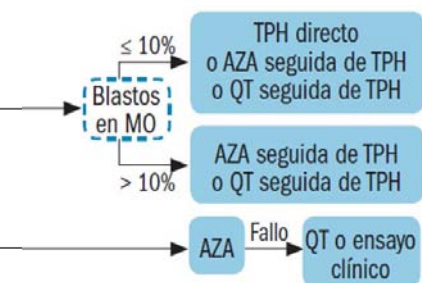


Figura 15_ Algoritmo de tratamiento para los SMD de alto riesgo. AZA: 5-azacitidina; HLA: antígeno leucocitario humano; QT: quimioterapia tipo LMA; TIS: tratamiento inmunosupresor; TPH: trasplante de progenitores hematopoyéticos.

Agentes hipometilantes (5-azacitidina (AZA)¹, es un inhibidor de la ADN metiltransferasa (Griffiths and Gore, 2008). En muestras de pacientes con LMA y SMD² se ha observado una metilación de los promotores de genes en un 68% y un 35% respectivamente. También se ha determinado que la densidad de metilación en los SMD aumenta con la progresión de la enfermedad (Bejar et al., 2011b; Cazzola and Malcovati, 2010). Por ello, la metilación del ADN ha demostrado ser un predictor de la SG y de la supervivencia libre de leucemia en los SMD (Shen et al., 2010).

La eficacia de la AZA en los SMD ha sido demostrada en dos ensayos clínicos aleatorizados (Fenaux et al., 2009; Silverman et al., 2002), ya que presenta superioridad en la tasa de respuesta global respecto a los tratamientos convencionales (60% vs. 5%, respectivamente), de remisión parcial (16% vs. 0%, respectivamente). También reduce el riesgo de progresión a LMA (2,8 veces superior en el grupo de tratamiento de soporte). La SG también es mayor en pacientes que reciben AZA que en los que no la reciben (24,4 vs. 15 mediana de meses, respectivamente), aunque la diferencia no era estadísticamente significativa (Fenaux et al., 2009).



La **quimioterapia (QT) intensiva tipo LMA (combinación de antraciclina y citarabina)** presenta una frecuencia de respuesta completa del 50%-60%, una muerte precoz del 20%-25% y una frecuencia de enfermedad refractaria del 20%-25% (Beran et al., 2001; Estey, 2007; Estey et al., 2001; Kantarjian et al., 2006; Sanz et al., 2005). Aun así los resultados

1 5-azacitidina_ Unión e inhibición de la DNA metiltransferasa (evitando la unión de los grupos metil al ADN).

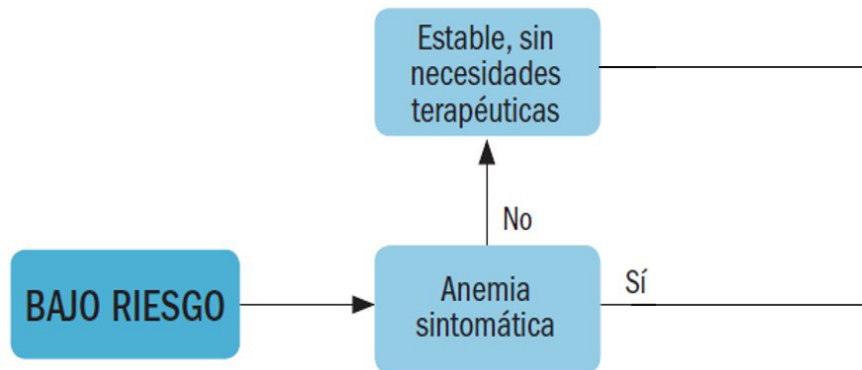
2 Metilación_ En la mayoría de cánceres, se observa una hipometilación global del ADN en combinación con una hipermetilación de los genes supresores de tumores, que resulta en su silenciamiento.

a largo plazo muestran recaídas muy elevadas, del 70%-80%, con una corta duración de la remisión (mediana de 8 meses) y de la SG (mediana de 12 meses) (Beran et al., 2001; Estey, 2007; Estey et al., 2001; Kantarjian et al., 2006; Sanz et al., 2005).

Actualmente hay nuevas combinaciones y tratamientos en estudio como puede ser la decitabina que podría producir mejores tasas de respuesta y menor riesgo de progresión a LMA, pero que en cualquier caso, no aumenta de manera significativa la SG (Kantarjian et al., 2006; Lübbert et al., 2001; Wijermans et al., 2000).

2.2.9.2 Tratamiento de los pacientes con SMD de Bajo Riesgo

El tratamiento de estos pacientes se centra en el tratamiento de las citopenias. Siendo la anemia la citopenia predominante. La anemia tiene una influencia negativa en las comorbilidades y deteriora la calidad de vida (Crawford et al., 2002; Fenaux and Rose, 2009).



Como se puede ver en el algoritmo (Figura 16) de tratamiento de las Guías Españolas de SMD (GESMD and SEHH, 2012) estos pacientes necesitan a menudo **soporte transfusional** (transfusiones de concentrados de hemáties) y como consecuencia de ello **quelación**¹, ya que

¹ Quelación_ Tratamiento quelante: mantiene los niveles de hierro estables para evitar el daño orgánico.

las transfusiones periódicas provocan una sobrecarga de hierro que se asocia a una menor SG por daño orgánico (Fenaux and Rose, 2009).

En pacientes de **bajo riesgo y sin la delección 5q** el tratamiento de primera línea para la anemia es la administración de altas dosis de **agentes estimulantes de la eritropoyesis** (AEE) que ayudan a mejorar los niveles de hemoglobina y reducir las necesidades transfusionales (Hellström-Lindberg et al., 2003; Jädersten et al., 2005). Las tasas de respuesta son más elevadas en los pacientes que tienen requerimientos transfusionales limitados y el valor de eritropoyetina sérica basal por debajo de 500 IU/L (Hellström-Lindberg et al., 2003). La respuesta al tratamiento se produce entre las 8-12 semanas y la mediana de duración de la respuesta es de alrededor de los 2 años (Cheson et al., 2006; Greenberg et al., 2009; Jädersten et al., 2008; Park et al., 2008).

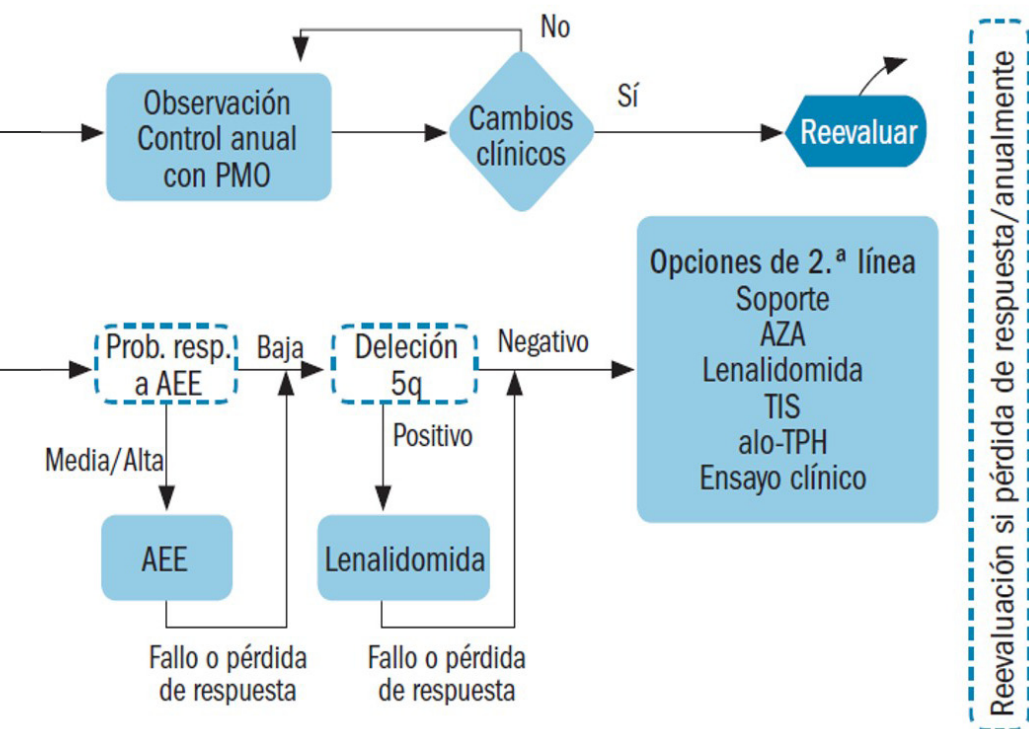


Figura 16_ Algoritmo de tratamiento para los SMD de bajo riesgo. AEE: agentes estimuladores de la eritropoyesis; PMO: punción MO

En **pacientes de bajo riesgo y con la delección 5q** los tratamientos con AEE son menos efectivos (Kelaidi et al., 2008). Por ello, se recomienda el tratamiento con **lenalidomida (Revlimid®)** que presenta una tasa de respuesta alrededor del 60%-70%. El 70% de los casos consiguen la independencia transfusional y una respuesta citogenética entre el 50%-75% (con una respuesta citogenética completa del 30%-45%) (List et al., 2006).

La lenalidomida es un potente inmunomodulador¹ que presenta actividad:

1_ **Estimuladora de la eritropoyesis**: la lenalidomida induce la diferenciación eritroide en estadios primarios y más maduros de la eritropoyesis (Ximeri et al., 2010). Aunque este mecanismo es desconocido, se cree que la estimulación se produce a tres niveles:

- _ Diferenciación de HSC en células comprometidas con la línea eritroide (proeritroblastos)
- _ Diferenciación de los proeritroblastos en precursores eritroides maduros
- _ Diferenciación de los precursores eritroides en normoblastos con el consecuente incremento del número de eritrocitos en SP

2_ **Efecto en la clona del(5q)**: estudios *in vitro* muestran como la lenalidomida inhibe la proliferación de los eritroblastos diferenciados portadores de la del(5q) pero no de los eritroblastos normales (Pellagatti et al., 2007).

3_ **Actividad antiangiogénica, antineoplásica y antiproliferativa**: bloqueo de la migración y adhesión de células endoteliales por citoquinas (factor de crecimiento vascular endotelial y factor de crecimiento fibroblástico) (Heise et al., 2010).

La toxicidad asociada al tratamiento es básicamente hematológica y se observa neutropenia de grado 3 o 4 en un 34%-75% y trombocitopenia

¹ Inmunomodulador (anti-inflamatorio)_ Incrementa el número y la actividad de células T, las células natural killers (NK). También inhiben las citoquinas proinflamatorias como el factor de la necrosis tumoral alfa (TNF-α) e incrementan la producción de la citoquina antiinflamatoria

en un 22%-44% de los casos (Fenaux and Rose, 2009; List et al., 2006).

2.2.10 TÉCNICAS DE ANÁLISIS GENÉTICO DE ESTUDIO DE LAS SMD

2.2.10.1 Estudio mediante citogenética convencional (Cariotipo)

La citogenética convencional (CC) fue desarrollada en 1970, y hoy en día está ampliamente utilizada en los laboratorios de citogenética. Esta técnica nos permite estudiar los cromosomas durante la división celular o mitosis (metafase), momento en el que la cromatina (ADN + proteínas) se compacta hasta formar elementos independientes llamados cromosomas. Mediante la citogenética convencional se define el **cariotipo**, que es la ordenación de los cromosomas según su tamaño y patrón de bandas. Está formado por 22 pares de cromosomas autosómicos y los cromosomas sexuales (X e Y). Con el estudio del cariotipo se pueden definir alteraciones numéricas (monosomías o trisomías) y estructurales, con una resolución mínima de 5-10 Mb.

En los pacientes afectos de neoplasias mieloides y en concreto en los SMD, los estudios de CC suelen realizarse a partir de muestra de MO, ya que es el tejido que presenta mayor infiltración tumoral y capacidad de división. La muestra que proviene del aspirado de la MO se incluye en un cultivo de 24 horas². Para obtener un cultivo rico en células detenidas en metafase (añadiendo el antimitótico Colcemid³). Después, las células son incubadas y fijadas (solución de fijado llamada *Carnoy*, mezcla 3:1 de metanol y ácido acético, el metanol deshidrata y fija los cromosomas y el ácido acético provoca la lisis de las membranas). La extensión se realizará sobre un portaobjetos. En la Figura 17, podemos ver resumidos los pasos principales de esta técnica.

Para poder identificar el patrón de bandas de cada uno de los cromosomas, realizaremos una **tinción de bandas G** (mediante los colorantes Giemsa, Wright, Leishman, etc.), que permiten observar bandas claras y oscuras, de tamaños entre 5 y 10Mb. Las bandas oscuras tienden a ser

² Cultivo de 24 horas_ En un incubador a 37°C, con el 5% de CO₂ y 95% de humedad

³ Colcemid_ Análogo sintético de la colchicina que impide la formación del huso mitótico evitando la polimerización de las hebras del huso, de manera que la célula no puede avanzar en las etapas de la mitosis más allá de la metafase.

zonas heterocromáticas de replicación tardía, ricas en AT¹ y pobres en genes, mientras que las regiones claras tienden a ser de eucromatina, de replicación temprana, con abundantes GC² y ricas en genes.

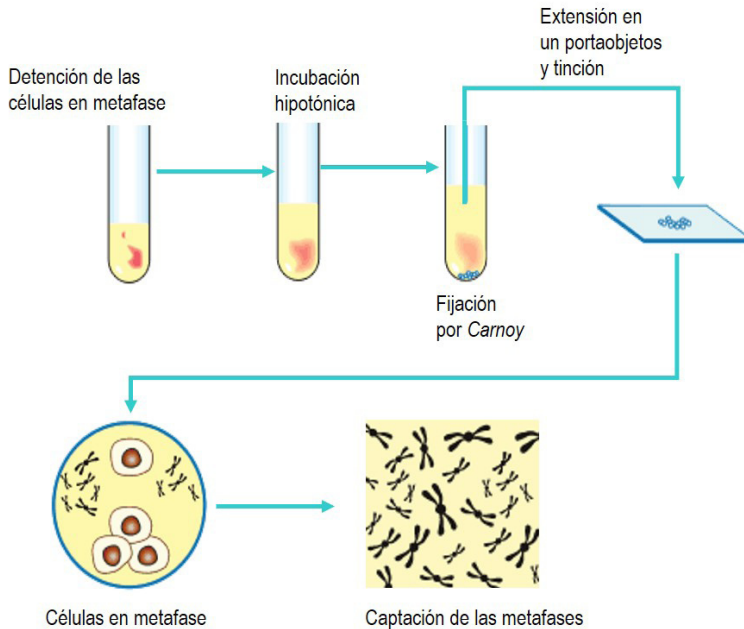


Figura 17_ Principales pasos de la citogenética convencional.

Para realizar el análisis se recomienda estudiar un mínimo de 20 metafases y se realizará la ordenación del cariotipo gracias al patrón de bandas de cada cromosoma. Las alteraciones serán descritas de acuerdo con el *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN 2013) (Shaffer et al., 2013).

2.2.10.2 Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH, *Fluorescence in situ Hybridization*)

1 El código genético está formado por 4 bases nucleicas: Adenina (A), Timina (T), Guanina (G) y Citosina (C).

2 El código genético está formado por 4 bases nucleicas: Adenina (A), Timina (T), Guanina (G) y Citosina (C).

zation), es una técnica de citogenética molecular que se desarrolló a finales de los años 80. Actualmente, está implementada en la mayoría de laboratorios de genética o hematología. La técnica de FISH presenta una mayor sensibilidad y nos permite detectar alteraciones en bajo porcentaje (que no podríamos detectar mediante CC), definir mejor cariotipos complejos, y la implicación de determinados genes.

Esta técnica consiste en la hibridación de una sonda de cadena simple de ADN a una secuencia complementaria en la muestra que queremos estudiar. En la Figura 18 se describen las etapas principales de la técnica de FISH.

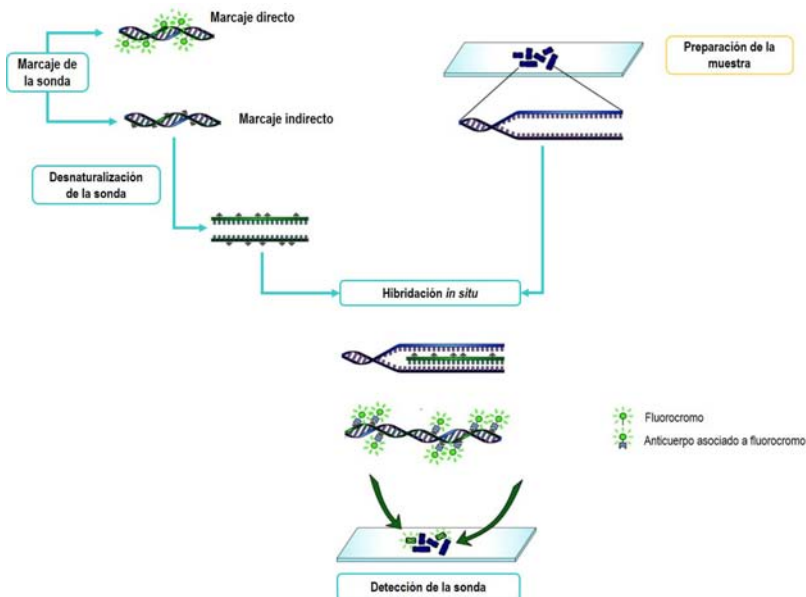


Figura 18_ Etapas principales de la técnica de FISH.

A continuación se resumen los puntos principales de la técnica de FISH:

_ Preparación de la sonda: Una sonda es una secuencia de ADN de cadena simple marcada de manera directa con nucleótidos unidos un fluorocromo³ (por ejemplo: FITC o Rodamina) o de manera indirecta

³ Fluorocromo_ Marcadores no radioactivos que emiten fluorescencia después de la excitación mediante luz

mediante nucleótidos modificados que contienen un hapteno¹ (biotina o digoxigenina) sobre el que se puede unir un fluorocromo. El marcaje se lleva a cabo mediante la técnica de *Nick translation*, un método enzimático en el que el ADN es tratado con ADNasas para producir “*nicks*” o muescas de cadena simple a lo largo de la cadena doble de ADN (cada 500 pares de bases). A continuación la ADN polimerasa I se encarga de elongar la cadena 3' hidroxiterminal reemplazando los nucleótidos de 5' a 3' gracias a su actividad exonucleasa y substituirlos por nucleótidos marcados.

_ **Preparación de la muestra:** la técnica de FISH se puede aplicar en extensiones, a partir de células fijadas para el estudio de metafases o núcleos en interfase, así como en extensiones de líquidos biológicos o en tejidos.

_ **Desnaturalización e Hibridación:** para hibridar la muestra y la sonda, se necesita que ambas sean de cadena simple, para ello se desnaturaliza la sonda y la muestra a 70°C-80°C. Así se rompen los puentes de hidrógeno, existentes entre las dos cadenas de ADN, permitiendo obtener cadenas simples. A continuación se incuba la sonda y la muestra a una temperatura constante (37°C) entre 16 y 48 horas (dependiendo del tipo de sonda), así las zonas complementarias de la sonda y la muestra se unen.

_ **Lavados de post-hibridación** con soluciones salinas o con formamida para eliminar el exceso de sonda y las hibridaciones inespecíficas que se hayan producido.

_ **Contratinción:** para reconocer los núcleos se realiza una tinción inespecífica con DAPI II², un fluorocromo con alta afinidad inespecífica con el ADN genómico que permite identificar el núcleo de la célula.

_ **Análisis mediante el microscopio de fluorescencia:** éste contiene una lámpara de mercurio, la radiación emitida a una determi-

1 Hapteno: pequeña molécula que tienen afinidad de unión por un receptor proteico.

2 DAPI_ 4',6-diamidino-2-phenylindole.

nada longitud de onda, permite excitar los fluorocromos de las sondas hibridadas en la muestra. La aplicación de filtros específicos permiten diferenciar los distintos fluorocromos.

La técnica de FISH comprende distintos tipos de sondas:



1_ **Sondas locus³ específico**: estas sondas hibridan en secuencias únicas de ADN, es decir son específicas para un *locus* determinado. Son útiles para determinar el número de copias y reordenamientos del locus estudiado.

2_ **Sondas centroméricas**: son secuencias específicas de los centrómeros, que a pesar de ser prácticamente idénticos para todos los cromosomas se distinguen entre un 2-3% de su secuencia. Estas sondas permiten la rápida identificación de un cromosoma en una metafase, así como la detección de aneuploidias en interfase y metafase.



3_ **Sondas teloméricas**: son secuencias que hibridan en las repeticiones en tándem (TTAGGG) que están presentes en todos los telómeros de los cromosomas humanos. Mediante sondas subtelo méricas de secuencia única se pueden determinar anomalías cromosómicas, que implican estas regiones, frecuentemente involucradas en trastornos de retraso mental.

4_ **Sondas de pintado cromosómico**: están formadas por un cóctel de sondas de un determinado cromosoma que permiten identificar los cromosomas homólogos y así detectar de forma rápida alteraciones numéricas y reordenamientos estructurales, así como marcadores.



³ Locus_ Lugar específico del cromosoma donde está localizado un gen u otra secuencia de ADN.

5_ Sondas no comerciales

Las sondas no comerciales o *hand-made* se fabrican a partir de secuencias de ADN complementario. La elección del vector¹ dependerá del tamaño de la secuencia a clonar. El vector más utilizado son los BACs (*Bacterial Artificial Chromosomes*) (Rigby et al., 1977), pero también hay vectores de plásmidos (Tsuchiya et al., 2002), cósmidos (Tsuchiya et al., 2002), clones P1 (Mark et al., 2005), fósidos (Birren et al., 1996) y YACs (*Yeast Artificial Chromosome*) (Liehr et al., 2002).

Los BACs son construcciones de ADN basados en F-plásmidos que contienen los insertos que nos interesa clonar y un gen de resistencia a un antibiótico. Los F-plásmidos son transfectedos a las bacterias y cultivados en un medio con el antibiótico al que son resistentes, así se enriquece la población sólo con los que hayan incorporado el plásmido. Los F-plásmidos tienen un papel importante ya que contienen genes que promueven la distribución de los plásmidos después de la división celular de la bacteria. Una vez cultivados, y mediante una lisis celular, se aísla el inserto de interés. Normalmente un BAC puede contener un inserto de entre 150-350Kb, y se utilizan para secuenciar genomas de otros organismos como puede ser el genoma humano. Una vez tengamos el inserto, éste se marca mediante el método de *Nick translation* y se comprueba su correcta hibridación en metafases de un individuo control, a continuación se podrán utilizar para los estudios correspondientes (Rigby et al., 1977).

2.2.10.3 Microarrays genómicos

Un array de ADN consiste en un gran número de moléculas de ADN ordenadas sobre un soporte sólido formando una matriz de secuencias en dos dimensiones. Estos fragmentos o sondas de material genético pueden ser secuencias cortas (oligonucleótidos), o de mayor tamaño. Aunque en esta tesis nos centraremos en los microarrays genómicos, también están disponibles *microarrays* de expresión (cADN), *microarrays* de tejido, de proteínas y de célula.

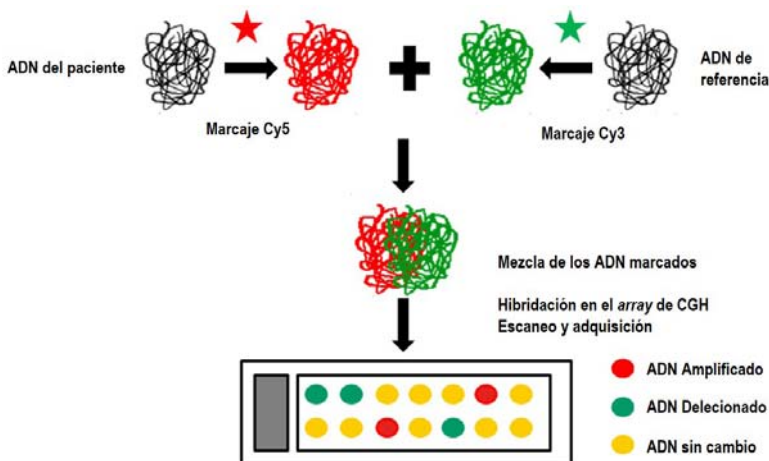
¹ Vector biológico_ Cualquier agente, en nuestro caso bacteria, que transporta a otro organismo.

Los *microarrays* genómicos nos permitirán identificar cambios en el número de copia (ganancias o pérdidas). Esto se consigue gracias al marcaje con sondas fluorescentes del ADN de pacientes, y su incubación en el soporte sólido (o panel de sondas), permitiendo la hibridación de las secuencias homólogas. Las diferencias de intensidad de fluorescencia permiten determinar las ganancias y las pérdidas de material genómico.

Podemos diferenciar dos tipos de *microarrays* genómicos:

2.2.10.3.1 *Microarrays* de CGH (*Comparative Genomic Hybridization*):

esta técnica se basa en el principio de hibridación de la CGH convencional (Kallioniemi et al., 1992). Ésta se basa en una hibridación competitiva entre dos ADNes, tumoral y control marcados con distintos fluorocromos. Estos se hibridan sobre un soporte de metafases de un individuo control. Los *microarrays* de CGH (Pinkel et al., 1998; Solinas-Toldo et al., 1997), en lugar de realizar la hibridación sobre una metafase, lo hacen sobre una matriz de sondas. En función del tamaño del ADN que forma la matriz diferenciamos entre *microarrays* de BACs (200-300 Kb) y de oligonucleótidos (60-80pb) (Figura 19). A diferencia de la CGH convencional que presenta una resolución de entre 5-10Mb, los *microarrays* de CGH tendrán una resolución determinada por la densidad (número) y tamaño de las sondas fijadas en el soporte sólido.



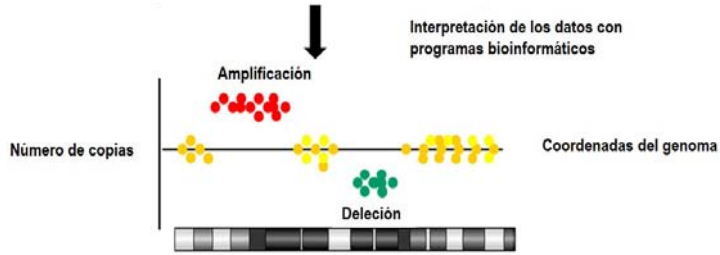


Figura 19_ Esquema de los microarray de CGH, figura adaptada de Helixio.

2.2.10.3.2 Microarrays de SNP (Single Nucleotide Polymorphism) (Mei et al., 2000): microarray de ADN que nos permite detectar SNP (variaciones en un locus concreto del ADN que presenta una variabilidad dentro de la población superior al 1%) y cambios en el número de copia (CNV, *Copy Number Variation*).

El soporte sólido del *microarray* contiene sondas de oligonucleótidos (de unos 25 nucleótidos) en las que puede hibridar la muestra de ADN. A diferencia del *microarray* de CGH, en el que se produce una hibridación competitiva, en este caso, el ADN de la muestra se hibrida en el soporte sólido, obteniendo una señal fluorescente para cada uno de los alelos A o B de cada uno de los SNPs (Figura 20). El análisis consiste básicamente en convertir estas señales en dos tipos de información:

- _ Información de genotipado para cada SNP individual: A, B o AB y, así determinar CNN-LOH (*Copy Neutral Number Loss of Heterozygosity*)¹

- _ Información de número de copias: en función de la intensidad de la fluorescencia para un determinado locus, así podremos detectar ganancias o pérdidas

En esta tesis se han utilizado dos tipos de microarrays de Affymetrix®:

- _ *Genome-Wide Human SNP Array 6.0*®: contiene 906.600 sondas para SNPs y 946.000 para la detección de número de copia.

¹ CNN-LOH_ La pérdida de heterocigosidad (LOH) es la pérdida de uno de los alelos de un gen. La CNN-LOH representa una pérdida de heterocigosidad sin cambio en el número de copias.

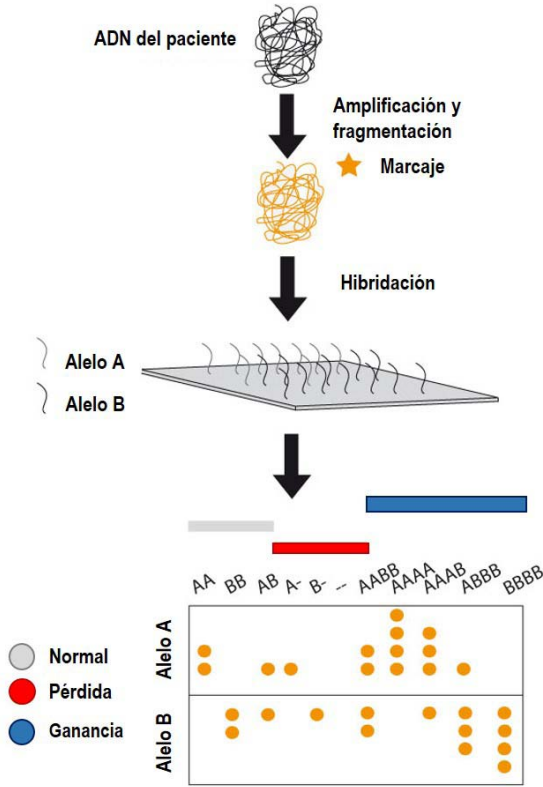


Figura 20_ Esquema de la técnica de SNP-A, figura adaptada de Helixio.

_ *CytoScan HD®*: contiene 750.000 sondas para SNPs y 1.950.000 sondas de número de copia. Este nuevo microarray disminuyó el número de sondas de SNPs para centrarse en aquellos con una representación más alta en la población.

2.2.10.4 Técnicas de secuenciación del ADN

La secuenciación del ADN presenta un amplio número de aplicaciones como la confirmación de los SNPs, la identificación de variantes raras, la identificación de inserciones y deleciones y reordenamientos cromosómicos. Los métodos tradicionales del análisis de ADN son ampliamente utilizados en muchos laboratorios.

A medida que se descubren más genes, el trabajo de la secuenciación

de cada uno mediante técnicas clásicas o **secuenciación por Sanger** se vuelve más tedioso. Además, y pese a que la secuenciación por Sanger tienen probada su fiabilidad, también presenta sus limitaciones, como por ejemplo que en cada ensayo sólo se centra en una mutación en concreto y que no permite detectar mutaciones que se encuentren por debajo del 15%-20% en la muestra de estudio. Las plataformas de última generación presentan importantes características para identificar mutaciones presentes en los genomas tumorales a la vez que determinar regiones de cambio en el número de copias o de desequilibrio génico, de manera eficiente y con una elevada sensibilidad. Así podemos identificar nuevas y recurrentes mutaciones en determinados tumores, y a la vez detectar nuevas dianas terapéuticas.

La **secuenciación masiva del genoma** o secuenciación de nueva generación (NGS, *Next-Generation Sequencing*) nos proporciona un elevado número de ventajas sobre los métodos tradicionales, incluyendo una elevada sensibilidad (superior a la técnica de Sanger) y la habilidad de secuenciar grandes números de genes (de centenares a miles) en una única prueba, y así, obtener el perfil molecular. Actualmente las plataformas más utilizadas para la secuenciación de genomas o exomas completos son las plataformas de *Illumina HiSeq 2000 o 2500* y para la secuenciación dirigida de un número determinado de genes (panel de genes) se utiliza la plataforma *MiSeq* de *Illumina* o el *Ion Torrent* de *Thermo Fisher*.

Estas técnicas permiten analizar genomas o exomas completos, estos últimos enriquecen el 1-1,4% del genoma que codifica para proteínas. La consecuencia de este enriquecimiento es la reducción en el número de lecturas y por lo tanto, un incremento de la sensibilidad de la metodología (incrementando el número de secuencias o lecturas). Las nuevas técnicas de análisis de célula individual o single cell permiten estudiar el genoma de cada una de las células para establecer la arquitectura clonal del tumor.

2.2.10.4.1 Secuenciación clásica de Sanger

La secuenciación de Sanger fue desarrollada en 1977 por Frederick

Sanger (Sanger et al., 1977), y desde entonces ha sido el método más aplicado, junto con el método automatizado para la secuenciación de ADN, en la mayoría de laboratorios de biología molecular o de secuenciación.

La secuenciación de Sanger se basa en el ciclo de secuenciación (Figura 20), en el que se llevan a cabo ciclos de desnaturalización y renaturalización del ADN molde (ADN en estudio), la unión de un *primer*¹ y la extensión de éste mediante la PCR². El *primer* es complementario a la secuencia flanqueante a la región de interés. En cada ronda, la ADN polimerasa se une al *primer* y se encarga de copiar las cadenas simples de ADN molde mediante la unión de deoxinucleotidos trifosfato (dNTP) y dideoxinucleotidos trifosfato modificados (ddNTP). La ADN polimerasa se une a l'extremo 3' del primer que presenta un grupo hidroxil (-OH) que le permite formar un puente fosfodiéster con el grupo fosfato en 5' de un nuevo deoxinucleotido, produciéndose la elongación de 3'-5'.

En el método de Sanger se utilizan ddNTP que carecen del grupo -OH, al incorporarse al extremo 5' de la cadena causarán un efecto terminador, ya que no permiten la formación del puente fosfodiéster, es decir, no permiten la elongación. De esta forma se obtienen distintas secuencias de ADN detenidas por azar en A, T, C o G. A continuación y mediante un gel de electroforesis las secuencias se ordenan por tamaño para establecer la secuencia en función de la última base nucleotídica incorporada en cada cadena.

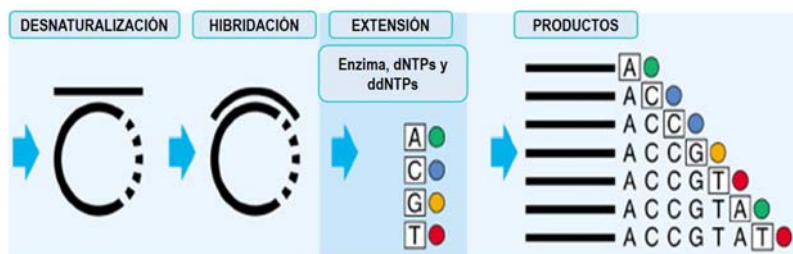


Figura 21_ Etapas de la secuenciación de Sanger con ddNTPs marcados con moléculas fluorescentes.

1 Primer_ Cadena de oligonucleótidos que hibridan con el ADN molde.

2 PCR_ Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permite amplificar pequeños fragmentos de ADN.

Una de las variaciones de la técnica de Sanger es la de añadir ddNTP marcados con moléculas fluorescentes (Smith et al., 1986) (Figura 21). Cada uno de los cuatro ddNTPs se marca con un fluorocromo que emite una longitud de onda diferente. La secuencia es determinada mediante una separación electroforética de alta resolución (Luckey et al., 1990) de las cadenas simples que presentan un tamaño determinado. La excitación de los fluorocromos, mediante 4 láseres, nos permite diferenciar el espectro de cada nucleótido y determinar cada una de las secuencias. Estas modificaciones incrementaron la eficiencia de la secuenciación de Sanger, que actualmente es considerada el “*gold estándar*” en los laboratorios de biología molecular de hematología y oncología.

2.2.10.4.2 Next- generation sequencing (NGS):

El principio en el que se basan todas las nuevas técnicas de NGS es el paralelismo masivo. Una muestra de ADN fragmentada es secuencialmente identificada mediante señales emitidas cada vez que cada fragmento es resintetizado a partir de la cadena molde de ADN. Este avance permite secuenciar rápidamente un amplio número de pares de bases a lo largo del genoma. Esto permite hacer ciclos interactivos de manipulación enzimática y captación mediante la imagen de los datos producidos. Aunque hay muchas plataformas que permiten desarrollar esta técnica y presentan diferencias en la bioquímica y la generación de los *clusters*¹, el flujo de trabajo es muy similar. Los principales pasos de desarrollo de la técnica son:

- 1_ **Preparación de la librería:** que incluye 2 pasos:
 - _ Fragmentación aleatoria del ADN a estudiar
 - _ Ligación de los índices (para diferenciar las muestras) y de los adaptadores (que permiten la unión al soporte sólido)

- 2_ **Generación de clones** de amplicones en forma de *cluster*. En el caso de Illumina mediante PCR en puente (*bridge PCR*)

3_ **Secuenciación de los fragmentos producidos**

¹ Cluster_ Conjunto de moléculas de ADN.

4_ **Procesamiento de los datos obtenidos** mediante imagen

Las ventajas de este tipo de secuenciación son:

- _ Multiplexación o *multiplexing* de muestras, posibilidad de analizar un amplio grupo de muestras en un mismo ensayo mediante el marcaje con índices de las distintas muestras.
- _ La construcción *in vitro* de una librería seguida de una amplificación clonal para generar productos de secuenciación.
- _ La secuenciación basada en una matriz permite aumentar el grado de paralelismo respecto a la secuenciación convencional basada en capilares. De esta forma se pueden obtener millones de lecturas de secuencia.
- _ El soporte sólido o *flowcell* permite inmovilizar los adaptadores de manera que la superficie puede manipularse con volúmenes únicos de enzimas, amortizando los costes gracias a la utilización de los reactivos de manera efectiva.

La combinación de estas ventajas nos permite obtener una mayor sensibilidad en el descubrimiento de nuevas variantes en el genoma.

En esta tesis, se ha utilizado el método de secuenciación por síntesis de Illumina (*SBS, Sequencing by synthesis*)

Actualmente la **SBS de Illumina** se ha posicionado como una de las más exitosas y ha sido adoptada ampliamente como la plataforma por excelencia en la secuenciación de nueva generación. La tecnología de Illumina (Bentley et al., 2008), permite secuenciar de manera masiva y paralela utilizando un método de terminación de base reversible, que permite detectar las bases cuando son incorporadas en la elongación de la cadena de ADN. Este terminador está marcado con un fluorocromo que es captado cada vez que un dNTP se une a la cadena de ADN y que permitirá la unión de la siguiente base. Como los cuatro dNTPs terminadores son reversibles y están presentes en cada ciclo de secuenciación, la competencia natural entre ellos evita el sesgo hacia uno de ellos. Todas las plataformas de Illumina de NGS ofrecen protocolos de *paired-*

end o de secuencia apareada, donde ambos extremos del fragmento de ADN son secuenciados, a diferencia de la lectura simple o *single-read sequencing* donde sólo uno de los extremos es secuenciado. En la Figura 22 podemos ver los principales pasos de esta técnica.

Uno de los aspectos que causa más controversia en esta tecnología es el análisis. La secuenciación masiva en paralelo genera un enorme volumen de datos, que requiere potencia a nivel computacional, bioinformáticos experimentados y el diseño de líneas de estudio o *pipelines* concretos. El análisis se divide en 3 partes:

1_ **Análisis primario:** conversión de las señales lumínicas captadas por el secuenciador en nucleótidos (A, T, C, G) (normalmente este proceso se produce dentro de la máquina).

2_ **Análisis secundario:** alineamiento o mapeado de las secuencias de ADN obtenidas en un genoma de referencia.

3_ **Análisis terciario:** análisis y filtraje de las variantes obtenidas para determinar su implicación en la enfermedad, patogenicidad, heredabilidad, impacto funcional, etc.

Aunque las ventajas (sensibilidad, *multiplexing*, rapidez, etc.) de este tipo de secuenciación superan en creces a las desventajas, hay que tener en cuenta que las lecturas que obtenemos son mucho más cortas y la precisión de los datos obtenidos es inferior a las técnicas convencionales.

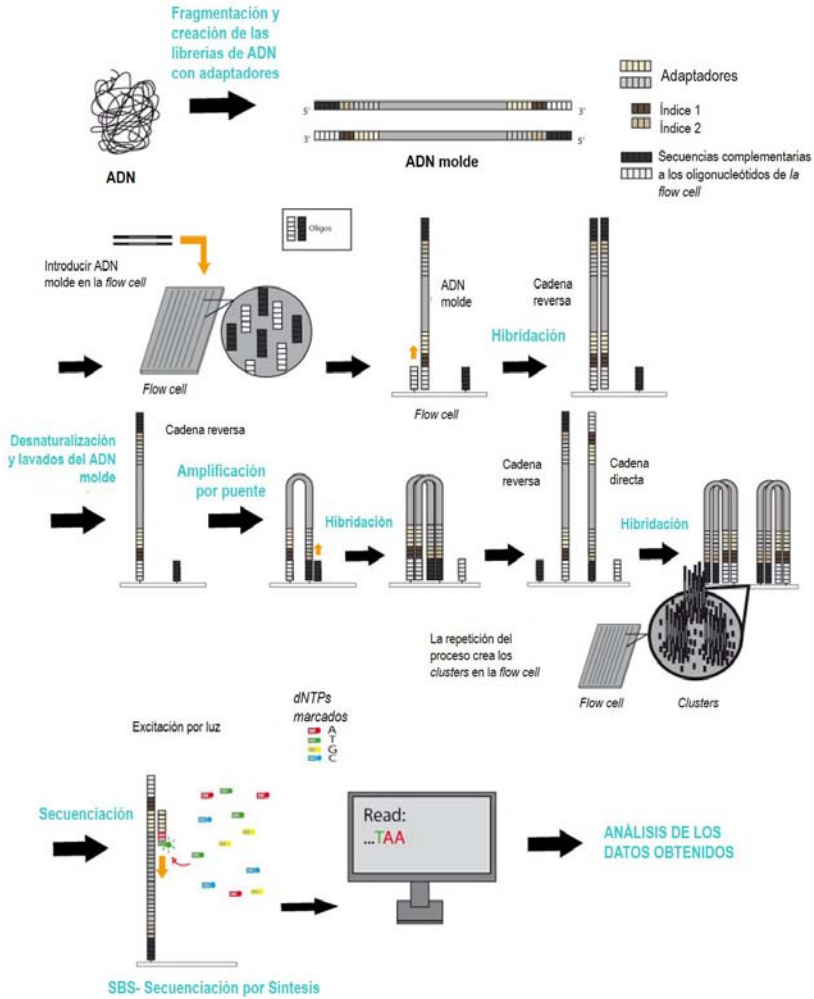


Figura 22_ NGS mediante SBS de Illumina, figura adaptada de Helixio.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

“Lo importante de todo es nunca dejar de hacerse preguntas.
La curiosidad tiene su propia razón de existir”

Albert Einstein

3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los SMD presentan una elevada heterogeneidad clínica, lo cual ha obligado a desarrollar sistemas de clasificación para determinar el pronóstico de los pacientes.

Las alteraciones citogenéticas en los SMD se detectan en un 50% y presentan un impacto pronóstico independiente y relevante en los SMD *de novo*. Actualmente, hay una evidencia creciente que el 50% restante de pacientes con una citogenética normal, en realidad presentan alteraciones submicroscópicas (micro-delecciones o amplificaciones, ausencia de heteocigosidad o mutaciones puntuales) que no se pueden detectar mediante citogenética convencional.

Podemos decir que los SMD son heterogéneos desde el punto de vista clínico y genético. Las alteraciones detectadas por citogenética convencional son una de las variables con más impacto pronóstico en los índices pronósticos actuales. La **hipótesis global** del trabajo es que las alteraciones detectadas mediante técnicas moleculares permiten mejorar la definición del pronóstico de los pacientes con SMD.

Para dilucidar la hipótesis general, se estudiarán tres grupos de pacientes con características citogenéticas distintas:

1_ Los pacientes de alto riesgo citogenético son altamente heterogéneos. La determinación del cariotipo monosómico podría ayudar a la estratificación de estos pacientes, tanto en el contexto de un cariotipo complejo como en un cariotipo de dos alteraciones.

2_ Los pacientes con citogenética normal acostumbran a presentar alteraciones no detectables por las técnicas de rutina diagnóstica. Estas alteraciones podrían explicar el mal pronóstico de algunos SMD con cariotipo normal. La aplicación de la técnica de FISH de 7q puede ayudar a identificar a un grupo de pacientes con monosomía 7 o delección 7q crítica, y así, identificar un subgrupo de pacientes con peor pronóstico.

3_ El estudio del genoma en pacientes con la deleción 5q, como alteración aislada frente a pacientes con la deleción 5q en el contexto de un cariotipo complejo, puede ayudar a la identificación de alteraciones genéticas con valor pronóstico.

El objetivo general de la tesis es caracterizar mejor el pronóstico de los SMD, en grupos concretos de pacientes.

Los objetivos concretos a alcanzar para cada uno de los subgrupos de pacientes son:

1_ En los pacientes con cariotipo monosómico, determinar:

- _ Si presenta una influencia pronóstica independiente al cariotipo complejo.
- _ La influencia del número de alteraciones cromosómicas que conforman el cariotipo.
- _ Si la monosomía 5 y/o 7 presentan impacto pronóstico independiente.

2_ En los pacientes con cariotipo normal:

- _ Analizar la incidencia de alteraciones detectadas por FISH de estudio dirigido mediante FISH.
- _ Determinar aquellos pacientes que se podrían beneficiar de un estudio dirigido mediante FISH.

3_ En los pacientes con cariotipo con la deleción 5q:

- _ Definir alteraciones acompañantes y el tamaño de la deleción 5q mediante SNP-A.
- _ Determinar mutaciones somáticas mediante *Next-Generation Sequencing*.
- _ Evaluar el significado clínico-biológico de los resultados obtenidos por *Next-Generation Sequencing*.

RESULTADOS

“La unidad es la variedad, y la variedad en la unidad es la ley suprema del universo”

Isaac Newton

4 RESULTADOS

4.1 EL CARIOTIPO COMPLEJO PERO NO EL CARIOTIPO MONOSÓMICO ES EL MARCADOR DE PEOR PRONÓSTICO EN PACIENTES CON SÍNDROME MIELODISPLÁSICO PRIMARIO.

El cariotipo complejo (CK) es un factor de mal pronóstico en pacientes con síndrome mielodisplásico (SMD). Recientemente Breems y cols determinaron, en pacientes con LMA, un subgrupo de pacientes con CK y peor pronóstico. Estos pacientes presentaban un cariotipo monosómico (MK), que definieron como la presencia de dos monosomías de cromosomas autosómicos o una monosomía y una alteración estructural. A raíz de este estudio, otros autores quisieron determinar si en pacientes con SMD y CK el MK confería un peor pronóstico. Patnaik y cols determinaron que la SG en pacientes con MK era significativamente inferior que en pacientes con CK sin MK (HR, 1,9; $P=0,01$). El análisis multivariado identificó el MK, la edad avanzada y el porcentaje de blastos en MO como factores con impacto independiente en la supervivencia global (SG). En cambio Belli y cols determinaron que los cariotipos con monosomías autosómicas tenían un impacto similar a las otras alteraciones citogenéticas de mal pronóstico.

Con el fin de dilucidar si el MK suponía o no un factor de impacto de mal pronóstico en los pacientes con SMD y CK, se recopilaron y analizaron un total de 1.054 pacientes adultos con SMD y cariotipo alterado provenientes del Registro Español de SMD (GESMD), con el objetivo de describir la incidencia, características y pronóstico del cariotipo monosómico, sobretudo la relación con la SG y el riesgo de progresión a LMA.

El cariotipo monosómico se identificó en 172 pacientes (16%), la mayoría de los cuales (86%) también presentaban un total de 3 ó más alteraciones, por lo que se incluían en el CK. Las variables que presentaron impacto en la SG fueron, la edad (HR, 1,9; $P<0,001$), el porcentaje de blastos en MO (HR, 1,05; $P<0,001$), los niveles de hemoglobina (HR,

1,71; $P < 0,001$), la cifra de plaquetas (HR, 1,41; $P < 0,001$), la complejidad del cariotipo: CK de tres alteraciones (HR, 1,81; $P = 0,003$) o CK de más de tres alteraciones (HR, 2,0; $P < 0,001$) (Figura 23), y las monosomías en los cromosomas 5 y 7 (HR, 1,89; $P < 0,001$).

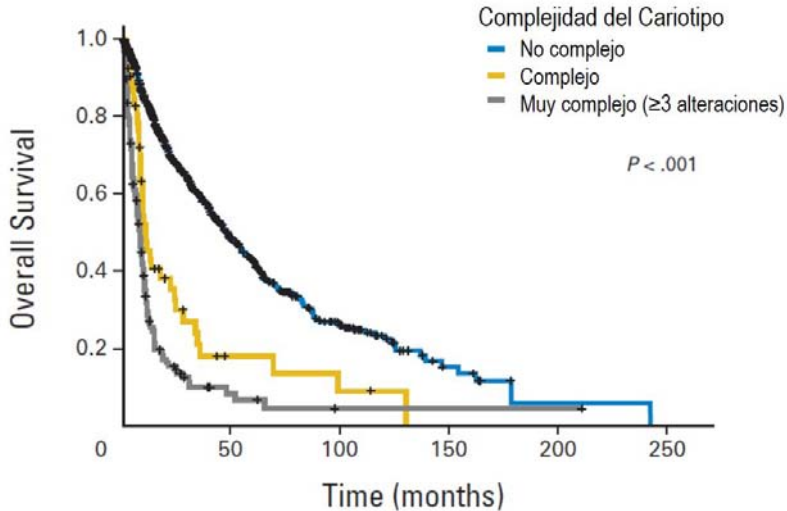


Figura 23_ Curvas Kaplan-Meier de SG de pacientes sin CK, con CK < 3 alteraciones y CK \geq 3 alteraciones.

Realizamos un análisis de 124 pacientes que presentaban 2 alteraciones de los cuales 22 cumplían los criterios de MK. En el análisis estadístico univariado de la SG la presencia del MK se asoció a una peor SG que en pacientes sin MK (mediana SG: 20,8 vs. 36,2; $P = 0,027$; meses respectivamente), esta asociación no se mantuvo en el análisis multivariado. Las variables que se relacionaron con un incremento en el riesgo de progresión a LMA fueron, el porcentaje de blastos en la MO (HR, 1,12; $P < 0,001$) y la complejidad del cariotipo, tres alteraciones (HR, 2,53; $P = 0,002$) o más de tres alteraciones (HR, 2,77; $P < 0,001$). El MK no presentó relación con el incremento de riesgo en la progresión a LMA.

Así pues, nuestro estudio demuestra que el mal pronóstico que presentan los pacientes con MK se relaciona con cariotipos más complejos,

sugiriendo que es la complejidad del cariotipo lo que confiere un peor pronóstico en estos pacientes. En nuestro estudio el MK presentó asociación con una menor SG en el análisis univariado pero no se mantuvo en el análisis multivariado. En pacientes con CK, el MK no se asoció a una peor SG ni en el análisis univariado ni en el multivariado. En cambio la complejidad del cariotipo sí supuso un valor de pronóstico adverso en pacientes con MK. En pacientes con dos alteraciones, el MK se asoció estadísticamente a una peor SG en el análisis univariado, pero no en el multivariado. Aun así, el MK no resultó ser un factor de impacto independiente en la SG o en el riesgo de progresión a LMA.

El análisis de los pacientes con CK nos permitió diferenciar dos grupos de mal pronóstico, el cariotipo complejo y el cariotipo muy complejo de 4 ó más alteraciones, como se había descrito por Schanz y cols (Schanz et al., 2012). Los pacientes con más de 3 alteraciones presentaron una peor SG y un mayor riesgo de progresión a LMA en comparación con los pacientes sin CK o con CK de tres alteraciones.

Las monosomías en los cromosomas 5 y/o 7 en el contexto de un MK presentaron un peor pronóstico y una asociación independiente con una menor SG y un mayor riesgo de progresión a LMA, en comparación con los pacientes sin MK o con un MK que involucrara otros cromosomas.

En conclusión, estos resultados demuestran que aunque el valor pronóstico del MK está estrechamente asociado con el CK, es la complejidad del cariotipo, es decir, el número de alteraciones cromosómicas, la variable que presenta asociación con una menor SG y un mayor riesgo de progresión a LMA. Considerando el número de alteraciones, el MK no presenta una asociación independiente con un peor pronóstico en los pacientes con SMD.

Los resultados de este trabajo han sido publicados en la revista *Journal Clinical of Oncology* que se adjunta a continuación.

Complex, Not Monosomal, Karyotype Is the Cytogenetic Marker of Poorest Prognosis in Patients With Primary Myelodysplastic Syndrome

David Valcárcel, Vera Ademà, Francesc Solé, Margarita Ortega, Benet Nomdedeu, Guillermo Sanz, Elisa Luño, Consuelo Cañizo, Javier de la Serna, Maite Ardanaz, Victor Marco, Rosa Collado, Javier Grau, Julia Montoro, Mar Mallo, and Teresa Vallespi

ABSTRACT

Purpose

Complex karyotype (CK) is the poorest risk factor in patients with myelodysplastic syndrome (MDS). It has recently been reported that monosomal karyotype (MK) worsens the prognosis of patients with CK.

Patients and Methods

We analyzed 1,054 adult patients with MDS with an abnormal karyotype from the Spanish Registry of MDS. The aim of the study was to describe the incidence, characteristics, and prognosis of MK; the main end points were overall survival (OS) and leukemia-free survival.

Results

MK was identified in 172 patients (16%), most of whom (88%) presented with CK. Variables significantly associated with OS were age (hazard ratio [HR], 1.90; $P < .001$), bone marrow (BM) blast percentage (HR, 1.05; $P < .001$), hemoglobin level (HR, 1.71; $P < .001$), platelet count (HR, 1.41; $P < .001$), karyotype complexity (CK [three abnormalities]: HR, 1.81; $P = .003$; very CK [$>$ three abnormalities]: HR, 2; $P < .001$), and abnormalities of chromosome 5 and/or 7 (HR, 1.89; $P < .001$). Variables significantly related to the risk of transformation to acute myeloid leukemia (AML) were higher BM blast percentage (HR, 1.12; $P < .001$) and karyotype complexity (CK: HR, 2.53; $P = .002$; very CK: HR, 2.77; $P < .001$).

Conclusion

After accounting for karyotype complexity, MK was not associated with OS or evolution to AML. In conclusion, these results demonstrate that the prognostic value of MK in MDS is not independent and is mainly the result of its strong association with number of chromosomal abnormalities.

J Clin Oncol 31. © 2013 by American Society of Clinical Oncology

INTRODUCTION

Myelodysplastic syndrome (MDS) comprises a heterogeneous group of clonal hematologic disorders characterized by dysplasia in bone marrow (BM) and blood cells, presence of cytopenias, and variable risk of evolution to acute myeloid leukemia (AML).¹ The main prognostic factor for survival and risk of AML evolution is the presence of certain cytogenetic abnormalities (CAs), which are detected by conventional techniques in approximately 50% of patients,^{2,3} most of them considered to be in the high-risk cytogenetic category of the International Prognostic Scoring System (IPSS).⁴ Monosomal karyotype (MK) is defined as the presence of \geq two autosomal monosomies or one monosomy with at least one additional structural abnormality and has

been associated with worse prognosis in patients with AML,⁵ MDS,^{6,7} and primary myelofibrosis.⁸

In this retrospective study of the Spanish Group on MDS (GESMD), we analyzed the incidence, characteristics, outcome, and potential prognostic impact of MK in a large series of patients with MDS with at least one CA, focusing especially on assessing the ability of MK to independently predict outcome in patients with complex karyotype (CK).

PATIENTS AND METHODS

Patients

A total of 1,054 patients from the Spanish Registry of MDS, the common database of GESMD, were included in the study. Inclusion criteria were: diagnosis of de novo MDS according to WHO 2008 criteria and abnormal

David Valcárcel, Margarita Ortega, Julia Montoro, and Teresa Vallespi, Hospital Vall d'Hebrón, Universitat Autònoma de Barcelona; Vera Ademà, Francesc Solé, and Mar Mallo, Grup de Recerca Translacional en Neoplàsies Hematològiques, Institut de Recerca Hospital del Mar; Vera Ademà, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Benet Nomdedeu, Hospital Clínic, Barcelona; Guillermo Sanz, Hospital Universitario La Fe; Rosa Collado, Hospital General de Valencia, Valencia; Elisa Luño, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo; Consuelo Cañizo, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca; Javier de la Serna, Hospital 12 de Octubre, Madrid; Maite Ardanaz, Hospital Txagorritxu, Vitoria; Victor Marco, Hospital Arnau de Vilanova, Lleida; and Javier Grau, Institut de Recerca en leucèmies Josep Carreras, Institut Català d'Oncologia, Badalona, Spain.

Published online ahead of print at www.jco.org on January 14, 2013.

Written on behalf of the Spanish Group on Myelodysplastic Syndrome (GESMD).

Supported by unrestricted Grants No. FI 07/00107 (M.M.) and PI 11/02010 from Instituto de Salud Carlos III, El Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain; Grants No. RD07/0020/2004, RD12/0036/0044, and COST BM0801 from Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer, FEDER; and Grant No. PR(AG)28/2008 from a collaboration project between Institut de Recerca Vall d'Hebrón and Celgene.

Authors' disclosures of potential conflicts of interest and author contributions are found at the end of this article.

Corresponding author: David Valcárcel, MD, Department of Hematology, Vall d'Hebrón University Hospital, Pg. Vall d'Hebrón 119-129, 08035-Barcelona, Spain; e-mail: dvalcarcel.vhebron@me.com.

© 2013 by American Society of Clinical Oncology

0732-183X/13/3199-1/\$20.00

DOI: 10.1200/JCO.2012.41.6073

Table 1. Univariate and Multivariate Analyses for OS

Variable	All Patients (N = 1,054)				Patients With CK (n = 203)				Patients With Two CAs (n = 124)			
	Univariate <i>P</i>	Multivariate			Univariate <i>P</i>	Multivariate			Univariate <i>P</i>	Multivariate		
		HR	95% CI	<i>P</i>		HR	95% CI	<i>P</i>		HR	95% CI	<i>P</i>
Sex												
Male	.002*			NSS	NSS				NSS			
Age, years	< .001	1.92	1.51 to 2.42	< .001	< .001	1.80	1.21 to 2.7	.004	NSS			
> 60	< .001*				< .001*				NSS			
Bone marrow blasts†	< .001*	1.05	1.02 to 1.07	< .001	< .001*			NSS	.001			NSS
Peripheral blood blasts†	< .001*			NSS	NSS			NSS	.003			NSS
Hemoglobin level, g/L†	< .001				< .001	2.37	1.62 to 3.47	< .001	NSS			
< 100	< .001*	1.71	1.41 to 2.09	< .001	< .001*				NSS			
Platelet count, ×10 ⁹ /L†	< .001	1.46	1.17 to 1.81	.001	< .001	1.68	1.19 to 2.39	.004	.001			NSS
< 100	< .001*				< .001*				.002*			
Neutrophil count, ×10 ⁹ /L†	.012*			NSS	NSS				NSS			
WHO type‡	< .001*			NSS	< .001*	1.64	1.45 to 2.34	.007	.004*			NSS
IPSS risk group§	< .001*	1.48	1.10 to 1.99	.005	.096*			NSS	< .001*	2.53	1.45 to 4.42	< .001
Karyotype complexity	< .001*				—				—			—
Non-CK		1										
sCK		1.81	1.23 to 2.67	.003								
Very CK		2	1.51 to 2.64	< .001								
MK	< .001*			NSS	< .092*			NSS	.027*			NSS
No. of CAs†	< .001				< .001	1.64	1.18 to 2.28	.003	—			—
≥ 5 v < 5	< .001*				.006*							
Chromosome 5 and/or 7 alterations	< .001*	1.89	1.37 to 2.61	< .001	< .026*			NSS	NSS			

NOTE. For OS, the following variables were analyzed: age, sex, peripheral blood and bone marrow blast percentage (both as continuous variables), hemoglobin level, platelet count, neutrophil count, presence of MK, karyotype complexity (no complexity, sCK, and very CK), IPSS risk group, WHO morphologic subtype, and presence of chromosome 5 and/or 7 CAs. For patients with CK, number of CAs was also analyzed.

Abbreviations: CA, cytogenetic abnormality; CK, complex karyotype; HR, hazard ratio; IPSS, International Prognostic Scoring System; MK, monosomal karyotype; OS, overall survival; NSS, not statistically significant.

*Included in multivariate analysis.

†Introduced as continuous variable in the analysis.

‡Refractory anemia with excess blasts v refractory anemia.

§Intermediate-2 and high risk v low and intermediate-1 risk.

||Non-5/7 alterations v 5/7 alterations excluding isolated 5q deletion v isolated 5q deletion.

karyotype by conventional cytogenetic study. All patients were scrutinized and double-checked before inclusion to avoid duplication.

Cytogenetic Studies

Conventional G-banding cytogenetic studies were performed at diagnosis at the individual centers and described following the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2009).⁹ Structural CAs or extrachromosomes were considered clonal when they were found in at least two metaphases. For monosomies, it was required the presence of the same loss in at least three complete metaphases.⁹ Enumeration of the number of chromosome aberrations was performed according to the recommendations of Chun et al.¹⁰ Cytogenetics G-banding data from GESMD were independently reviewed by five expert cytogeneticists (V.A., F.S., M.O., M.M., T.V.).

According to the criteria of Breems et al,⁵ MK was defined as the presence of ≥ two autosomal monosomies or one monosomy with at least one additional structural CA. CK was defined following IPSS criteria as the presence of at least three CAs. Karyotype complexity was considered in accordance with Schanz et al,¹¹ including non-CK (< three CAs), sCK (to differentiate from CK used as classical definition in text; three CAs), and very CK (> three CAs). Sexual monosomies were not considered for MK because of their lack of impact on the evolution of the disease, as we have described previously¹² and confirmed again in our patient population (data not shown).

Statistical Analyses

The main end points of the study were overall survival (OS) and evolution to AML. OS was defined as time from diagnosis to death, censoring surviving patients at follow-up. Time to AML evolution was measured from diagnosis to development of AML, and patients free from AML were censored

at last follow-up or death. Mean and median values as well as 95% CIs and ranges were calculated for each continuous variable. *t* and Pearson χ^2 tests were used to compare continuous and qualitative variables. Probability of death and evolution to AML were calculated using Kaplan-Meier curves and compared using log-rank tests.¹³ Quantitative variables were tested first as continuous variables, and if they showed a statistically significant impact on outcome ($P < .05$), they were reanalyzed as categorical variables using a clinically meaningful cutoff (ie, age, 60 years; hemoglobin level, 100 g/L; and platelet count, $100 \times 10^9/L$) or the median value otherwise. Multivariate analyses were performed using the backward elimination Cox proportional hazards regression method,¹⁴ including those variables with a P value < .1 in univariate testing, except for the presence of MK, which was always introduced into the multivariate analysis because it was considered the main investigation variable. Tests of significance were two sided, and a P value of ≤ .05 was considered statistically significant. All statistical analyses were performed with SPSS version 17.0 (SPSS, Chicago, IL). Variables analyzed are listed in Tables 1 and 2.

RESULTS

Patients

A total of 1,054 patients were included in the study. Median follow-up for survivors was 24 months (range, 0.3 to 210 months). Patient characteristics are summarized in Table 3. CK was identified in 203 patients (19.3%; CK patients), of whom 150 (73.9%) also fulfilled

Table 2. Univariate and Multivariate Analyses for Leukemia-Free Survival

Variable	All Patients				Patients With CK				Patients With Two CAs			
	Univariate <i>P</i>	Multivariate			Univariate <i>P</i>	Multivariate			Univariate <i>P</i>	Multivariate		
		HR	95% CI	<i>P</i>		HR	95% CI	<i>P</i>		HR	95% CI	<i>P</i>
Sex												
Male	NSS				NSS				NSS			
Age, years	.039*			NSS	NSS				NSS			
> 60	NSS			—					NSS			
Bone marrow blasts†	< .001*	1.12	1.09 to 1.16	< .001	< .001*	1.09	1.045 to 1.14	< .001	< .001*	1.17	1.09 to 1.26	< .001
Peripheral blood blasts†	< .001*			NSS	.041*			NSS	NSS			
Hemoglobin level, g/L†	< .001			NSS	.026			NSS	.022			
< 100	.061*				.012*				NSS			
Platelet count, ×10 ⁹ /L†	< .001			NSS	NSS			NSS	.004			
< 100	< .001*				.007*				.035*			
Neutrophil count, ×10 ⁹ /L†	.002			NSS	NSS				.059			
WHO type‡	< .001*			NSS	.012*			NSS	.002			
IPSS risk group§	< .001*			NSS	.096*			NSS	< .001*			
Karyotype complexity	< .001*				—			—	—			—
Non-CK		1										
sCK		2.53	1.42 to 4.53	.002								
Very CK		2.77	1.77 to 4.35	< .001								
MK	< .001*			NSS	.65*			NSS	.20*			
No. of CAs†	< .001			—	.18							
≥ 5 v < 5	< .001*				.3							
Chromosome 5 and/or 7 alterations	< .001*	0.62	0.39 to 0.97	.038	.3				NSS			

NOTE. For OS, the following variables were analyzed: age, sex, peripheral blood and bone marrow blast percentage (both as continuous variables), hemoglobin level, platelet count, neutrophil count, presence of MK, karyotype complexity (no complexity, sCK, and very CK), IPSS risk group, WHO morphologic subtype, and presence of chromosome 5 and/or 7 CAs. For patients with CK, number of CAs was also analyzed.
Abbreviations: CA, cytogenetic abnormality; CK, complex karyotype; HR, hazard ratio; IPSS, International Prognostic Scoring System; MK, monosomal karyotype; OS, overall survival; NSS, not statistically significant.
*Included in multivariate analysis.
†Introduced as continuous variable in the analysis.
‡Refractory anemia with excess blasts v refractory anemia.
§Intermediate-2 and high risk v low and intermediate-1 risk.
||Non-5/7 alterations v 5/7 alterations excluding isolated 5q deletion v isolated 5q deletion.

the criteria for MK (CK-MK patients). MK was observed in 172 patients (16.3%; MK patients), of whom 150 (87.2%) had CK. Both CK and MK patients had worse prognosis baseline characteristics compared with patients without these CAs (Table 3). After excluding those CK-MK patients, baseline characteristics of isolated CK (n = 53) and MK patients (n = 22) were similar, except for a higher number of monosomies (median, one; range, one to two v median, zero; range, zero to one; *P* < .001) and lower number of CAs (median, two; range, two to two v median, three; range, three to 10; *P* < .001) in patients with MK versus CK, respectively. For CK-MK patients (n = 150), these figures were two monosomies (range, one to eight) and six CAs (range, three to 18).

Involved Chromosomes and Number of CAs

All chromosomes (except chromosome 1) were involved in at least one monosomy. A total of 227 patients (21.54%) had at least one monosomy, of whom 135 (59.47%) had only one monosomy, and 80 (60.10%) of these met the criteria for MK. Details regarding CAs are provided in Appendix Tables A1 to A3 and Appendix Figures A1 and A2 (online only).

The number of CAs was important in patient outcome; the higher the number of CAs, the lower the OS (HR, 1.22; 95% CI, 1.19 to 1.25; *P* < .001), and the higher the risk of AML evolution (HR, 1.20; 95% CI, 1.16 to 1.26; *P* < .001; Appendix Fig A2, online only). Median

OS for non-CK, sCK, and very CK patients was 47.7 (95% CI, 41.70 to 53.67), 10.23 (95% CI, 6.53 to 13.95), and 7.56 months (95% CI, 6.16 to 8.97), respectively (*P* < .001; Fig 1A).

The importance of the number of CAs persisted in MK patients. Thus, the higher the number of CAs, the lower the OS (HR, 1.074; 95% CI, 1.026 to 1.125; *P* < .001). Median OS for non-CK, sCK, and very CK patients was 20.57 (95% CI, 12.24 to 28.91), 9.38 (95% CI, 7.12 to 11.63), and 7.62 months (95% CI, 6.99 to 9.39), respectively (*P* = .02; Fig 1B).

Abnormalities of chromosome 7 were observed in 165 patients (77 CK patients and 88 non-CK patients); this abnormality was associated with shorter OS in CK patients (chromosome 7 CA: median OS, 7.6; 95% CI, 5.7 to 9.5 v non-chromosome 7 CA: median OS, 8.8 months; 95% CI, 7.3 to 10.3; *P* = .006) as well as in non-CK patients (median OS: 19.6 months; 95% CI, 15.6 to 23.7 v 53.3 months; 95% CI, 49 to 59.7; *P* < .001). Presence of chromosome 5 abnormalities (excluding isolated 5q deletion) was observed in 169 patients (136 CK and 33 non-CK patients). Again, this abnormality was also associated with shorter OS in both CK patients (chromosome 5 CA: median OS, 7.9 months; 95% CI, 6.9 to 8.8 v non-chromosome 5 CA: median OS, 12.3 months; 95% CI, 6.8 to 17.8; *P* = .013) and non-CK patients (median OS, 19 months; 95% CI, 10.7 to 27.2 v 40.2 months; 95% CI, 33.9 to 46.4; *P* = .023).

Table 3. Patient Demographic and Clinical Characteristics

Characteristic	All Patients		CK Patients		MK Patients	
	No.	%	No.	%	No.	%
Total patients	1,054		203	19.3	172	16.3
Sex						
Female	483	45.8	91	44.8	78	45.3
Male	571	54.2	112	55.2	94	54.7
Age, years						
Median	71.62		70		70.35	
Range	16.1-96.3		23-96.3		23-96.3	
> 60	814	77.2	157	77.3	133	77.3
Type of MDS				*		*
Refractory anemia	609	57.8	71	35	60	34.9
Refractory anemia with excess blasts	445	42.2	132	65	112	65.1
BM blasts percentage						
Median	4		7*		7*	
Range	0-19		0-19*		0-19*	
Hemoglobin level, g/L						
Median	95		88*		89*	
Range	22-166		45-152*		45-152*	
< 100	613	58.2	139*	68.5†	124*	72.1*
Platelet count, ×10 ⁹ /L						
Median	149		74.5*		75*	
Range	1-1,498		3-602*		3-586*	
< 100	353	33.5	126*	62.1*	104*	60.5*
ANC, ×10 ⁹ /L						
Median	1.7		1.2*		1.2*	
Range	0-19.4		0-11.8*		0-15*	
MK	172	16.3	150*	73.9*	172*	100*
CK	203	19.3	203	100	150	87.2
No. of monosomies						
Median	0		1*		2*	
Range	0-8		0-8*		10-8*	
0	827	78.5	52	25.6	0	0
1	135	12.8	60	29.6	80	46.5
2	44	4.2	43	21.2	44	25.6
3	22	2.1	22	10.8	22	12.8
≥ 4	26	2.5	26	12.9	26	15.1
Monosomies of chromosomes 5 and 7						
7	62	5.9	14	6.9	25	14.5
7 plus other monosomies	23	2.2	22	10.8	23	13.4
5	13	1.2	5	2.4	9	5.2
5 plus other monosomies	12	1.2	12	5.9	12	7
5 and 7	14	1.2	14	6.9	14	8.1
Other monosomies	103	9.8	84	41.4	89	51.7
No monosomies	827	78.5	52	25.6	0	0
No. of CAs, median (range)						
Median	1		5*		5*	
Range	0-18		3-18*		2-18*	
1	727	69	0	0	0	0
2	124	11.8	0	0	22	12.8
3	56	5.3	56	27.6	27	15.7
4	36	3.4	36	17.7	23	13.4
5	26	2.5	26	12.8	23	13.4
≥ 6	85	8.1	85	41.9	77	44.7
Abnormalities of chromosomes 5 and 7	534	50.7	160	78.8	142	82.6
7 CA	106	10	24	11.8	29	16.9

(continued on following page)

Table 3. Patient Demographic and Clinical Characteristics (continued)

Characteristic	All Patients		CK Patients		MK Patients	
	No.	%	No.	%	No.	%
5 CA	369	35.5	85	41.9	64	37.2
5 and 7 CAs	59	5.6	51	25.1	49	28.4
Other chromosomes involved	520	49.3	43	21.2	30	17.4
IPSS risk				*		*
Low	193	18.3	0	0	0	0
Intermediate-1	414	39.3	25	12.3	23	13.4
Intermediate-2	264	25	107	52.7	86	50
High	112	10.6	60	29.6	53	30
NA	71	6.7	11	5.4	10	5.8

Abbreviations: ANC, absolute neutrophil count; BM, bone marrow; CA, cytogenetic abnormality; CK, complex karyotype; IPSS, International Prognosis Scoring System; MDS, myelodysplastic syndrome; MK, monosomal karyotype; NA, not available.
*Statistically ($P < .001$) different compared with entire cohort of patients.
† $P = .004$.

Impact of Chromosomal Aberrations on OS

At last follow-up, 471 patients were alive for a median OS of 35.8 months (95% CI, 30.7 to 40.8). Median OS for MK patients versus non-MK patients was 8.1 months (95% CI, 7.1 to 9.1) versus 47.9

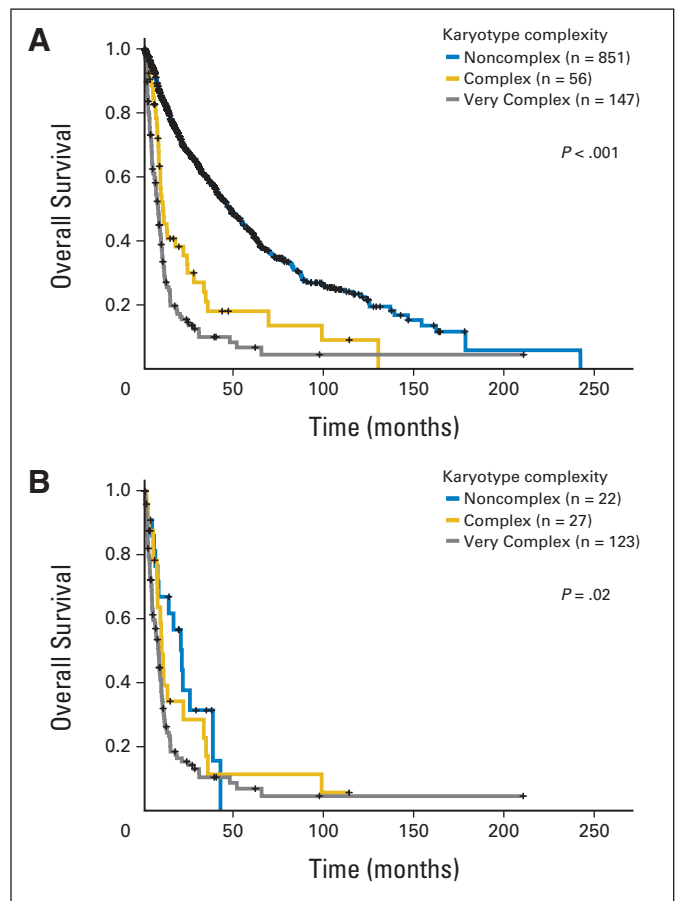


Fig 1. Overall survival according to karyotype complexity in (A) the whole population and (B) patients with monosomal karyotype.

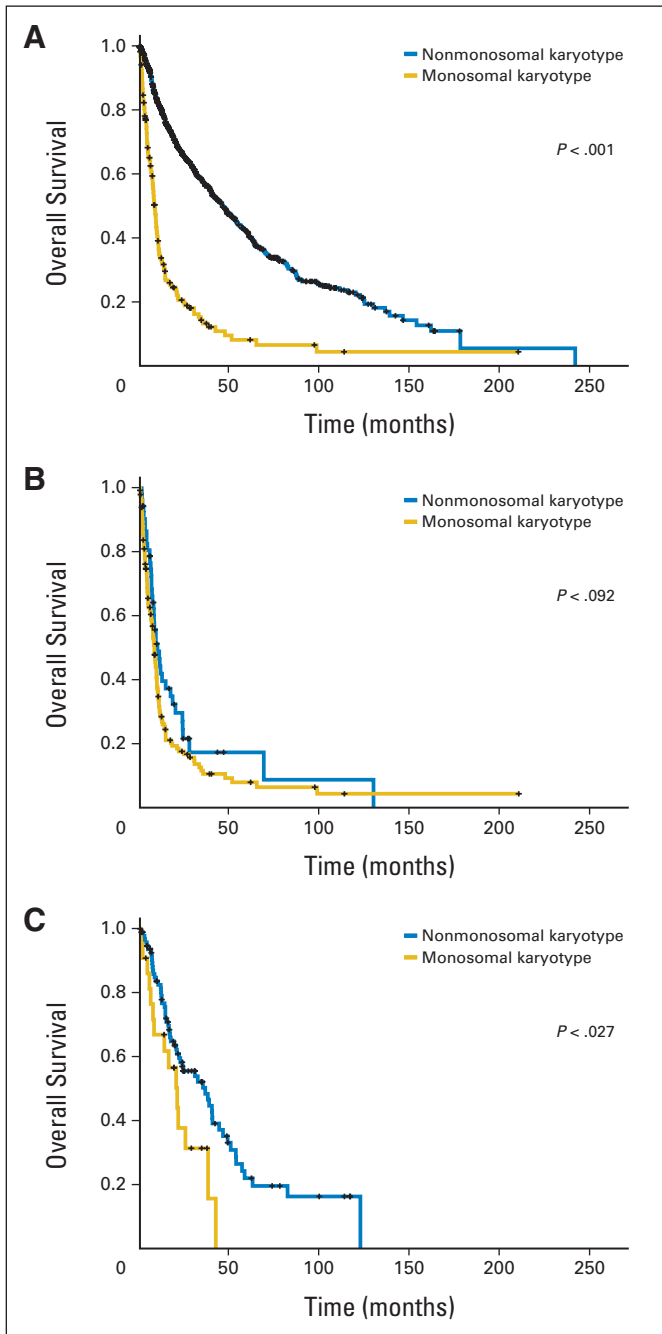


Fig 2. Overall survival for (A) monosomal (MK) and nonmonosomal karyotypes (non-MK), (B) MK and non-MK in complex karyotype patients, and (C) MK and non-MK in patients with two cytogenetic abnormalities.

months (95% CI, 41.9 to 53.8), respectively ($P < .001$; Fig 2A). Table 1 lists the main variables associated with lower OS. In multivariate analysis, variables that retained a statistical significance were: age > 60 years (hazard ratio [HR], 1.92; 95% CI, 1.51 to 2.42; $P < .001$), BM blast percentage (HR, 1.05; 95% CI, 1.02 to 1.07; $P < .001$), hemoglobin < 100 g/L (HR, 1.71; 95% CI, 1.41 to 2.09; $P < .001$), platelet count $< 100 \times 10^9/L$ (HR, 1.46; 95% CI, 1.17 to 1.81; $P < .001$), higher IPSS risk group (HR, 1.48; 95% CI, 1.10 to 1.99; $P = .005$), karyotype complexity (sCK: HR, 1.81; 95% CI, 1.23 to 2.67; $P = .003$;

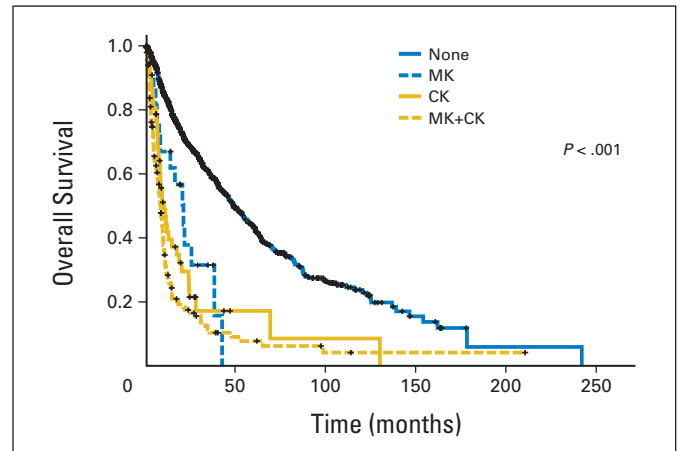


Fig 3. Overall survival according to presence of monosomal karyotype (MK), complex karyotype (CK), both, and none.

very CK: HR, 2; 95% CI, 1.51 to 2.64; $P < .001$), and abnormalities of chromosome 5 and/or 7 (HR, 1.89; 95% CI, 1.37 to 2.61; $P < .001$; Table 1). MK was not independently associated with different OS in multivariate analysis. Figures 2 and 3 show OS curves for patients with and without MK.

Median OS was 8.1 months (95% CI, 7.1 to 9.14) for CK patients and 47.7 months (95% CI, 41.7 to 53.67) for non-CK patients ($P < .001$). In CK patients, presence of MK showed only a trend toward lower OS ($P = .092$; Fig 2B). Other variables associated with lower OS in the univariate analysis are listed in Table 1. In the multivariate analysis, in CK patients, variables associated with shorter OS were age > 60 years (HR, 1.8; 95% CI, 1.21 to 2.7; $P = .004$), WHO subtype (refractory anemia with excess blasts ν refractory anemia; HR, 1.64; 95% CI, 1.45 to 2.34 $P = .007$), hemoglobin < 100 g/L (HR, 2.37; 95% CI, 1.62 to 3.47; $P < .001$), platelets $< 100 \times 10^9/L$ (HR, 1.68; 95% CI, 1.19 to 2.39; $P = .004$), and \geq five CAs (HR, 1.64; 95% CI, 1.18 to 2.28; $P = .003$; Table 1). MK was not independently associated with different OS.

The total number of patients with two CAs was 124 patients, and their median OS was 30.5 months (95% CI, 17.4 to 43.7). In a univariate analysis restricted to patients with two CAs, presence of MK ($n = 22$) was associated with lower OS (median OS, 20.8 ν 36.2 months for patients without MK [$n = 100$]; $P = .027$; Fig 2C). However, in a multivariate analysis, the only variable that retained statistical significance was higher IPSS risk group (HR, 2.53; 95% CI, 1.45 to 4.42; $P < .001$; Table 1).

Evolution to AML

At last follow-up, 221 patients (21%) had developed AML at a median time of 9 months (range, 1 to 125 months), and the 1- and 4-year probabilities of AML evolution were 14.2% (95% CI, 11.8 to 16.6%) and 28.6% (95% CI, 24.8% to 32.4%), respectively. Table 2 lists the variables showing a significantly higher risk of AML evolution. In multivariate analysis, the variables associated with higher risk of AML evolution were higher BM blasts (HR, 1.12; 95% CI, 1.09 to 1.16; $P < .001$) and karyotype complexity (sCK: HR, 2.54; 95% CI, 1.42 to 4.53; $P = .002$; very CK: HR, 2.77; 95% CI, 1.77 to 4.35; $P < .001$), whereas presence of isolated 5q deletion was a protective factor (HR, 0.62; 95% CI, 0.40 to 0.98; $P = .038$). MK was not independently

associated with higher risk of evolution to AML. Appendix Figure A3 (online only) plots the actuarial curves for AML evolution.

During the follow-up, 72 (35.5%) of 203 patients with CK developed AML, and the probabilities of 1- and 4-year AML evolution were 41.5% (95% CI, 32.9% to 50.1%) and 57.5% (95% CI, 25.5% to 60.5%), respectively. Variables associated with higher risk of AML evolution in patients with CK are listed in Table 2. Presence of MK did not show a significantly different risk of AML evolution, and the only factor associated with higher risk of AML evolution in multivariate analysis in CK patients was higher percentage of BM blasts (HR, 1.09; 95% CI, 1.05 to 1.14; $P < .001$).

Twenty-five (20.16%) of 124 patients with two CAs developed AML, and the 1- and 4-year probabilities of AML evolution were 11.6% (95% CI, 5% to 18.2%) and 32% (95% CI, 19.4% to 44.6%) respectively. Again, presence of MK was not associated with a different risk of AML evolution; higher percentage of BM blasts (HR, 1.17; 95% CI, 1.09 to 1.26; $P < .001$) was the sole factor clearly associated with higher risk of AML evolution.

Impact of Monosomies of Chromosome 5 and/or 7 on OS

Eighty-three patients had MK involving monosomies of chromosome 5 and/or 7 and 89 involving other monosomies. The univariate analysis including the whole population showed better OS for patients without MK versus MK without monosomy of chromosome 5 and/or 7 versus MK with monosomy of chromosome 5 and/or 7 (median OS, 46.17 months; 95% CI, 40.34 to 51.99 v 8.19 months; 95% CI, 6.36 to 10.02 v 8.12 months; 95% CI, 7.03 to 9.22, respectively; $P < .001$), and the impact persisted in a multivariate model (MK with monosomy 5 and/or 7: HR, 1.73; 95% CI, 1.14 to 2.64; $P < .01$ v MK without monosomy 5 and/or 7: HR, 1.05; 95% CI, 0.68 to 1.64; $P = .81$) compared with non-MK (HR, 1), whereas the other variables remain unchanged (Appendix Table A4; Appendix Fig A4, online only). The same analysis applied to leukemia-free survival did not show any impact of monosomies of chromosome 5 and/or 7 (data not shown).

Impact of Treatment

There were 431 patients who received at least one kind of therapy (AML-type chemotherapy, 103 patients; autologous stem-cell transplantation, eight patients; allogeneic stem-cell transplantation, 48 patients; lenalidomide, 141 patients; azacitidine, 108 patients; antithymocyte globulin \pm cyclosporine A, six patients; and erythropoiesis-stimulating agents, 226 patients). Some of these patients received more than one treatment. Results of a multivariate analysis in untreated patients only were quite similar to results with the same variables entered into the different regression models (data not shown), strongly suggesting that those results were not influenced by treatment.

DISCUSSION

Presence of MK has recently been associated with worse prognosis in patients with MDS,^{6,7} but our study shows that this is because MK is closely associated with a more complex karyotype, suggesting that it is greater complexity that explains the poor prognosis of these patients.

Incidence of MK in our series was 16.3%, and its presence was strongly related to CK; 87.2% of MK patients also met criteria for CK, and 73.9% of CK patients also fulfilled criteria for MK, which is in agreement with previous data from Patnaik et al.⁶ Both MK and CK patients had worse prognosis baseline characteristics compared with the global population, as summarized in Table 3.

In a recent study including only CK patients, Patnaik et al⁶ suggest that MK is associated with lower OS. Our results differ from those of Patnaik et al; in our study, MK only showed an association with lower OS in univariate analysis, but it no longer retained its significance in multivariate analysis, suggesting that its importance is related to some other variable, which seems to be CK. In fact, when patients were stratified into four groups (Fig 3), isolated MK patients showed higher OS compared with isolated CK patients, although the difference was not statistically significant ($P = .3$; data not shown), and the worse prognosis was for MK-CK patients. Trying to clarify the relevance of the presence of MK, we analyzed its impact on both CK patients and patients with only two CAs, which is the minimum necessary to fulfill the criteria for MK. In CK patients, MK was not statistically associated with lower OS in univariate or multivariate analysis, but the risk factors associated with lower OS in patients with CK were the classic variables (refractory anemia with excess blasts v refractory anemia, high IPSS, low hemoglobin level, and low platelet count) and higher number of CAs. In patients with only two CAs, although in univariate analysis patients with MK showed lower OS, this effect did not persist in multivariate analysis, in which the only variable associated with lower OS was higher IPSS risk group. In contrast, the karyotype complexity adverse prognostic value was retained in MK patients. As illustrated in Figure 1 and Appendix Figure A2 (online only), increase of karyotype complexity led to worse prognosis. This idea supports the hypothesis regarding the predominant role of karyotype complexity to determine prognosis in patients with MDS.

Belli et al⁷ suggest that MK is associated with poor prognosis, and although they did not specifically analyze the impact of MK in CK patients in a multivariate model, their survival curves suggest that MK did not further adversely affect prognosis. Finally, presence of MK was not associated with a different outcome in a recent study by Itzykson et al¹⁵ in patients with MDS who received azacitidine; the same group in a previous report¹⁶ identified presence of unfavorable cytogenetics (including CK and abnormalities of chromosome 7) as a poor prognosis factor for OS.

Although in our study the classic definition of CK was able to differentiate a worse prognostic group, we also included the new definition of very CK (\geq four CAs), as described by Schanz et al.¹² We confirmed its applicability; it was associated with worse OS and higher AML evolution compared with non-CK or sCK patients (three CAs) in multivariate analyses. This is especially of interest because this score was used in the development of the new revised version of the IPSS and has not been previously validated in a large independent cohort.

From a pathiopathologic point of view, presence of multiple CAs could be related to multiple genes alterations and thus worse prognosis. Conventional G-banding cytogenetic studies have some limitations in detecting CAs. Therefore, the introduction of newer and more sensitive techniques could be of great use in identifying CAs, leading to the identification of complex (higher-risk) karyotypes, as suggested by Tiu et al.¹⁷ In their study, the single-nucleotide polymorphism array application combined with conventional karyotyping found CAs in

74% of patients versus 44% using only conventional techniques ($P = .001$). Moreover, they could identify new alterations associated with lower OS in low-risk (IPSS) patients.

In addition to the number, the location of CAs seems to be of prognostic importance. The most frequent MK (ie, involving chromosomes 7 and/or 5) was exceedingly high, suggesting that such abnormalities could play a key role in the pathogenesis of MDS in that subset of patients. Moreover, MK involving these chromosomes was associated with worse prognosis (compared with non-MK or MK involving other chromosomes; Appendix Table A4, online only), and presence of CAs in these chromosomes (monosomies or not) was independently associated with lower OS and higher risk of AML evolution.

In conclusion, our study shows that although MK is closely associated with CK, it is the complexity of the karyotype (ie, number of chromosomal abnormalities) that is associated with lower OS and higher AML evolution. Taking into account the number of CAs, MK is not independently associated with poorer prognosis in patients with MDS. Finally, our findings support the inclusion of very CK but not

MK as the poorest risk category in the ongoing effort to update the IPSS.

AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The author(s) indicated no potential conflicts of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception and design: David Valcárcel, Francesc Solé, Teresa Vallespí
Provision of study materials or patients: David Valcárcel
Collection and assembly of data: David Valcárcel, Vera Ademà, Francesc Solé, Margarita Ortega, Benet Nomdedeu, Guillermo Sanz, Elisa Luño, Consuelo Cañizo, Javier de la Serna, Maite Ardanaz, Victor Marco, Rosa Collado, Javier Grau, Julia Montoro, Mar Mallo, Teresa Vallespí
Data analysis and interpretation: David Valcárcel, Vera Ademà, Francesc Solé, Guillermo Sanz, Mar Mallo, Teresa Vallespí
Manuscript writing: All authors
Final approval of manuscript: All authors

REFERENCES

- Tefferi A, Vardiman JW: Myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* 361:1872-1885, 2009
- 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* 110:4385-4395, 2007
- 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* 90:1168-1178, 2005
- Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al: International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 89:2079-2088, 1997
- Breems DA, van Putten WL, de Greef GE, et al: Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: A better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. *J Clin Oncol* 26:4791-4797, 2008
- Patnaik MM, Hanson CA, Hodnefield JM, et al: Monosomal karyotype in myelodysplastic syndromes, with or without monosomy 7 or 5, is prognostically worse than an otherwise complex karyotype. *Leukemia* 25:266-270, 2011
- Belli CB, Bengió R, Aranguren PN, et al: Partial and total monosomal karyotypes in myelodysplastic syndromes: Comparative prognostic relevance among 421 patients. *Am J Hematol* 86:540-545, 2011
- Vaidya R, Caramazza D, Begna KH, et al: Monosomal karyotype in primary myelofibrosis is detrimental to both overall and leukemia-free survival. *Blood* 117:5612-5615, 2011
- Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ (eds): *ISCN 2009: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Basel, Switzerland, Karger, 2009
- Chun K, Hagemeyer A, Iqbal A, et al: Implementation of standardized international karyotype scoring practices is needed to provide uniform and systematic evaluation for patients with myelodysplastic syndrome using IPSS criteria: An International Working Group on MDS Cytogenetics Study. *Leuk Res* 34:160-165, 2010
- Schanz J, Tüchler H, Solé F, et al: A new, comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes and oligoblastic AML following MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol* 30:820-829, 2012
- Solé F, Espinet B, Sanz GF, et al: Incidence, characterization and prognostic significance of chromosomal abnormalities in 640 patients with primary myelodysplastic syndromes: Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica. *Br J Haematol* 108:346-356, 2000
- Kaplan EL, Meier P: Non parametric estimation from incomplete observations. *J Am Statist Assoc* 53:457-481, 1958
- Cox D: Regression models and life tables. *J R Stat Soc* 34:187-220, 1972
- Itzykson R, Thépot S, Eclache V, et al: Prognostic significance of monosomal karyotype in higher risk myelodysplastic syndrome treated with azacitidine. *Leukemia* 25:1207-1209, 2011
- Itzykson R, Thépot S, Quesnel B, et al: Prognostic factors for response and overall survival in 282 patients with higher-risk myelodysplastic syndromes treated with azacitidine. *Blood* 117:403-411, 2011
- Tiu RV, Gondek LP, O'Keefe CL, et al: Prognostic impact of SNP array karyotyping in myelodysplastic syndromes and related myeloid malignancies. *Blood* 117:4552-4560, 2011

Acknowledgment

We thank all the participating investigators of the Spanish Registry of Myelodysplastic Syndrome and its central data manager, Lluís Benlloch, for collecting patient data. We thank Dr Francesc Bosch for his critical review of the manuscript.

Appendix**Table A1.** Description of CAs in the Whole Population and in Patients With MK

CA	All Patients	MK Patients
CK	203	150
Including -7	85	58
Including -5	25	21
Including -5 and -7	14	14
Inversion 3q	5	2
Monosomy 7 (noncomplex)	49	10
Deletion 7q	22	16
Monosomy 5 (noncomplex)	8	4
Isolated 5q-	258	0
5q- and other CA	15	3*
Isolated trisomy 8	104	0
Trisomy 8 and other CA	21	
Deletion 11q	27	6
Deletion 12p	19	5
Deletion 17p	3	0
Isochromosome 17q	23	8
Deletion 20q	55	2
Trisomy 21	9	0
Monosomy 21	6	2
-Y	83	3
Other trisomies	34	7
Other monosomies	47	33
Translocations	80	37
Other	93	1

Abbreviations: CA, cytogenetic abnormality; CK, complex karyotype; MK, monosomal karyotype.
 *All with associated monosomy 7 (not included in monosomy 7 noncomplex category).

Karyotype Complexity Explains the Poor Prognosis of Monosomal Karyotype

Table A2. Detailed Information of Chromosomes Involved in Monosomies

Chromosome in Monosomy	Frequency	Isolated	Combined
1	0	0	0
2	7	2	5
3	15	3	12
4	8	1	7
5	36	10	26
6	15	1	14
7	62	27	35
8	7	1	6
9	8	1	7
10	4	1	3
11	12	3	9
12	14	1	13
13	17	4	13
14	15	2	13
15	17	1	16
16	15	4	11
17	22	5	17
18	26	4	22
19	9	1	8
20	18	4	14
21	25	1	24
22	9	3	6

Table A3. Detailed Information of CAs Found in Patients With MK

Alteration	Frequency
-2	7
-3	15
inv(3)(q21q26)	2
-4	8
-5	36
5q-	79
-6	15
-7	62
7q-	15
+8	23
-8	7
-9	8
-10	4
+11	4
-11	12
11q-	6
-12	14
12p-	5
+13	1
-13	17
13q-	5
-14	15
-15	17
-16	15
i(17)(q10)	7
-17	22
-18	26
-19	9
-20	18
del(20)(q11q13)	7
+21	3
-21	25
-22	9
-X	4
-Y	6

Abbreviations: CA, cytogenetic abnormality; MK, monosomal karyotype.

Karyotype Complexity Explains the Poor Prognosis of Monosomal Karyotype

Table A4. Multivariate Analysis Including MKs Involving Chromosome 5 and/or 7 Monosomy Instead of All MKs

Variable	OS				AML-Free Survival				
	Univariate <i>P</i>	Multivariate			Univariate		Multivariate		
		HR	95% CI	<i>P</i>	HR	95% CI	HR	95% CI	<i>P</i>
Sex									
Male	.002*			NSS		NSS			NSS
Age, years	< .001	1.90	1.51 to 2.42	< .001		.039*			NSS
> 60	< .001*					NSS			
Bone marrow blasts†	< .001*	1.046	1.02 to 1.07	< .001		< .001*	1.12	1.09 to 1.15	< .001
Peripheral blood blasts†	< .001*			NSS		< .001*			NSS
Hemoglobin level, g/L†	< .001					< .001			NSS
< 100	< .001*	1.70	1.40 to 2.07	< .001		.061*			
Platelet count, ×10 ⁹ /L†	< .001	1.48	1.19 to 1.83	.001		< .001			NSS
< 100	< .001*					< .001*			
Neutrophil count, ×10 ⁹ /L†	.012*			NSS		.002			NSS
WHO type‡	< .001*			NSS		< .001*			NSS
IPSS risk group§	< .001*	1.52	1.12 to 2.07	.006		< .001*			NSS
Karyotype complexity	< .001*					< .001*			
Non-CK		1					1		
sCK		1.54	0.99 to 2.4	.052			2.53	1.42 to 5.53	.002
Very CK		1.76	1.15 to 2.69	< .001			2.77	1.77 to 4.35	< .001
MK	< .001*					< .001*			NSS
No		1							
Yes, involving chromosomes 5 and/or 7		1.73	1.14 to 2.64	.01					
Yes, not involving chromosomes 5 and/or 7		1.05	0.68 to 1.64	.81					
Chromosome 5 and/or 7 alterations	< .001*	1.74	1.25 to 2.42	< .001		< .001*	0.62	0.39 to 0.97	.03

Abbreviations: AML, acute myeloid leukemia; CA, cytogenetic abnormality; CK, complex karyotype; HR, hazard ratio; IPSS, International Prognostic Scoring System; MK, monosomal karyotype; OS, overall survival; NSS, not statistically significant.

*Included in multivariate analysis.

†Introduced as continuous variable in the analysis.

‡Refractory anemia with excess blasts v refractory anemia.

§Intermediate-2 and high risk v low and intermediate-1 risk.

||Non-5/7 alterations v 5/7 alterations excluding isolated 5q deletion v isolated 5q deletion.

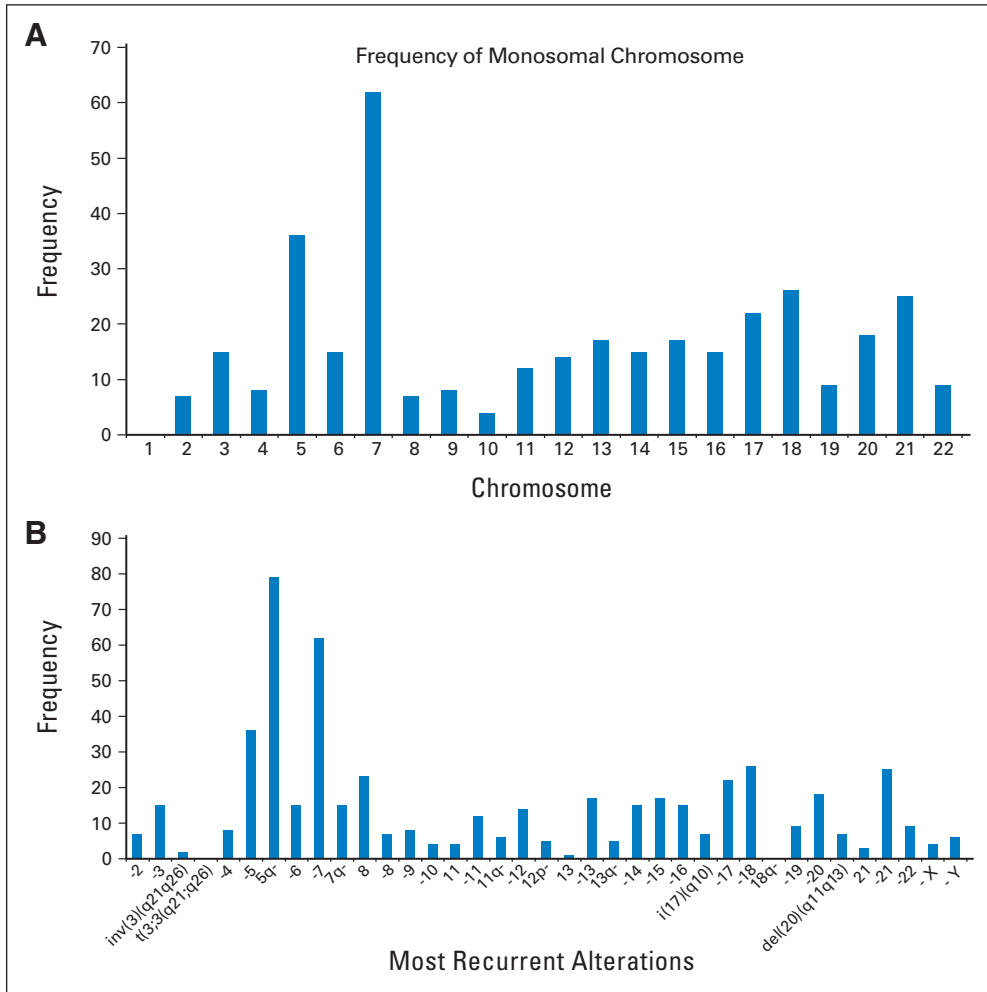


Fig A1. Involved chromosomes in (A) monosomies and (B) most frequent cytogenetic abnormalities.

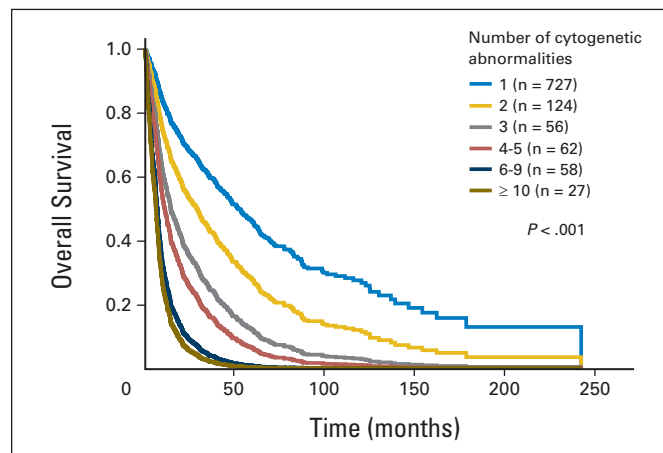


Fig A2. Impact of the number of cytogenetic abnormalities.

Karyotype Complexity Explains the Poor Prognosis of Monosomal Karyotype

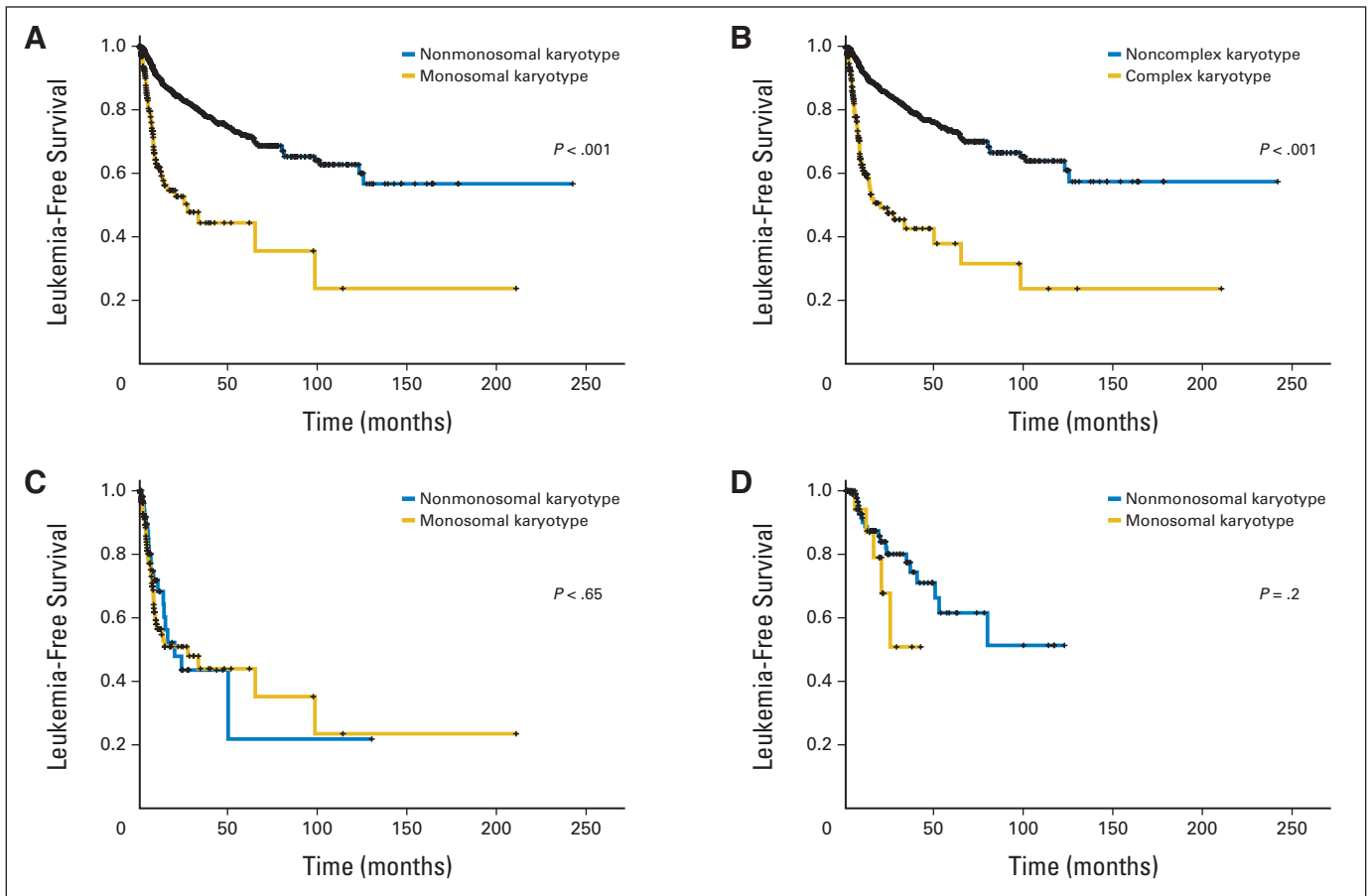


Fig A3. Leukemia-free survival for (A) patients with monosomal (MK) and nonmonosomal karyotypes (non-MK), (B) patients with complex (CK) and noncomplex karyotypes (non-CK), (C) MK and non-MK in CK patients, and (D) MK and non-MK in patients with two cytogenetic abnormalities.

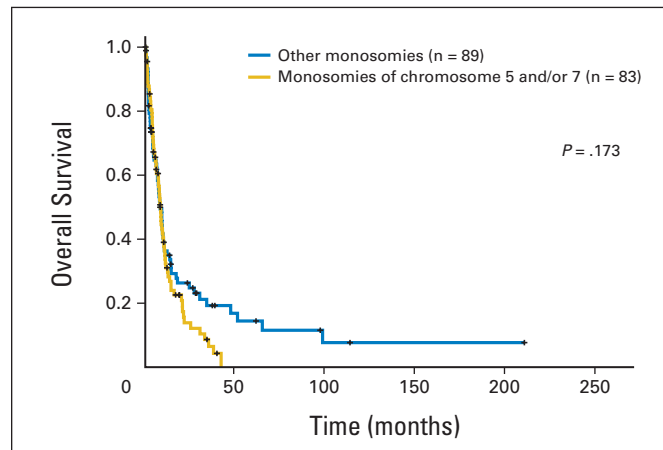


Fig A4. Overall survival in monosomal karyotype for patients with chromosome 5 and/or 7 monosomies versus other monosomies.

4.2 LA APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE FISH EN PACIENTES CON SÍNDROME MIELODISPLÁSICO SIN MONOSOMÍA 7 O DELECCIÓN 7Q POR CITOGENÉTICA CONVENCIONAL DE BANDAS-G.

Las alteraciones cromosómicas se detectan entre un 40-60% de los pacientes con SMD *de novo*. Estas proporcionan información importante para el pronóstico y diagnóstico de los pacientes. Las alteraciones en el cromosoma 7 se detectan en un 10% de los pacientes con SMD, como son la monosomía 7 o la deleción en 7q (Haase et al., 2007). Esta alteración, de acuerdo, con la clasificación citogenética del IPSS queda en el grupo de mal pronóstico y la mayoría de estos pacientes presentarán como mínimo un riesgo Intermedio-2 (Greenberg et al., 1997, 1998). Aunque la citogenética convencional (CC) ha demostrado su fiabilidad, presenta ciertas limitaciones como una menor sensibilidad que el FISH, la necesidad de células en división (metafases) y que los resultados pueden ser difíciles de interpretar debido a una baja calidad de las preparaciones cromosómicas. En cambio el FISH nos permite analizar células en interfase y presenta una alta sensibilidad, aunque sólo nos permitirá obtener resultados de la sonda que hayamos aplicado. La clasificación citogenética del IPSS incluye las alteraciones del cromosoma 7 en el grupo de mal pronóstico y de acuerdo con el IPSS-R (Greenberg et al., 2012) la deleción 7q presenta un pronóstico intermedio y la monosomía 7 se clasifica en el grupo de mal pronóstico.

El objetivo del estudio consiste en aplicar la técnica de FISH con la sonda 7q31 [D7S486/CEN 7 (D7Z1)] en pacientes cuya citogenética convencional no mostró monosomía 7 o deleción 7q para determinar si el resultado mediante FISH afecta a la clasificación pronóstica de estos pacientes.

Un total de 820 pacientes diagnosticados de SMD fueron recopilados retrospectivamente desde 1981 hasta 2011 de 14 hospitales afiliados al *Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica* (GECGH). El grupo de estudio estaba formado por 773 pacientes y un grupo con-

total de 47 casos que presentaban -7 o del(7q) mediante CC. Estos se clasificaron de acuerdo con los grupos de riesgo morfológico de la WHO 2008: Bajo riesgo: CRDU, ARSA, SMD con del(5q) aislada; Riesgo intermedio: CRDM y AREB-1; Alto riesgo: AREB-2. Las AREB-T, fueron descartadas. A nivel de cariotipo se clasificaron en 7 grupos distintos: citogenética normal en 20 metafases, normal entre 10-19 metafases y normal entre 1-9 metafases, citogenética alterada sin evidencias de -7 o del(7q), citogenética alterada con el cromosoma 7 involucrado sin que suponga una -7 o del(7q) o sin metafases.

La técnica de FISH nos permitió detectar un 5,2% (n=40) de casos positivos, de los cuales 8 presentaron una monosomía 7 y 32 pacientes una deleción 7q. La mayoría de los pacientes presentaban una CRDM (n=14). Respecto a los cariotipos normales, el porcentaje más elevado de casos positivos fue en el cariotipo normal de 1-9 metafases (11,1%) y el porcentaje más bajo en los pacientes con 20 metafases (2,4%). El grupo sin metafases presentó un porcentaje similar (8,6%) al de los pacientes con citogenética normal entre 1-9 metafases. La SG se calculó en 612 pacientes, demostrando que pacientes con un resultado de FISH positivo presentaron una peor SG respecto a los pacientes con un FISH negativo ($P < 0,001$) (Figura 24).

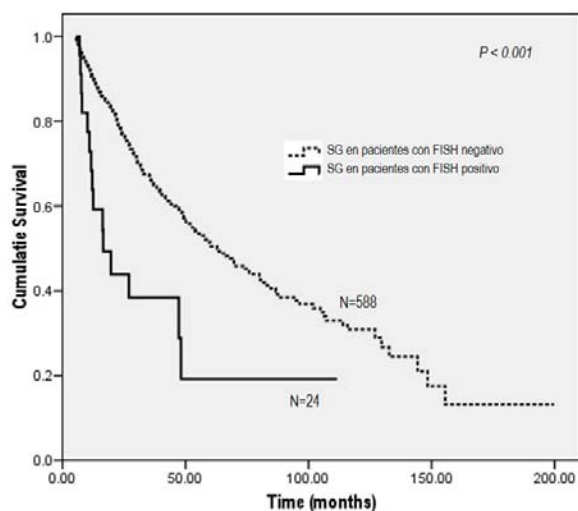


Figura 24_ Curvas Kaplan-Meier de SG entre pacientes con resultado de FISH positivo y negativo.

Los pacientes se estratificaron de acuerdo con los grupos citogenéticos del IPSS, siendo el grupo de riesgo intermedio el que presentó una diferencia significativa en la mediana de la SG entre los pacientes que presentaron un resultado de FISH positivo y los que no (9,9 vs. 37,1; $P=0,006$; meses respectivamente). El grupo control ($n=47$) presentó una concordancia del 100% entre los resultados obtenidos por FISH y por CC.

Los análisis de FISH con la sonda 7q31 nos permitieron detectar un 5,2% de casos positivos que no presentaban evidencia de -7 o $del(7q)$ o $add(7q)$ por CC. Esto es importante ya que las alteraciones en el cromosoma 7 se relacionan con un impacto pronóstico negativo y requieren tratamientos más agresivos. Aunque la CC es la técnica “gold estándar” para el diagnóstico de los SMD presenta ciertas limitaciones que pueden ser suplidas aplicando la técnica de FISH. Nuestros resultados sugieren que sería aconsejable la aplicación del FISH 7q en pacientes con un riesgo morfológico intermedio según la clasificación de la WHO 2008, para los que la CC no haya detectado -7 o $del(7q)$. Además recomendamos la aplicación del FISH en los pacientes con alteraciones -7 o $del(7q)$ que no cumplan los criterios de clonalidad.

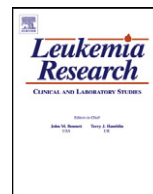
Los resultados de este trabajo han sido publicados en la revista *Leukemia Research* y se adjunta a continuación.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Leukemia Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/leukres



Application of FISH 7q in MDS patients without monosomy 7 or 7q deletion by conventional G-banding cytogenetics: Does $-7/7q-$ detection by FISH have prognostic value?

Vera Ademà^{a,b,c}, Jesús María Hernández^d, María Abáigar^d, Eva Lumbreras^d, Esperanza Such^e, Anna Calull^b, Esther Dominguez^b, Leonor Arenillas^b, Mar Mallo^{a,b,c}, José Cervera^e, Isabel Marugán^f, Mar Tormo^f, Francisca García^f, Teresa González^g, Elisa Luño^h, Carmen Sanzo^h, María Luisa Martínⁱ, Manuela Fernándezⁱ, Dolors Costa^j, Beatriz Blázquez^k, Beatriz Barreña^k, Fernando Marco^k, Ana Batlle^l, Ismael Buño^m, Carolina Martínez-Laperche^m, Víctor Noriega^m, Rosa Colladoⁿ, David Ivarsⁿ, Félix Carbonellⁿ, Isabel Vallcorba^o, Josefa Melero^o, Elena Delgado^o, María Teresa Vargas^p, Javier Grau^q, Marta Salido^b, Blanca Espinet^b, Carme Melero^b, Lourdes Florensa^b, Carmen Pedro^r, Francesc Solé^{a,b,*}

^a Institut de Recerca Contra la Leucèmia Josep Carreras, Hospital Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Spain

^b Laboratori de Citogenètica Molecular, Laboratori de Citologia Hematològica, Servei de Patologia, Hospital del Mar, GRETNHE, IMIM (Hospital del Mar Research Institute), Barcelona, Spain

^c Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

^d Servicio de Hematología y IBMCC, Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain

^e Laboratorio de Citogenética, Servicio de Hematología, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain

^f Servicio de Hematología y Oncología Médica, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain

^g Citoxenética-oncohematológica, Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, Hospital Clínico Universitario, Santiago de Compostela, Spain

^h Servicio de Hematología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain

ⁱ Servicio de Genética, Sección de Onco-Hematología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

^j Servei d'Hematopatologia, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

^k Servicio de Hematología, Hospital de Basurto, Bilbao, Spain

^l Sección de Citogenética Onco-Hematológica, Laboratorio de Hematología, Servicio de Hematología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain

^m Laboratorio de Genética Hematológica, Servicio de Hematología, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain

ⁿ Servicio de Hematología, Hospital General de Valencia, Valencia, Spain

^o Servicio de Inmunología y Genética y Servicio de Hematología, Hospital Infanta Cristina, Badajoz, Spain

^p Unidad de Genética, Hospital Virgen de la Macarena, Sevilla, Spain

^q Servei d'Hematologia, Hospital ICO Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

^r Servei d'Hematologia Clínica, Parc de Salut Mar, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 September 2012

Received in revised form 7 December 2012

Accepted 13 December 2012

Available online xxx

Keywords:

MDS
Cytogenetics
FISH
Chromosome 7

ABSTRACT

Chromosomal abnormalities are detected in 40–60% of patients with *de novo* myelodysplastic syndromes (MDS). This study used the FISH technique in 773 patients with *de novo* MDS without evidence of monosomy 7 (-7) or 7q deletion ($7q-$) by conventional G-banding cytogenetics (CC) to analyze their prognostic impact by FISH alone. FISH detected $-7/7q-$ in 5.2% of patients. Presence of $-7/7q-$ was associated with shorter overall survival than absence of such aberrations. Our results suggest that FISH 7q could be beneficial in patients with intermediate WHO morphologic risk stratification and no evidence of $-7/7q-$ by CC.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author at: Institut de Recerca Contra la Leucèmia Josep Carreras (IJC) Carretera, de Can Ruti, Camí de les Escoles s/n, Edifici IMPPC 08916 Badalona (Barcelona), Spain. Tel.: +34 93 557 28 06.

E-mail address: fsole@carrerasresearch.org (F. Solé).

0145-2126/\$ – see front matter © 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2012.12.010>

Please cite this article in press as: Ademà V, et al. Application of FISH 7q in MDS patients without monosomy 7 or 7q deletion by conventional G-banding cytogenetics: Does $-7/7q-$ detection by FISH have prognostic value? *Leuk Res* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2012.12.010>

1. Introduction

Myelodysplastic syndromes (MDS) are a heterogeneous group of clonal stem cell disorders, characterized by inefficient hematopoiesis, peripheral blood cytopenias and increased risk of progression to acute myeloid leukemia (AML). The most common chromosomal abnormalities detected by conventional G-banding cytogenetics (CC) are deletion of 5q, monosomy of chromosome 7 (-7), deletion of 7q (7q-), gain of chromosome 8, deletion of 11q, deletion of 12p and deletion of 20q. The prognosis of MDS is highly variable. Patients may live with stable disease for 10 or more years, or cytopenias or leukemic progression can lead to death within a few months [1].

Chromosomal abnormalities in bone marrow cells are found in 40–60% of MDS patients [2]. Although CC has been reliably used for clinical karyotyping and is the gold standard, it has some limitations. It requires dividing cells from the neoplastic clone, results can be difficult to interpret (sometimes due to the poor quality of chromosomal preparations) and it has a low sensitivity. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) is an additional technique which does not require dividing cells and can be quantified easily, is commonly used to identify specific aberrations. The major advantage of FISH is its higher sensitivity, achieved by analysis of a greater number of cells compared with CC, in which only 20 metaphases are routinely analyzed. Approximately 10% of patients with MDS carry -7 or 7q- [3], either in isolation, in addition to another alteration, or as part of a complex karyotype.

Cytogenetic data are used to classify patients according to three different groups: “good prognosis”, defined as a normal karyotype, deletion of 5q, deletion of 20q or loss of chromosome Y (as a sole alteration); “poor prognosis”, defined as a complex karyotype (≥ 3 abnormalities) or chromosome 7 abnormalities; and “intermediate prognosis”, which includes any other alteration. Recently a new classification for cytogenetic abnormalities has been proposed [4], which has five prognostic groups: “very good prognosis” for 11q deletion or loss of chromosome Y as a unique alteration; “good prognosis” for normal karyotype der(1;7), 5q deletion, 12p deletion or 20q deletion (each as a unique alteration) and double alterations with 5q deletion; “intermediate prognosis” for 7q deletion, trisomy 8, i(17q), trisomy 19, trisomy 21, other single alterations and other double alterations; “poor prognosis” for der(3)(q21q26) and -7 single alterations, double alterations with -7 or 7q- and a complex karyotype with three alterations; and “very poor prognosis” for complex karyotypes with more than three alterations. Scoring systems have been established to predict prognosis in terms of survival and progression to AML. The International Prognostic Scoring System (IPSS), introduced in 1997, is the most commonly used system. It has become the gold standard for risk assessment in patients with *de novo* MDS [5], and includes variables such as number of cytopenias, percentage of blasts and karyotype. The majority of patients with a CC “poor prognosis” classification tend to be classified by the IPSS as high risk (intermediate-2 or high). Such patients can be candidates to be treated with hypomethylating agents if they are not

candidates for allogeneic stem cell transplantation. In particular, 5-azacitidine (AZA) has demonstrated a survival benefit over other conventional treatments [6,7]. Overall survival with AZA treatment is better in patients with -7 or 7q- as a sole alteration compared with -7 or 7q- alterations as part of a complex karyotype.

The aim of the present study was to apply the FISH technique to test for 7q in a large series of *de novo* MDS patients in whom CC analysis did not detect -7 or 7q- alterations, and to assess whether FISH analysis affects the prognostic classification of these patients.

2. Patients, materials and methods

Clinical and cytogenetic data were compiled retrospectively for 820 patients diagnosed with *de novo* MDS between 1981 and 2011 across 14 hospitals affiliated to the Spanish Hematological Cytogenetic Working Group (GCECGH). Cytogenetic samples were stored at -80 °C. Patients were classified in each hospital at the time of diagnosis according to the French-American-British (FAB) classification [8] ($n = 758$) and/or the 2008 World Health Organization (WHO) criteria [9] ($n = 749$).

We classified patients according to the WHO morphologic risk stratification: low-risk (refractory cytopenia with unilineage dysplasia (RCDU), refractory anemia with ring sideroblasts (RARS) and MDS associated with isolated del(5q)), intermediate-risk (refractory cytopenia with multilineage dysplasia (RCMD) and refractory anemia with an excess of blasts-1 (RAEB-1)) or high-risk (refractory anemia with an excess of blasts-2 (RAEB-2)). Patients with refractory anemia with an excess of blasts in transformation (RAEB-t) (FAB classification) or AML (according to WHO classification) were excluded.

Patients were categorized for this study according to CC findings at the time of diagnosis: the “test group” comprised the 773 patients without CC evidence of -7, 7q- or add(7q) (Tables 1 and 2), and the “control group” comprised the 47 patients with CC evidence of -7, 7q- or add(7q), who served as positive controls (Supplemental Table 1). Patients included in the control group had at least three metaphases with -7 or two metaphases with 7q- or add(7q).

Supplementary material related to this article found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2012.12.010>.

This study was performed in accordance with the declaration of Helsinki.

Cytogenetic and FISH analyses were performed on bone marrow samples (prior to treatment) at individual laboratories with short-term non-stimulated cultures, according to standard procedures.

Karyotypes were described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) 2009 [10]. Patients were divided into seven subgroups depending on their karyotype: 20 normal metaphases (N20), between 10 and 19 normal metaphases (N10–19), between 1 and 9 normal metaphases (N1–9), abnormal karyotype without chromosome 7 affected (AOUT7), abnormal karyotype with chromosome 7 affected but not -7, 7q- or add(7q) (A7), non-informative cases or with no metaphases (NM) and the group of control cases with -7, 7q- or add(7q) (C7).

FISH analyses were carried out following standard procedures on fixed cells to detect -7 or 7q-. The probe set consisted of *LSI D7S486 7q31/CEP 7* (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, USA). The number of interphase nuclei analyzed ranged from 100 to 400. Interphase FISH cut-off percentages varied between centers. The mean cut-off value was 10% for -7 and 5% for 7q-.

Statistical analyses were carried out in the overall series of patients. We assessed the survival univariate and multivariate associations between the following variables: CC, FISH result and WHO risk stratification, using the Cox proportional hazards regression model. We included variables at univariate analysis with a $P < 0.1$ into the multivariate analysis (Table 3 (includes all patients) and Table 4 (includes patients with normal CC)).

The Kaplan-Meier method was used to estimate the probability of overall survival (OS). The OS was measured from hematological diagnosis to death or last follow-up (minimum follow-up 6 months). All deaths, whether or not related to MDS, were considered as the endpoint of the follow-up interval. Statistical comparisons between different actuarial curves were based on log-rank test. All P -values reported are two-sided. The selected P value to considering differences statistically

Table 1
Conventional G-banding cytogenetics (CC) and FISH 7q data from the test group.

Conventional G-banding cytogenetic group	Cases	FISH result		Total, n (%)
		-7, n (%)	7q-, n (%)	
Normal in 20 metaphases (N20)	288	1 (0.3%)	6 (2.1%)	7 (2.4%)
Normal in 10–19 metaphases (N10–19)	118	2 (1.7%)	5 (4.2%)	8 (5.9%)
Normal in 1–9 metaphases (N1–9)	27	0 (0.0%)	3 (11.1%)	3 (11.1%)
Abnormal without evidence of -7 or 7q- (AOUT7)	197	2 (1.0%)	7 (3.6%)	10 (5.3%)
Abnormal with chromosome 7 affected but not -7 or 7q- (A7)	4	1 (25.0%)	1 (25.0%)	2 (50.0%)
No metaphases (NM)	139	2 (1.4%)	10 (7.2%)	12 (8.6%)
Total	773	8 (1.0%)	32 (4.1%)	40 (5.2%)

Table 2Diagnosis, conventional G-banding cytogenetic and FISH data from MDS patients with -7 or $7q-$ alterations detected only by FISH.

Case	FAB	2008 WHO	Karyotype by conventional G-banding cytogenetics	Group	FISH result	
					-7 or $7q-$	%POS
1	RA	RCMD	46,XX[20]	N20	$7q-$	34.0
2	RA	RCMD	46,XY[20]	N20	$7q-$	8.0
3	RARS	RCMD	46,XY[20]	N20	$7q-$	29.0
4	RAEB	RAEB-1	46,XX[20]	N20	$7q-$	30.0
5	RAEB	RAEB-1	46,XX[20]	N20	$7q-$	25.0
6	RAEB	RAEB-1	46,XY[20]	N20	$7q-$	11.0
7	RAEB	RAEB-2	45,XY,-7[2]/46,XY[28] (non clonal)	N20	-7	18.0
8	RA	RCMD	46,XY[10]	N10-19	$7q-$	31.0
9	RA	RCMD	46,XY,del(7)(q21q31)[1]/46,XY[13] (non clonal)	N10-19	$7q-$	8.5
10	RAEB	RAEB-1	46,XY[15]	N10-19	$7q-$	20.0
11	RAEB	RAEB-2	46,XY[12]	N10-19	$7q-$	17.0
12	RAEB	RAEB-2	46,XX[14]	N10-19	$7q-$	22.0
13	RA	RCMD	46,XY[15]	N10-19	-7	59.0
14	RAEB	RAEB-1	47,XY,+8[2]/46,XY[18]	N10-19	-7	51.5
15	RA	MDS-U	46,XY[4]	N1-9	$7q-$	11.5
16	RARS	RCMD	46,XY[7]	N1-9	$7q-$	57.0
17	RAEB	RAEB-2	46,XX,del(5)(q13q31),del(7)(q21q31)[1]/44,XX,del(5)(q13q31),del(6)(q21),-7,t(8;16)(p13;p13),-12[1]/46,XX[5] (non clonal)	N1-9	$7q-$	25.0
18	RA	RCMD	46,XX,del(5)(q13q33)[18]/46,XX[2]	AOUT7	$7q-$	8.0
19	RARS	RARS	46,XX,del(5)(q13q31)[11]/46,XX[9]	AOUT7	$7q-$	20.0
20	ND	RCMD	47,XX,+8[5]/46,XX[17]	AOUT7	$7q-$	15.0
21	RAEB	RAEB-1	45,XX,-5[12]/complex karyotype with trisomy and tetrasomy of chromosome 5[18]	AOUT7	$7q-$	41.7
22	RAEB	RAEB-2	46,XY,del(5)(q13q33),i(17)(q10)[2]/45,XY,sl,-9[13]/44,XY,sdl1,-7,dic(7;20),-20[2]/46,XY[2] (non clonal)	AOUT7	$7q-$	60.0
23	RAEB	RAEB-2	43,XX,add(1)(q34),del(4)(q22),-10,-13,-15[5]/46,XX,sl,-11,+mar[5]/46,XX[10]	AOUT7	$7q-$	70.0
24	RAEB-t	RAEB-2	47,XY,+mar[3]/46,XY[10]	AOUT7	$7q-$	25.0
25	RAEB	RAEB-1	45,XX,del(5)(q13q31),t(13;14)(p11;p11),-14[12]/46,XX[8]	AOUT7	-7	73.0
26	RAEB	RAEB-2	45,XY,-7,der(5)t(5;?)(q31;?),t(9;17)(p13p11)[2]/46,XY,t(9;17)(p13;p11)[1]/46,XY[1] (no clonal)	AOUT7	-7	70.0
27	RAEB	RAEB-2	46,XY,der(7)t(1;7)(q21;q11.2)[6]/47,XY,sl,+8[8]	A7	$7q-$	68.0
28	RAEB	RAEB-2	46,X,t(X;1;20)(q21;p22;?),del(5)(q13q34),add(7p),r(20)[15]	A7	-7	60.0
29	RA	ND	No metaphases	NM	$7q-$	72.0
30	RA	RCMD	No metaphases	NM	$7q-$	60.5
31	RA	RCMD	No metaphases	NM	$7q-$	52.5
32	RA	RCMD	No metaphases	NM	$7q-$	40.0
33	RA	RCMD	No metaphases	NM	$7q-$	35.0
34	RA	RCMD	No metaphases	NM	$7q-$	31.0
35	RAEB	ND	No metaphases	NM	$7q-$	73.0
36	RAEB	RAEB-2	No metaphases	NM	$7q-$	20.0
37	RAEB	RAEB-2	No metaphases	NM	$7q-$	16.0
38	RAEB-t	RAEB-2	No metaphases	NM	$7q-$	50.5
39	RARS	ND	No metaphases	NM	-7	90.8
40	RARS	ND	No metaphases	NM	-7	8.0

Abbreviations: N20, 20 normal metaphases; N10-19, from 10 to 19 normal metaphases; N1-9, from 1 to 9 normal metaphases; AOUT7, abnormal karyotype without -7 , $7q-$ or add(7q); A7, abnormal karyotype with chromosome 7 affected but not -7 , $7q-$ or add(7q); NM, non-informative cases or no metaphases; RA, refractory anemia; RARS, RA with ringed sideroblasts; RCUD, refractory cytopenia with unilineage dysplasia; RCMD, refractory cytopenia with multilineage dysplasia; RAEB, refractory anemia with excess of blasts; RAEB-t, RAEB with excess of blasts in transformation; RAEB-1, RAEB type 1; RAEB-2, RAEB type 2; MDS 5q-, MDS associated with isolated del(5q); MDS-U, MDS unclassifiable; ND, not determined.

significant in all analyses was <0.05 . All analyses were performed using the statistical package SPSS version 17 (SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)).

Table 3

Univariate and multivariate analyses in the overall series.

	Univariate analysis HR (95% C.I.) <i>P</i> value	Multivariate analysis HR (95% C.I.) <i>P</i> value
FISH (positive)	2.62 (1.55–4.42) <0.001	1.82 (1.00–3.31) 0.049
Risk		
Good	1	1
Intermediate	1.80 (1.25–2.60) 0.002	1.89 (1.31–2.73) <0.001
Poor	3.19 (2.06–4.49) <0.001	3.20 (2.05–4.99) <0.001
Cytogenetics		
N20	1	1
N19-1	1.51 (1.06–2.15) 0.022	1.56 (1.08–2.26) 0.017
NM	1.80 (1.22–2.64) 0.003	1.91 (1.26–2.91) 0.002
Others	1.78 (1.29–2.45) <0.001	1.82 (1.30–2.56) 0.001

Abbreviations: N20, 20 normal metaphases; N19-1, from 19 to 1 normal metaphases; NM, non-informative cases or no metaphases; others, abnormal karyotype without -7 , $7q-$ or add(7q) and abnormal karyotype with chromosome 7 affected but not -7 , $7q-$ or add(7q). Risk: WHO morphologic risk stratification, low-risk (RCUD, RARS and MDS associated with isolated del(5q)), intermediate-risk (RCMD and RAEB-1) or high-risk (RAEB-2).

3. Results

Taking into consideration the test group (no evidence of -7 , $7q-$ or add(7q) by CC ($n = 773$)), alterations in chromosome 7, either -7 ($n = 8$) or $7q-$ ($n = 32$), were detected using FISH in 40 out of 773 patients (5.2%). Positive FISH results for either -7 or $7q-$ were obtained for patients within each of the different CC subgroups (Table 1). The proportion of positive cells ranged from 8.0% to 90.8%.

The diagnosis, CC findings, and FISH data are presented in Table 2 for patients in whom -7 or $7q-$ was only detected by FISH. Both FAB and WHO classifications were available for 35 patients; four patients had only a FAB classification and one patient had only a WHO classification. When considering only the FAB classifications [8], the majority of patients had a diagnosis of RAEB ($n = 19$, 47.5%). However, according to WHO classification [9], diagnoses of refractory cytopenia with multilineage dysplasia (RCMD; $n = 14$, 35%) and RAEB-2 ($n = 13$, 32.5%) were most common. It is important to point out that in the normal karyotype subgroups (N20, N10-19

Table 4
Univariate and multivariate analyses for patients with normal karyotype by CC.

	Univariate analysis HR (95% C.I.) P value	Multivariate analysis HR (95% C.I.) P value
FISH (positive)	3.24 (1.57–6.67) 0.001	3.38 (1.55–7.41) 0.002
Risk		
Good	1	1
Intermediate	1.60 (0.98–2.62) 0.061	1.54 (0.94–2.54) 0.088
Poor	2.62 (1.44–4.75) 0.002	2.61 (1.44–4.74) 0.002
Cytogenetics		
N20	1	1
N19–1	1.51 (1.06–2.14) 0.023	1.58 (1.09–2.28) 0.015

Abbreviations: N20, 20 normal metaphases; N10–19, from 10 to 19 normal metaphases. Risk: WHO morphologic risk stratification: low-risk (RCDU, RARS and MDS associated with isolated del(5q)), intermediate-risk (RCMD and RAEB-1) or high-risk (RAEB-2).

and N1–9) and AOUT7 subgroup, there were a total of five patients with non-clonal monosomy 7 or 7q deletion according to 2009 ISCN [10]. For a monosomy to be described as clonal, it must be found in at least 3 metaphases; for structural alteration it must be observed in a minimum of 2 metaphases [10].

Among patients with a normal cytogenetic result (N20, N10–19, N1–9), FISH identified -7 or 7q- in 17 cases (17/433, 3.9%). An inverse relation between the number of metaphases analyzed and the number of positive cases by FISH was observed (Table 1). In fact, the highest percentage of positive cases using FISH was in the N1–9 group. In this group, three positives results were obtained from 27 patients (3/27, 11.1%). A similar incidence was observed in the NM subgroup (12/139, 8.6%). In contrast, the lowest percentage was in the N20 subgroup (7/288, 2.4%). Applying the FISH technique to patients with a normal karyotype and non-clonal chromosome 7 events for -7 or 7q- enabled us to define whether these alterations were clonal aberrations.

According to the IPSS (1997) cytogenetic stratification [5] and based on CC results only, patients with positive result by FISH were classified as follows: 17 patients (42.5%) in the “good prognosis” category, five patient (12.5%) in the “intermediate prognosis” category and six patients (15%) in the “poor prognosis” category. Twelve patients could not be classified because there were no available cytogenetic data (cases with no metaphases, 30%). Based on the FISH analysis, 34 patients (85%) were reclassified into the “poor prognosis” category. The remaining patients were already classified as “poor prognosis”, due to their complex karyotype. When patients were classified using the new proposed cytogenetics classification [4], no patients were assigned a classification of “very good prognosis”, 19 patients (47.5%) had a “good prognosis” classification, four patients (10.0%) an “intermediate prognosis” classification, two patients (5.0%) a “poor prognosis” classification, and three patients a “very poor prognosis” (7.5%) classification (again, as for the IPSS 1997 classification, twelve patients could not be classified since there were no available cytogenetic data). This time, 35 patients (87.5%) were reclassified when the FISH analysis was used: 26 patients to the “intermediate prognosis” category, seven patients to the “poor prognosis” category and two patient to the “very poor prognosis” category.

To determine the relative contribution of positive FISH result to OS, we generated a multivariate Cox model incorporating FISH, CC and risk stratification according to WHO classification. Taking into consideration multivariate Cox proportional hazards regression model for the whole set patients (Table 3) and patients with a normal CC (Table 4) in univariate and multivariate analyses, FISH, CC and risk stratification are predictive factors in OS. FISH result has a significant effect to the OS, being higher in those patients with normal CC (HR 1.82, $P=0.049$ and HR 3.38 $P=0.002$, respectively). The rest of the variables, but intermediate classification in the

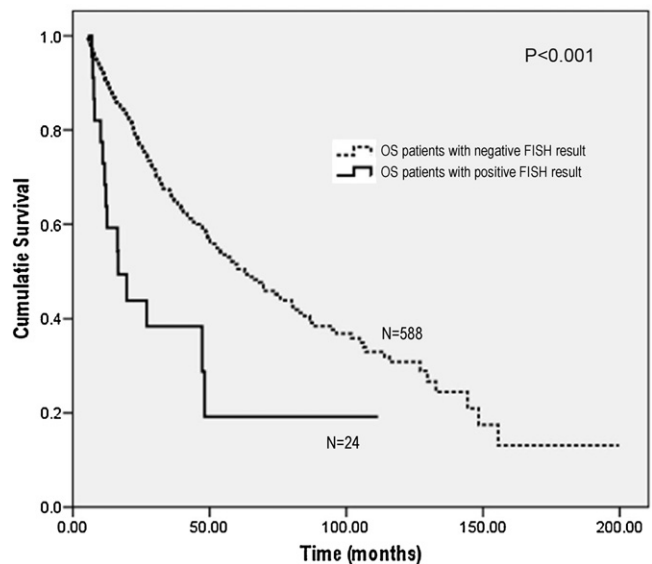


Fig. 1. Overall survival for all patients by FISH 7q result.

multivariate analysis with normal CC (HR 1.54 (0.94–2.54) 0.088, which is marginally significant), are significant.

To assess the OS in each subgroup of patients we applied log-rank test. OS was significantly shorter for patients in whom -7/7q- was detected by FISH compared with those for whom a negative FISH result was obtained (Mean OS: 38.7 months vs. 82.8 months, $P<0.001$) (Fig. 1). The OS was also significantly shorter among patients with a -7 alteration than among those with a 7q- alteration (Mean OS: 10.5 months vs. 45 months, $P=0.009$). However, only four patients with a -7 alteration (FISH result) and for whom survival data were available were identified.

Among patients with a normal karyotype by CC, mean OS was also significantly shorter for those in whom -7/7q- was detected by FISH (Mean OS: 38.7 months vs. 91.3 months, $P=0.001$) (Fig. 2). Differences between monosomy or deletion could not be tested because only one patient with normal karyotype had a -7 alteration detected by FISH. Only one patient with a low-risk WHO morphologic stratification had a positive FISH result for 7q-. Among patients with an intermediate-risk classification, OS was

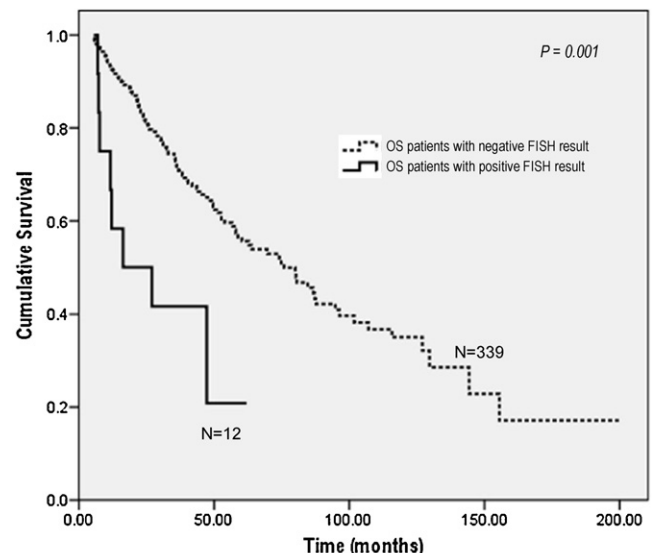


Fig. 2. Overall survival curve for patients with normal karyotype by FISH 7q result.

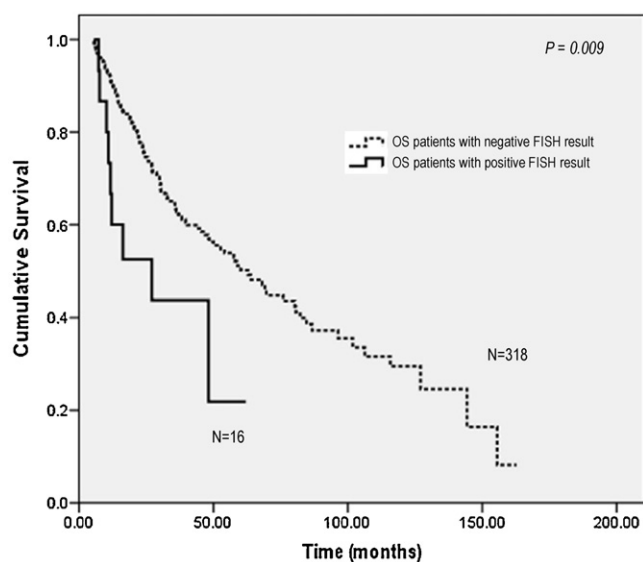


Fig. 3. Overall survival curve of patients with intermediate-risk classification according to the WHO morphologic risk stratification by FISH 7q result.

significantly shorter for those with a positive FISH result than for those with a negative FISH result (Mean OS: 31.7 months vs. 75.8 months, $P=0.009$) (Fig. 3). In this subgroup of intermediate-risk, FISH-positive patients, OS was significantly shorter for patients with a -7 compared with those having a 7q deletion (Mean OS: 9.9 months vs. 37.1 months, $P=0.006$). In patients with a high-risk classification, OS was not significantly different between patients in whom -7/7q- was not detected by FISH and those with a positive FISH result (Mean OS: 51.0 months vs. 46.6 months, $P=0.821$). This is because the majority of these patients had a complex karyotype and there were only four patients with a positive FISH result.

Focusing on the control group (evidence of -7, 7q- or add(7q) by CC (positive controls) ($n=47$)), a positive FISH result was obtained for all patients in the control group (47/47, 100.0%). There was an agreement between FISH and CC findings. We detected 20 cases with chromosome 7 monosomies and 26 with 7q deletion. It is important to note that there were positive results for both monosomy and deletion.

Among the control patients, 46 had both FAB [8] and WHO classifications [9]. Twenty-five patients (25/47, 53.2%) were diagnosed as RAEB according to the FAB classification, whereas using the WHO classification the most common diagnosis was RCMD (16/47, 34.0%) (Supplemental Table 1). This is similar to findings in the test group.

4. Discussion

Cytogenetic abnormalities are detected in around 50% of *de novo* MDS patients, and these provide important diagnostic and prognostic information [11]. Patients with alterations in chromosome 7, such as -7, 7q- or add(7q), have a poor cytogenetic risk, are usually classified by the 1997 IPSS cytogenetic stratification [5] into the intermediate-2 or high-risk group [12]. These patients are candidates for treatment with hypomethylating agents such as 5-azacitidine, which has demonstrated survival benefit in such cases [6,7].

In the current study, we assessed the impact of FISH 7q analysis in *de novo* MDS patients in whom CC had not detected -7, 7q- or add(7q). FISH is a very useful method for identifying specific chromosome abnormalities associated with MDS, not least because of its higher sensitivity compared with CC (the number of cells studied is higher than the 20 metaphases analyzed by CC). Additionally, the

FISH technique can be used to analyze non-dividing cells studying their interphase nuclei.

To the best of our knowledge, this is the largest study investigating application of the FISH technique in patients with *de novo* MDS with no CC evidence of -7, 7q- or add(7q). Some previous studies have reported high detection rates of chromosome 7 alterations, monosomies or deletions by FISH, but these have been shorter series (from 11 to 101 patients) [13–22] (Table 5). Our FISH analysis of 773 patients in whom CC had not detected chromosome 7 alterations gave 40 positive results (5.2%); eight patients with -7 and 32 patients with 7q- alterations. The higher incidence of 7q- compared with -7 is not in agreement with some previous studies [13–22]. This difference probably arises from the fact that some studies used a chromosome 7 centromeric probe rather than a specific probe for the long arm of chromosome 7 (7q). In addition, previous studies have analyzed smaller cohorts than the current study.

Our study is the first to stratify patients with normal karyotype according to the number of normal metaphases screened. FISH detected monosomies or deletions for chromosome 7 in 3.9% (17/433), of patients with normal karyotype (N20, N10–19 and N1–9). The fewer metaphases analyzed by CC, the greater the frequency of positive FISH results. Our study highlights and confirms the importance of analyzing 20 metaphases to determine whether a patient presents a normal karyotype. Additionally, FISH is a technique for verifying clonality. In the present study, all non-clonal aberrations detected by CC were confirmed by FISH.

Among the group of patients with no mitosis (NM), the incidence of positive FISH results (12/139, 8.6%) was similar to that observed in the N1–9 group (3/27, 11.1%). In a previous study conducted by our group using FISH for 5q, 20.4% of positive cases were found in patients with no metaphases [23], a higher incidence than in the current study with FISH 7q. This is an expected result since the incidence of 5q deletions is higher than that for chromosome 7 monosomies or deletions.

Classification according to the current cytogenetic IPSS (1997) [5] including the new data provided by FISH (identification of either monosomies or deletions 7q) resulted in all patients with positive FISH results being reclassified into the “poor prognosis” cytogenetic category. We assume that if we used the newly proposed cytogenetic score [4], these patients would have at least an “intermediate” cytogenetic category. However, since we only applied FISH to detect alterations in chromosome 7, either -7 or 7q-; we do not know whether additional chromosomes were also altered.

To the best of our knowledge this is also the first study to investigate the prognostic value of -7/7q- detection by FISH, by assessing the impact of -7 or 7q- on OS. Indeed, OS was significantly worse in those patients in whom -7/7q- alterations missed by CC were detected by FISH than in those patients without -7/7q- alterations.

Taking into consideration Cox proportional hazards regression model results, we performed Kaplan Meier and log-rank test studies to assesses the impact of -7/7q- alterations in each variable (CC and risk stratification). Thus the verification of negative CC results using FISH 7q could be beneficial in patients with a WHO “intermediate risk” stratification. Those patients with a positive FISH result could then be considered for treatment with hypomethylating agents or other more aggressive therapeutic options.

In summary, FISH analysis with a 7q31 probe detected chromosome 7 alterations in 5.2% patients for whom no evidence of -7, 7q- or add(7q) had been identified by CC. Such identifications are important since chromosome 7 alterations negatively impact prognosis and require more aggressive treatment. Although CC is the gold standard technique for the diagnosis of MDS, it has some limitations, which it appears can be overcome using FISH. Our findings suggest that it may be desirable to apply FISH of 7q in those patients with an intermediate WHO morphological risk stratification, for whom CC did not detect -7/7q-. Furthermore, we recommend that

Table 5
Studies analyzing the application of FISH 7q in patients with MDS.

Author	N	FISH -7/7q	N (%)	Analyzed region
Flactif et al. [13]	67	-7	5 (7.5%)	CEN 7 (D7Z1)
Arif et al. [14]	25	-7	9 (36%)	CEN 7 (D7Z1)
Wyandt et al. [15]	11	-7	4 (36.4%)	CEN 7 (D7Z1)
Rigolin et al. [16]	101	-7	1 (1%)	7q31(D7S486)
Ketterling et al. [17]	32	0	0 (0%)	7q31(D7S486)/CEN7 (D7Z1)
Romeo et al. [18]	40	-7	3 (7.5%)	CEN 7 (D7Z1)
Cherry et al. [19]	48	7q-	1 (2.1%)	7q31(D7S486)/CEN 7 (D7Z1)
Bernasconi et al. [20]	57	-7	2 (3.5%)	7q31(D7S486)/CEN 7 (D7Z1)
Yilmaz et al. [21]	26	7q-, -7	2 (7.6%), 1 (3.7%)	7q31(D7S486)/CEN 7 (D7Z1)
Codispoti and Depalma [22]	21	7q-	1 (4.8%)	7q31(D7S486)/CEN 7 (D7Z1)
Present series (2012)	750	7q-, -7	35 (4.7%), 8 (1.1%)	7q31(D7S486)/CEN 7 (D7Z1)

FISH of 7q be mandatory in those patients with non clonal -7/7q-CC results to verify clonality.

Conflict of interest statement

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organizations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgements

Funding. This work was supported (in part) by a grant from the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain (FI07/00107, CA08/00141, PI07/1009 and PI 11/02010); by the Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC, FEDER) (RD06/0020/0031, RD07/0020/2004 and RD12/0036/0044); by the SGR 541 (Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca, Departament d'Innovació, Universitat i Empresa), by the Projectos de Investigación del SACYL 355/A/09; Acción COST BM0801: European Genomics and Epigenomics Study on MDS and AML and MDS Celgene Spain. Editorial support for preparation of this manuscript was provided by Kate Unsworth of the Investigator Initiated Research Writing Group (part of the KnowledgePoint 360 Group), funded by Celgene Corporation, Global Scientific Communications, Summit, NJ. The authors directed development of the manuscript and were fully responsible for all content and editorial decisions for this manuscript. Statistical support for preparation of this manuscript was provided by Sergi Mojal of the Consulting service on methodology for biomedical research IMIM.

Contributions. VA performed FISH studies, collected and analyzed data and wrote the manuscript. AC and ED performed FISH studies. LA and CP collected clinical information on the subjects. MS and BE analyzed the conventional G-banding cytogenetics. JMH, MA, EL, ES, MM, JC, IM, MT, FG, TG, EL, CS, MLM, MFG, DC, BB, BB, FM, AB, IB, CML, VN, RC, DI, FC, IV, JM, ED, MTV, and JG provided cytogenetic, FISH and clinical data. CM performed conventional G-banding cytogenetics. FS designed the overall project and wrote the manuscript. All authors gave the final approval to the manuscript.

References

- [1] Haase D, Germing U, Schanz J, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Hildebrandt B, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* 2007;110(13):4385–95.
- [2] Sole F, Luno E, Sanzo C, Espinet B, Sanz GF, Cervera J, et al. Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2005;90(9):1168–78.
- [3] Bejar R, Levine R, Ebert BL. Unraveling the molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 2011;29(5):504–15.
- [4] Schanz J, Tüchler H, Solé F, Mallo M, Luño E, Cervera J, et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol* 2012;30(8):820–9.
- [5] Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997;89(6):2079–88.
- [6] Itzykson R, Thépot S, Eclache V, Quesnel B, Dreyfus F, Beyne-Rauzy O, et al. Prognostic significance of monosomal karyotype in higher risk myelodysplastic syndrome treated with azacitidine. *Leukemia* 2011;25(7):1207–9.
- [7] Itzykson R, Thépot S, Quesnel B, Dreyfus F, Beyne-Rauzy O, Turlure P, et al. Prognostic factors for response and overall survival in 282 patients with higher-risk myelodysplastic syndromes treated with azacitidine. *Blood* 2011;117(2):403–11.
- [8] Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1982;51(2):189–99.
- [9] Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, editors. WHO Classification of tumor of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC; 2008.
- [10] Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ, editors. ISCN (2009): an international system for human cytogenetic nomenclature. Basel: S. Karger; 2009.
- [11] Pozdnyakova O, Miron PM, Tang G, Walter O, Raza A, Woda B, et al. Cytogenetic abnormalities in a series of 1029 patients with primary myelodysplastic syndromes: a report from the US with a focus on some undefined single chromosomal abnormalities. *Cancer* 2008;113(12):3331–40.
- [12] Cordoba I, González-Porras JR, Nomdedeu B, Luño E, de Paz R, Such E, et al. Better prognosis for patients with del(7q) than for patients with monosomy 7 in myelodysplastic syndrome. *Cancer* 2012;118(1):127–33.
- [13] Flactif M, Lai JL, Preudhomme C, Fenaux P. Fluorescence in situ hybridization improves the detection of monosomy 7 in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 1994;8(6):1012–8.
- [14] Arif M, Tanaka K, Damodaran C, Asou H, Kyo T, Dohy H, et al. Hidden monosomy 7 in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome detected by interphase fluorescence in situ hybridization. *Leuk Res* 1996;20(9):709–16.
- [15] Wyandt HE, Chinnappan D, Ioannidou S, Wyandt HE, Chinnappan D, Ioannidou S, et al. Fluorescence in situ hybridization to assess aneuploidy for chromosomes 7 and 8 in hematologic disorders. *Cancer Genet Cytogenet* 1998;102(2):114–24.
- [16] Rigolin GM, Bigoni R, Milani R, Cavazzini F, Roberti MG, Bardi A, et al. Clinical importance of interphase cytogenetics detecting occult chromosome lesions in myelodysplastic syndromes with normal karyotype. *Leukemia* 2001;15(12):1841–7.
- [17] Ketterling RP, Wyatt WA, VanWier SA, Law M, Hodnefield JM, Hanson CA, et al. Primary myelodysplastic syndrome with normal cytogenetics: utility of 'FISH panel testing' and M-FISH. *Leuk Res* 2002;26(3):235–40.
- [18] Romeo M, Chauffaille Mdel, Silva MR, Bahia DM, Kerbaux J. Comparison of cytogenetics with FISH in 40 myelodysplastic syndrome patients. *Leuk Res* 2002;26(11):993–6.
- [19] Cherry AM, Brockman SR, Paternoster SF, Hicks GA, Neuberger D, Higgins RR, et al. Comparison of interphase FISH and metaphase cytogenetics to study myelodysplastic syndrome: an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) study. *Leuk Res* 2003;27(12):1085–90.
- [20] Bernasconi P, Cavigliano PM, Boni M, Calatroni S, Klersy C, Giardini I, et al. Is FISH a relevant prognostic tool in myelodysplastic syndromes with a normal chromosome pattern on conventional cytogenetics? A study on 57 patients. *Leukemia* 2003;17(11):2107–12.
- [21] Yilmaz Z, Sahin FI, Kizilkilic E, Karakas S, Boga C, Ozdogru H. Conventional and molecular cytogenetic findings of myelodysplastic syndrome patients. *Clin Exp Med* 2005;5(2):55–9.
- [22] Codispoti KE, Depalma L. Myelodysplastic syndrome in elderly patients: correlation of CBC with cytogenetic and FISH analysis. *Int J Lab Hematol* 2010;32(4):443–8.
- [23] Mallo M, Arenillas L, Espinet B, Salido M, Hernández JM, Lumbrales E, et al. Fluorescence in situ hybridization improves the detection of 5q31 deletion in myelodysplastic syndromes without cytogenetic evidence of 5q-. *Haematologica* 2008;93(7):1001–8.

4.3 ESTUDIO DE LA ARQUITECTURA MUTACIONAL DE LA DELECIÓN 5Q MEDIANTE TÉCNICAS DE MICROARRAY GENÓMICO (SNP ARRAY) Y NEXT-GENERATION SEQUENCING.

Alrededor de un 50% de los pacientes con SMD presentan alteraciones genéticas que además de tener un impacto clínico también definen una subcategoría morfológica de la WHO 2008 como es el SMD con delección aislada 5q. Las deleciones en el brazo largo del cromosoma 5 son muy heterogéneas y el límite de las CDR puede extenderse a una región más proximal o terminal, alteraciones que implican una menor longitud se han asociado a un mejor pronóstico que las que afectan a una zona más amplia del brazo q. La del(5q) se determina entre un 20%-30% de los SMD y puede detectarse aislada o en combinación con otras alteraciones. Los pacientes con delección 5q aislada o con una alteración adicional se asocian a un mejor pronóstico y los que presentan dependencia transfusional pueden ser tratados con lenalidomida, es un análogo de la talidomida con capacidad antiangiogénica e inmunomoduladora. En cambio la del(5q) en el contexto de un cariotipo complejo se asocia a peor pronóstico y a otros tratamientos, como agentes hipometilantes. Además de las alteraciones cromosómicas, las alteraciones moleculares que presenten estos pacientes pueden contribuir a la patogénesis de los SMD.

El objetivo del estudio consiste en determinar si el conocimiento de las alteraciones moleculares que afectan a los SMD y LMA con del(5q), tanto los localizados en el brazo q (brazo largo) del cromosoma 5, así como en otros cromosomas, pueden ayudar a clarificar los mecanismos patogénicos que hay detrás de esta enfermedad y explicar su heterogeneidad clínica.

Se han analizado un total de 241 muestras (228 pacientes) con neoplasias mieloides (SMD y LMA) y del(5q). El criterio de inclusión de los pacientes fue que presentaran la del(5q) mediante citogenética convencional (CC). Estos, se clasificaron en 4 grupos de estudio: SMD con del(5q) aislada (n=32) referente a la subcategoría de la WHO 2008, del-

eción 5q aislada (n=20), delección 5q con una alteración adicional (n=8) y 5q en el contexto de un cariotipo complejo (n=24). Diecisiete pacientes no presentaron la delección 5q mediante CC pero fueron incluidos en el estudio porque, eran muestras de seguimiento (n=4) que presentaron la del(5q) al diagnóstico, presentaban la alteración mediante FISH (n=2), presentaban la alteración mediante SNP-A (n=4) o mediante los estudios que permiten determinar el tamaño del clon con del(5q) (n=2) o por que no pudimos determinar si la del(5q) se encontraba en el contexto de un cariotipo complejo (n=5). Para determinar si existe un perfil molecular común en estos pacientes se aplicaron técnicas de *next-generation sequencing*, como whole-exome sequencing (WES, n=93) y secuenciación dirigida mediante paneles (TruSeq, n=128). La muestra tumoral utilizada en ambas técnicas provenía de la extracción de ADN de MO total o células CD34+ seleccionadas de MO o de la fracción granulocítica de SP. El estudio de WES se realizó con muestras apareadas tumoral – control, siendo la muestra control linfocitos T, CD3+ aislados de SP, con una pureza por citometría de flujo superior al 85%. En el análisis mediante TruSeq se seleccionaron 64 genes relacionados y frecuentemente mutados en pacientes con SMD. Estudios mediante SNP-A se llevaron a cabo en 79 pacientes para poder determinar mejor la longitud de la delección 5q. Un total de 14 pacientes se estudiaron en dos momentos diferentes de la enfermedad. Nueve pacientes al diagnóstico y durante el tratamiento y 3 pacientes al diagnóstico y en recaída o progresión y un paciente durante el tratamiento y la progresión.

Mediante un análisis bioinformático diseñado específicamente para estos pacientes un total de 3.525 variaciones nucleotídicas fueron descritas mediante WES. Debido a la alta heterogeneidad de mutaciones, decidimos agrupar los genes que presentaban mutaciones en un mínimo de 3 casos. Los genes *TP53* (n=25), *DNMT3A* (n=8), *CSNK1A1* (n=7), *PRPF8* (n=7), *SF3B1* (n=6) y *ASXL1* (n=5) fueron los que presentaron mayor número de casos mutados, así pues alteraciones en la familia de genes de metilación y de genes de factores de transcripción fueron los más mutados.

Las mutaciones en el gen *TP53*, son de especial interés ya que se relacionan con una peor respuesta al tratamiento con la lenalidomida. Desafortunadamente ninguno de nuestros pacientes tratado con lenalidomida presentaba mutaciones en *TP53*. La mayoría de mutaciones en este gen se localizaron en los casos con cariotipo complejo. En un sentido totalmente opuesto, *CSNK1A1*, se ha descrito como diana terapéutica en el tratamiento con lenalidomida. Dos de nuestros pacientes presentaron alteraciones en este gen y al ser tratados con lenalidomida presentaron una respuesta completa. No pudimos determinar genes que predispongan a una mejor o peor respuesta al tratamiento con lenalidomida.

Mediante el estudio de la muestra normal, pudimos determinar el desequilibrio alélico que se produce en el cromosoma 5 (por la pérdida en 5q) y así determinar el tamaño clonal de dicha alteración que combinada con la frecuencia alélica de cada gen nos permitió determinar si la del(5q) es un evento primario o secundario. En un 72% de los pacientes se mostró como evento primario seguido de una amplia variedad de genes que incluían *CSNK1A1* y *TP53*. En cambio, en un 28% de los casos, mutaciones en diversos genes, siendo el más popular el gen *TP53* (en 3 casos), fueron anteriores a la delección 5q. Aun así no se pudo establecer ninguna relación con la severidad de la enfermedad, el riesgo de progresión o respuesta o recaída en el tratamiento.

El estudio seriado de muestras nos permitió determinar que durante el tratamiento la media de mutaciones disminuye respecto a la media de mutaciones al diagnóstico y que durante la recaída o progresión el número de mutaciones aumenta. Las muestras seriadas también nos permitieron evaluar una posible relación entre determinados genes (*DNMT3A* y *ASXL1*) y su relación con la edad, en nuestro caso parecen más relacionadas con el SMD o LMA y no con la edad avanzada, aun así más estudios de muestras secuenciales permitirán resolver mejor la relación de ciertas mutaciones con edades avanzadas sin neoplasias hematológicas.

En conclusión, la aplicación de nuevas técnicas moleculares permite definir mejor a los pacientes, aun así parece ser que la elevada het-

erogeneidad que presentan los SMD y la del(5q) se mantiene a nivel molecular. Estudios en un número más alto de pacientes quizás permitan incluir toda esta heterogeneidad o estudios funcionales que se centren en los genes retenidos en el cromosoma 5 no delecionado podrán ayudar a determinar un posible perfil molecular.

Los resultados de este trabajo todavía no han sido publicados, pero se adjuntan a continuación para su futura publicación.

The mutational architecture of del(5q)

Vera Ademà¹, Laura Palomo¹, Przychodzen P Bartłomiej², Mar Mallo¹ Diez-Campelo Maria³, Naoko Hosono⁴, Blanca Xicoy⁵, Elisa Luño⁶, Bhumika J. Patel², Cassandra M Hirsch², Lurdes Zamora⁵, Thomas La Framboise⁷, Leonor Arenillas⁸, Albert Perez-Ladaga⁹, Carme Pedro¹⁰, Michael Clemente², Joan Bargay¹¹, Julia Montoro¹², Juan Carlos Caballero³, Brayan Merchan¹², Victor Noriega¹³, Victor MarcosBetes¹⁴, Consuelo Del Cañizo¹⁵, Rosario Lopez¹⁶, José María Raya¹⁷, Joaquin Sanchez-Garcia¹⁸, Eduardo Rios¹⁹, Montserrat Arnan²⁰, Lourdes Florensa⁸, Raquel de Paz²¹, Angelina Lemes²², Paula Gomez-Marzo¹, Nuri Haro¹, Francisco Fuster-Tormo¹, Monica Bayes²³, Ivo Gut²³, Rafael Bejar⁹, Mikkael A. Sekeres²⁴, Jaroslaw P. Maciejewski² and Francesc Sole¹

¹MDS Research Group, Institut de Recerca Contra la Leucèmia Josep Carreras, ICOHospital Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Spain; ²Department of Translational hematology and Oncology Research, Taussing Cancer Institute, Cleveland Clinic, Cleveland, OH; ³Servicio de Hematología, Centro de Investigación del Cáncer, IBSAL (Instituto de Biomedicina de Salamanca) y BMCC, Universidad de Salamanca, Salamanca, Salamanca, Spain; ⁴Department of Hematology and Oncology, University of Fukui, Fukui, Japan; ⁵Hematology Service, ICOHospital Germans Trias i Pujol, Institut de Recerca Contra la Leucèmia Josep Carreras, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Spain; ⁶Hospital Universitario Central Asturias, Oviedo, Spain; ⁷Electrical Engineering and Computer Science, Case Western Reserve University, Cleveland, OH; ⁸Hematological Cytology Laboratory, Hospital del Mar, GRENTHE, IMIM (Hospital del Mar Research Institute), Barcelona, Spain; ⁹UCSD Moores Cancer Center, La Jolla, CA; ¹⁰Servei d'Hematologia Clínica, Hospital del Mar, GRETNHE, IMIM, Barcelona, Barcelona, Spain; ¹¹Department of Hematology. Hospital Son Llatzer, Palma de Mallorca, Spain; ¹²Servei de Hematologia. Hospital Vall d'Hebrón, Barcelona, Spain; ¹³Servicio de Hematología, Complejo hospitalario universitario A Coruña Sergas, A Coruna, Spain; ¹⁴H Arnau de Vilanova de Lleida, Lleida, Spain; ¹⁵Servicio de Hematología, Centro de Investigación del Cáncer, IBSAL (Instituto de Biomedicina de Salamanca) y BMCC, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain; ¹⁶Hospital Althaia, Manresa, Spain; ¹⁷Hospital Universitario de Canarias, Tenerife, Spain; ¹⁸Servicio de Hematología. Hospital Reina Sofía, Cordoba, Spain; ¹⁹Haematology Service, Hospital Universitario Virgen de Valme, Sevilla, Spain; ²⁰Servei de Hematologia Clínica. ICO, Hospital Duran i Reynals, Barcelona, Spain; ²¹Servicio de Hematología. Hospital La Paz, Madrid, Spain; ²²Hospital Dr. Negrín, Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas, Spain; ²³Centro Nacional de Análisis Genómico, Parc Científic de Barcelona, Barcelona, Spain; ²⁴Leukemia Program, Cleveland Clinic, Cleveland, OH

INTRODUCTION:

Myelodysplastic syndromes (MDS) are clonal hematopoietic stem or progenitor cell disorders (Tefferi and Vardiman, 2009), characterized by bone marrow dysplasia that led an ineffective hematopoiesis and increased apoptosis (Raza et al., 1995) resulting in peripheral blood cytopenias. Patients with MDS show a variable risk of progression to acute myeloid leukemia (AML) due to increasing failure of cellular differentiation (Tefferi and Vardiman, 2009). Acquired cytogenetic aberrations are present in approximately 50% of *de novo* MDS. It is well established that karyotype is an independent prognostic factor in MDS (Garcia-Manero, 2015; Schanz et al., 2012). Cytogenetics abnormalities, cytopenias and blast count are used for the Revised International Prognosis Scoring System (IPSS-R) to estimate the prognosis of MDS patients, being the karyotype the strongest parameter with prognostic value (Greenberg et al., 2012). One of the most recurrent cytogenetics alteration, with an incidence around 10-15% of *de novo* MDS is the deletion in the long arm of chromosome 5 [del(5q)], representing the first cytogenetic abnormality that defines a MDS subtype (MDS with isolated del(5q)) (Jaffe et al., 2001; Swerdlow et al., 2008). Although 5q deletions are highly heterogeneous two distinct commonly deleted regions (CDRs) have been identified (Boulton et al., 2002; Ebert, 2011). The most centromeric common deleted region (CDR) in 5q31.2-5q31.3 (CDR-1: MDS/AML) is associated with higher risk MDS and MDS with AML phenotype. The most distal one spans 1.5Mb on 5q32-q33.2 (CDR-2: 5q- Syndrome) and is associated with better prognosis and with 5q- Syndrome (Boulton et al., 1994). The "5q- Syndrome" is a morphologic entity with good prognosis and low risk of AML progression. In addition, it is characterized by severe macrocytic anemia, hypolobulated megakaryocytes and normal or increased platelets counts (Van den Berghe et al., 1974) and sensitivity to lenalidomide (LEN) (List et al., 2006). However the prognosis is less favorable if a mutation in *TP53* co-occurs in patients with del(5q) MDS (Jädersten et al., 2011; Mallo et al., 2013). When these patients, with *TP53* mutation, underwent in lenalidomide's treatment a worse hematological and cytogenetic response is achieved.

Over the past decade, several studies have been published describing the application of new high-throughput technologies. SNP-array (SNP-A) analysis helped to identify chromosomal microdeletions and areas of copy number-neutral loss of heterozygosity (CNN-LOH) (Makishima and Maciejewski, 2011). The application of next-generation sequencing (NGS) led to the identification in the study of several MDS recurrently mutated genes that substantially contributes to the pathogenesis of MDS (Bejar et al., 2011). However when previous studies were focus on del(5q) MDS no recurrent mutated genes mapping to the CDR were identified. Instead, it was discovered that haploinsufficiency of several genes located in this region were capable of generating the clinical phenotype seen in those patients. *RPS14* haploinsufficiency has been shown as a cause of severe dyserythropoiesis and to increase levels of p53 in erythroblasts and promote their cell cycle arrest and apoptosis. Recently, it has shown that *CSNK1A1* plays a central role in the pathogenesis of MDS and del(5q). *CSNK1A1* has been described as a tumor suppressor gene in colon cancer and AML through regulation of β -catenin (which is a major driver of stem cell self-renewal) (Schneider et al., 2014). First studies of NGS in patients with MDS and 5q- were reported in smaller series of patients, three patients during treatment and follow up in Pellagatti et al., and four patients in Schneider et al. (Pellagatti et al., 2014; Schneider et al., 2014). Herein we present the

largest series of MDS and AML del(5q)- patients studied by whole exome sequencing (n=93) and targeted re-sequencing (n=128). We hypothesized that mutations in the retained q arm as well as those on other chromosome may clarify the pathogenic mechanisms behind this lesion and explain the clinical heterogeneity.

PATIENTS AND METHODS

Patients:

We studied a total of 241 samples (228 patients) with myeloid neoplasms, 182 MDS, 28 sAML (secondary AML) and 31 pAML (primary AML). Inclusion criteria was the detection of del(5q) by conventional cytogenetics (CC). Seventeen samples do not have del(5q) by CC, but were included because, five samples had the del(5q) but we could not assess if it was or not in the context of a complex karyotype, four samples had the del(5q) by SNP-A but not by CC, two samples del(5q) was only detected by FISH, two samples del(5q) was detected by clonal size assessment and four samples were follow up samples (during treatment or progression) with a diagnostic sample included in the study with del(5q). Cytogenetics analysis were performed according to standard procedures on bone marrow cells culture and karyotypes were described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature 2013 (Shaffer et al., 2013). Diagnosis was based according to WHO 2008 (Swerdlow et al., 2008), and patients were classified according to the morphologic risk stratification: low-risk: refractory anemia with ring sideroblasts (RARS), refractory cytopenia with unilineage dysplasia (RCDU), refractory cytopenia with multilineage dysplasia (RCMD), MDS associated with isolated del(5q), and unclassifiable MDS (MDS-U) and advanced disease: refractory anemia with an excess of blasts-1 (RAEB-1), RAEB-2 and secondary and primary AML (sAML and pAML). These studies were approved by the local ethics committees and all the procedures followed the revised Helsinki Declaration. All samples were obtained with signature of informed consent of the subjects. A total of 93 samples were studied by whole-exome sequencing (WES) and 128 were studied by targeted sequencing (panel of 64 genes). All patients' characteristics are summarized in Table 1.

DNA Extraction

Sample collection and cell separation were performed in each center. Genomic DNA from tumor sample was obtained from whole bone marrow (BM) aspirate and from isolated CD34+ bone marrow cells when available, or from granulocytes fraction from peripheral blood. DNA from normal/control sample was obtained from T-lymphocytes isolated [magnetic-activated cell sorting (MACS), Miltenyi Biotec GmbH, Germany] from peripheral blood.

Single Nucleotide Polymorphism array (SNP-A)

Single nucleotide polymorphism array (SNP-A) was performed in 79 patients (50MDS, 10 sAML and 19 pAML), from DNA obtained from tumor cells and from the paired normal cells. DNA samples from 14 patients were hybridized in 250K Nsp Array, 44 patients with Genome-Wide Human SNP Array 6.0 and 21 patients with

CytoScan® HD Array, all from Affymetrix®. In all cases protocols and quality control (QC) guidelines supplied by the manufacturer were followed.

Whole-exome sequencing (WES)

The Whole-exome sequencing data were generated by HiSeq 2000 (Illumina) instrument from 93 samples (66 MDS, 12 sAML and 16 pAML). At least a minimum of 30x was determined in the 90% of the analyzed sample. WES was performed in paired samples, of DNA from tumor sample (bone marrow either total or isolated CD34+) with matched normal sample (isolated T-lymphocytes, CD3+, from peripheral blood). Sure Select Human Exome Kit version 3 (Agilent Technologies) was used for the whole-exome hybrid capture, with an initial input of DNA of 3ug. Captured libraries were sequenced with 100 base-paired (bp) paired-end reads on an Illumina HiSeq 2000 platform. And in house bioinformatics pipeline was used to analyze all raw data (Supplementary Methods)

Clonal size:

WES data from normal sample allowed us to assess the clonal size of del(5q) in 67 patients in a total of 78 samples (68 MDS, 8 sAML and 2 pAML), we calculated in the germ line samples, the allelic imbalance for informative heterozygous SNPs within the deletion region. The average deviation from the 50/50 ideal distribution in the tumor samples enables us to accurately determine the proportion of cells affected for the deletion.

Targeted re-sequencing

A TruSeq custom amplicon panel was designed in order to study 64 (Table 2) commonly mutated genes in myeloid malignancies. This panel was used in 128 samples on MiSeq (Illumina, Chesterford, UK) using custom amplicon based panel designed against the human NCBI37/hg19 reference genome to build DNA libraries. The panel focuses on 160Kb approximately consisting in 570 amplicons of 250bp length. Read alignment and variant calling were performed using an in-house pipeline method.

Lenalidomide's treatment

Only patients who received lenalidomide after the diagnosis and at least two cycles were included for the statistical analyses. Response was evaluated according to the International Working Group response criteria for MDS (Cheson et al., 2006). For the statistical analyses patients were divided into responders (complete response and partial response) and non-responders (stable disease, failure or progression).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed in the overall series of samples and on each study group. The overall survival (OS) was defined from simple acquisition to death or last follow up. All deaths, whether or not related to MDS, were considered as the endpoint of the follow-up interval. Kaplan-Meier test was used to estimate the OS. Statistical comparisons between different actuarial curves were based on log-rank tests. R software package (version 2.15.2) was used to perform competing risk analysis for AML evolution, in the presence of

death before transformation, considering time between sample acquisition to AML evolution or last follow-up respectively. Data is expressed as cumulative incidence and 95% CI. Multivariate analysis was performed in TruSeq results in order to include all patients' information. For categorical variables the statistics used for the comparison was Chi-square or Fisher's exact test. All P-values reported are two-sided. The selected P-value to considering differences statistically significant in all analyses was <0.05 . All analyses were performed using the statistical package SPSS version 17 (SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)).

RESULTS

Conventional Cytogenetics

A total of 241 sample underwent in to conventional cytogenetics (CC) analysis and were grouped into 4 categories according to del(5q): MDS with isolated del(5q) (n=47) (WHO 2008), isolated 5q- (n=38), 5q- plus 1 alteration (n=23) and del(5q) in a complex karyotype (n=116). Seventeen patients could not be classified into one of these subgroups, five samples had the del(5q) but we couldn't assess if it was or not in the context of a complex karyotype, four samples had the del(5q) by SNP-A but not by CC, two samples del(5q) was only detected by FISH, two samples del(5q) was detected by clonal size assessment and four samples were follow up samples (during treatment or progression) with a diagnostic sample included in the study with del(5q). For OS, 152 had information during the follow up, 99 samples were collected at diagnosis, 35 during treatment and 18 at disease progression.

A miscellaneous of cytogenetics alterations were found in group del(5q) and one additional alteration, including single cases of trisomy 8, monosomy 7, trisomy 21, monosomy Y, among others. Focusing on patients with complex karyotype the most common alteration above del(5q) were alterations affecting chromosome 7 [41 cases with -7, and 24 cases with del(7q)] and alterations in 17p (11 cases with 17p- and 21 cases with -17).

SNP-Arrays

SNP-Arrays (SNP-A) were performed in 79 paired samples (tumor and normal sample from the same patient). Focusing on chromosome 5 the median deletion size of each group was: 67.2Mb for patients with isolated 5q- (whether or not MDS with isolated del(5q)), 70.3Mb in cases isolated 5q- + 1 additional alteration patients and 92.6Mb with del(5q) in complex karyotype patients. There was a difference statistically significant ($P<0.001$) between deletion size and group and bigger deletions were included in complex karyotypes. However there were not statistically significant differences regarding OS and deletion size ($P=0.958$). SNP-A helped to redefine the length of 5q deleted segment. Whereas the most common start position by CC was 5q13 it changed after SNP-A to 5q14 for MDS with isolated del(5q), 5q- isolated and 5q-+1 alteration and for complex karyotype changed in some patients to 5q14 and in others to 5q11. End position by both (CC and SNP-A) techniques was 5q33 in MDS with isolated del(5q), 5q- isolated and 5q-+1 alteration while for complex karyotype, the same number of cases presented the 5q33 and 5q35 breakpoint. We could also estimate the CDR for patients with isolated 5q- (whether or not they were a 5q- syndrome) which extended from 5q31.1 to 5q32 (134274271-

145457351; 11.2Mb) and for 5q- in a complex karyotype the CDR was from 5q23 to 5q31.3 (129201868-140211102; 11Mb), CDR was not calculated for patients with 5q- + 1 additional alteration due to the low number of patients in this group (n=3). Regarding the number of alterations, in patients with isolated 5q- (whether or not 5q- syndrome, n=37) 25 of them confirmed the isolation of 5q- by SNP-A, six patients had between 2 and 3 additional alterations, two patients had 6 and 9 alterations and four patients had more than 10 alterations, these patients had a low number of metaphases and one of them had an add(5q). Regarding complex karyotype, SNP-A helped to elucidate the complexity of the karyotype. A total of 11 patients with complex karyotype did not show the del(5q), but they were included in the study because six cases had a monosomy 5 and six patients had an add(5q). None of these patients showed a complete loss of 5q, instead of that SNP-A showed an interstitial deletion of 5q in all cases.

When we focused on the CDR 1 and CDR 2, they were both deleted in all cases. However CRR1 and CRR2 were only affected in three and four patients respectively in the isolated 5q- and +1 additional alteration group, while in patients with complex karyotype CRR1 was affected in 46.4 % and CRR2 was affected in 50% of patients. We could assess the OS in 28 out of 39 patients with complex karyotype and SNP-A results. There were significant difference of distribution of both CRR1 and CRR2 along the study groups ($P<0.001$ and $P<0.001$, significance of differences in group distribution in CRR1 and CRR2, respectively) being the complex karyotypes the ones who less retained these regions. However the OS was not statistically significant in cases that retained or not CRR regions.

Whole-exome sequencing (WES)

A total of 93 samples were studied by WES. Samples were classified according to the CC result, related to del(5q): MDS with isolated 5q- account for 32 samples, 20 were 5q- isolated, 8 were 5q- + 1 alteration and 24 were complex karyotype involving 5q-, and nine samples could not be classified in our study group, because, four samples were during the follow up and the 5q- was not determined by CC, and three patients 5q- was identified by SNP-A and two samples by clonal size assessment. After the bioinformatics analyses we identified a total of 3525 non-synonymous variants. Due to the high heterogeneity of all variants, we clustered patients according to the mutations detected in ≥ 3 patients (Figure 1). The most mutated genes were: *TP53* (n=25), *DNMT3A* (n=8), *CSNK1A1* (n=7), *PRPF8* (n=7), *SF3B1* (n=6), *ASXL1* (n=5). Clinical and outcome parameters according to the mutational status of the selected genes are listed in Table 3. Of note, *TP53* had a significant difference according to the study group, however this is due to the high number of *TP53* mutations in del(5q) in a complex karyotype. *TP53* also had significant statistically different between clinical parameters, such as, platelets ($P=0.002$), leucocytes ($P=0.018$), ANC (absolute neutrophil count) ($P=0.003$) and BM blasts ($P=0.012$), this is because 10 out of 18 mutations are located in patients with primary AML, which is related to a more aggressive disease. Regarding *DNMT3A* there was a statistically significant difference ($P=0.034$) in BM blast percentage between mutated and non-mutated. According to *ASXL1*, the median age of mutated and non-mutated genes showed a tendency ($P=0.07$), being older patients the ones who hold mutations in *ASXL1*.

Finally, *CSNK1A1* had showed a tendency ($P=0.074$) but not significant difference in the study group between mutated and non-mutated cases.

Clonal Size of del(5q)

Assessment of del(5q) clone size was done in 72 patients by allelic imbalance combined with clonal burden by variant allelic frequency (VAF) allowed us to reconstruct the clonal hierarchy: in 72% of cases, del(5q) appeared to be the initial defect followed by a miscellaneous group of mutations including in two cases *CSNK1A1* and in two other cases *TP53*. In contrast, in 28% of cases, a miscellaneous of genes were mutated, being *TP53* the most observed ($n=3$), followed by a subclonal del(5q) abnormality (Table 3).

Targeted re-sequencing

A 64 gene panel, from well-known genes related to MDS was tested in 128 patients. According to the study group 15 belong to MDS with isolated del(5q), 18 to the isolated del(5q), 15 in 5q- + 1 alteration and 80 to del(5q) in a complex karyotype. According to WHO 2008, 11 cases were included in RCUD, two cases in RARS, 18 cases in RCMD, 15 cases in MDS with isolated del(5q), 23 cases in RAEB-1, 25 cases in RAEB-2, two cases in MDS-U, 15 cases in sAML and 11 cases in pAML.

The median of mutations in MDS with isolated del(5q) was 0 (range: 0-2), in the isolated 5q and 5q- + 1 alteration was 1 (range: 0-5) and in 5q- in a complex karyotype 2 (range: 0-7). In order to test the effect of number of mutations on the OS we categorized the mutations in three groups no mutations, 1 mutation and ≥ 2 mutations (Table 4).

In order to assess the effect of mutations and clinical parameters we added to TruSeq information the mutation information for the 93 WES mutations (the ones related to the 64 gene panel). Then we selected the top genes founded by WES and we assessed the clinical parameters. Considering the significant variables, *TP53* had a significant statistically difference between mutated and non-mutated cases regarding platelets number ($P<0.001$) and bone marrow blasts percentage ($P<0.001$). *TP53* had also a significant impact on the OS when mutations are present in this gene. *DNMT3A* also had a significant impact on the OS, being lower in patients with mutations in that gene. No other statistical significant differences were found in the other genes.

Serial samples

A total of 14 patients were assessed in two different points of their disease. Nine samples were studied at diagnosis and during lenalidomide's treatment, three patients at diagnosis and during progression of their disease and one patient during treatment and progression, samples characteristics are detailed in Table 6.

The average of mutations of samples at diagnosis was 22 per patient and during the lenalidomide's treatment the average of mutations was 21, however if we consider separately responder patients vs. non-responders the average was 9 vs. 39 respectively. Patients at diagnosis and progression had an average of mutations of 6 vs. 32, respectively.

Lenalidomide treatment

A total of 38 patients received lenalidomide at diagnosis, among them 27 patients had isolated 5q, five patients with 5q- + 1 additional alteration and six patients with complex karyotype. Three patients belonging to the complex karyotype group had a monosomy 7, but the other patients of this group and also the ones in 5q- +1 additional alteration had a variety of alterations. The rate of response was 60.5% (23 responders vs. 14 non-responders). Complex karyotype was present in four non-responder patients. When we assessed *TP53* mutational status, only one patient had *TP53* mutation so we could not assess if it precludes responsiveness. We tested the effect on OS for the most common mutated genes in our series and we could not find a difference statistically significant between responders and non-responders.

Overall Survival

Overall survival (OS) was assessed in 152 samples with available follow up information. Male and female ratio was 59:93, and the OS was significantly shorter in men than in female (median OS: 7.3 (11.2-26.0) vs. 32.0 (35.3-56.2), $P < 0.001$; months respectively). Patients with isolated 5q- had a better OS than patients with del(5q) +1 additional alteration and patients with del(5q) in a complex karyotypes (57.7 (33.6-81.8) vs. 23.2 (7.3-38.9) vs. 6.1 (4.3-7.9); months respectively). Differences were significantly ($P < 0.001$) when comparing complex karyotype with the other categories, but it only showed a tendency between all 5q- isolated and 5q- +1 alteration ($P < 0.178$). We classified patients according to the risk, with a separate category for MDS with isolated del(5q), this one had the best median OS 80.9 months (57.6-104.2) in comparison to low risk 28.3 (13.1-43.5) and 6.8 (4.6-9.0) in high risk, with a significance difference of $P < 0.001$.

Multivariate analyses were carried out using data from WES and TruSeq, regarding the low number of variables that were significant in the univariate analyses [study group, risk category, platelets, percentage of BM blasts, top six genes mutated (*TP53*, *DNMT3A*, *CSNK1A1*, *PRPF8*, *SF3B1*, *ASXL1*)]. The reference category was MDS with isolated del(5q), and the variable that retained an statistically significant difference was del(5q) in a complex karyotype HR (95%CI): 5 (2.3, 10.9), $P < 0.001$. Regarding risk category (with low risk category as the reference) high risk patients had HR (95%CI): 2.3 (1.2, 4.2), $P = 0.008$ and *DNMT3A* (being non-mutated the reference category) HR (95%CI): 1.9 (1.002, 3.4), $P = 0.049$.

DISCUSSION

Herein we present the largest series of del(5q) MDS and AML patients studied by next-generation techniques, whole exome sequencing and re-targeting sequencing. Initially we grouped our patients into four groups: MDS with isolated del(5q), MDS or AML with isolated del(5q), MDS or AML with del(5q) +1 alteration and MDS or AML with del(5q) in a complex karyotype. The median OS between patients with MDS with isolated del(5q) and isolated del(5q) was not statistically different so we decided to group them for the OS analyses. This group of patients had a median OS higher than patients with complex karyotype and differences were statistically significant ($P<0,001$). This significance was also seen in the multivariate analyses where complex karyotype retained its independent influence on the OS. This is in agreement with previous studies that correlates the complexity of alterations with worse outcome (Haase et al., 2007; Malcovati et al., 2007; Schanz et al., 2012). Moreover, when we compared isolated del(5q) and del(5q) +1 additional alteration there was a tendency ($P<0.178$) of a significant difference in the OS. However, according to the IPSS-R cytogenetics classification patients with del(5q) either isolated or with another alteration are grouped in Good prognosis group according to their similar OS (Greenberg et al., 2012; Schanz et al., 2012).

In order to study deeply additional alterations, we studied by SNP-A a total of 79 patients. This allowed us to detect additional alterations in isolated del(5q) and +1 alterations and better define cases with complex karyotype. Additional alterations were detected in 12 out of 37 patients (32.4%). OS could not be assessed due to the low number of patients and lack of follow-up information. CC analyses of these patients did not reach the minimum of 20 metaphases analyzed, pointing out a low rate of dysplastic cell division clone/s. Besides, in patients with complex karyotype, SNP-A were useful to redefine complex alterations or to identify marker chromosomes as well as to confirm that monosomy 5 masks rearrangements involving a deletion of 5q.

Mutational studies are an increasing field of research that can lead us to understand molecular defects involvement in patients with del(5q). The application of WES in 93 samples allowed us to define top 6 mutated genes: *TP53*, *DNMT3A*, *CSNK1A1*, *PRPF8*, *SF3B1* and *ASXL1*, all of them previously described in MDS and AML. Low frequency (<5%) of mutations led us to enlarge the series by studying 128 patients by re-targeting sequencing (TruSeq) and to assess their impact on OS.

The top mutated gene in our series was *TP53* (n=63; 93.7%), it was mainly mutated in patients with complex karyotype confirming the observation made by other groups. *TP53* have been related with no response to lenalidomide treatment (Jädersten et al., 2011). Unfortunately, we were not able to assess its impact due to the absence of follow-up in mutated and treated cases. Regarding OS, *TP53* and *DNMT3A* mutated cases showed statistically significant differences in the univariate analyses.

Regarding *DNMT3A* was pronominally mutated in complex karyotype group, this is in agreement with previous studies which correlate mutations in that gene with high risk and AML patients (Yang et al., 2015).

However, we also detected that mutations in seven patients with isolated del(5q) and in 4 patients with del(5q)+1 alteration. By univariate and multivariate analysis DNMT3A mutations retained the prognostic impact in OS. Recently this gene has been described, with *ASXL1* and *TET2*, as the most mutated genes in patients with clonal hematopoiesis and no hematological disease.(Jaiswal et al., 2014) In our WES analyses, one patient, who was studied at two different points (MDS stage and AML progression), was mutated in *DNMT3A*. According to Jaiswal et al. study (Jaiswal et al., 2014) this mutation could be related to age but it has been also related to AML either *de novo* or secondary (Yang et al., 2015). Also it retained its significance on the OS at the multivariate analysis (HR (95%CI): 1.9 (1.02, 3.5), $P=0.042$). Further studies are needed in order to elucidate if patients with primary or secondary AML has this tumor suppressor gene mutated previously of the hematological disease. In addition, two patients with *ASXL1* mutations were studied in two different points, and although there was a difference statistically significance on age (median mutated vs. median non-mutated), this mutation could not be detected at diagnosis sample, so we could assume that these mutations are related to the MDS disease. Regarding *TET2*, although it was not one of the most mutated genes in MDS patients was not significantly related to age and it was not the most predominant mutation in 5q- patients.

Focusing on patients with MDS with isolated del(5q), they showed the best OS, confirming the generally association with a better outcome. Those patients had a median of 1 gene mutated (CI 95%: 0-12), and the most common one was *CSNK1A1* (n=6/47). No mutations of that gene were described in the complex karyotype group, however it was also detected in one patient with del(5q) +1 additional alteration). Recently, this mutation has been related as a targeted gene for lenalidomide treatment and subsequently with a better response (Krönke et al., 2015; Schneider et al., 2014). This has been observed in two of our patients with *CSNK1A1* mutation, both treated with lenalidomide and achieved a complete response. We can assume that in both cases del(5q) could be the primary event, as it was present in 77% and 52% and the variant allelic frequency of *CSNK1A1* was 68% and 42% respectively. We can think that mutation in *CSNK1A1* was present in almost all cells with del(5q).

MDS patients with del(5q) are treated by lenalidomide have a worse response if they present mutations in TP53 (Jädersten et al., 2011). Nevertheless, none of our patients treated with lenalidomide harbor mutations in that gene.

Regarding our results there is not yet a mutational profile that could suggest a better or worse response. Focusing on patients with del(5q) isolated, four out of six had mutated *SF3B1*, mutations in that gene have been related to a better outcome (Papaemmanuil et al., 2011). In two cases this mutation, had a higher variant allelic frequency than del(5q), and was the most predominant mutation. This could be in agreement with Cazzola et al., that splicing mutations could be the ones that first arise in MDS disease. *PRPF8* as *SF3B1* gene has been described as a splicing mutation and related to ring sideroblasts. Splicing mutation had been described as a first event mutation that could lead a proliferative advantage for the cell, however, in our cases not all the mutations in these genes were the predominant ones (Cazzola et al., 2013).

Serial samples collected before and after therapy demonstrated that responses are associated with decreased clonal burden for del(5q) but there are a persistence of certain mutations. In contrast, in refractory cases subclonal lesions persisted and new appeared, an event associated with progression. For instance, patients with *CSNK1A1*, *TP53* or *DNMT3A* progressed and acquired additional variety of lesions but did not see disappearance of *CSNK1A1*, *TP53* or *DNMT3A*.

The mutational profile for patients with del(5q) could not be elucidated yet due to the high heterogeneity, although we analyzed a larger series of cases. However, *CSNK1A1*, *TP53* or *DNMT3A* are important genes involved in the disease. Initial studies of mutational status could help to define patients with a better outcome when *CSNK1A1* is present (they are clear candidates for lenalidomide treatment). In contrast, patients with *TP53* mutations should be closely followed for its well-known negative impact on OS and lenalidomide response. Moreover, it is noteworthy the high negative impact of *DNMT3A* mutations in our series. Further studies are needed to clarify its impact on del(5q) patients.

ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support. This work was supported in part by a grant from the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competividad, Spain (PI 11/02010 and PI/14/00013); by the Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC, FEDER) (RD12/0036/0044); Sociedad Española Hematología y Hemoterapia; 2014 SGR225 (GRE) Generalitat de Catalunya, by José Carreras Leukämie-Stiftung, Ref. AR 14/34; economical support from Fundació Internacional Josep Carreras and from Celgene Spain. The research leading to this invention has received funding from "la Caixa" Foundation.

Table 1: Whole cohort characteristics

	<i>MDS with isolated del(5q)</i>	<i>Isolated del(5q)</i>	<i>del(5q) +1 alteration</i>	<i>del(5q) in complex karyotype</i>	<i>P value</i>
MDS, n (%)					
Primary	44	32	14	42	<i>< 0.001</i>
Secondary	1	3	4	24	
Age, years	74 (50-94)	68 (35-85)	68 (42-86)	67 (24-84)	
Sex (224)					
Male	7	11	9	75	<i>< 0.001</i>
Female	40	27	14	41	
Risk					
Low risk	47	16	12	26	<i>< 0.001</i>
High risk	0	22	11	90	
Additional Cytogenetics alterations					
-7/7q-	0	0	1	69	
-17/17p-	0	0	0	32	
WHO (2008)					
RCUD	0	6	4	5	
RARS	0	0	1	1	
RCMD	0	8	5	17	
RAEB-1	0	15	6	19	
RAEB-2	0	0	2	28	
MDS with isolated 5q-	47	0	0	1*	
MDS-U	0	1	1	2	
Secondary AML	0	5	3	19	
Primary AML	0	3	1	23	
IPSS (n=146)					
Good	27	9	0	4	
Intermediate-1	8	13	12	11	
Intermediate-2	0	0	1	33	
Poor	0	0	2	26	
IPSS-R (n=150)					
Very Good	7	2	0	1	
Good	20	7	5	0	
Intermediate	9	12	5	1	
Poor	0	3	3	13	
Very Poor	0	1	1	60	

Blood Count, median (min-max)					
Hemoglobin (g/dL)	9.9 (7.3-13.4)	9.0 (4.3-12.3)	8.5 (6.7-11.4)	9.5 (4.7-82.0)	0.063
Platelets x 10 ⁹ /L	230 (37-550)	210 (14-1042)	120 (12-386)	40.5 (3-340)	<0.001
Leucocytes x 10 ⁹ /L	4.0 (0.1-10.1)	3.6 (1.3-11.9)	3.5 (0.3-182.9)	2.7 (0.1-88.4)	0.008
ANC	1.6 (0.5-7.67)	1.5 (0.35-7.40)	1.6 (0.1-89.6)	0.7 (0.1-6.0)	<0.001
BM Blasts (%)	2 (0-5)	6 (0-76)	4 (0-45)	9 (0-87)	<0.001
Sequencing technique					
Whole exome	32	20	8	24	
TruSeq	15	18	15	80	

* original diagnosis

Table 2: Gene panel

GENE	CHR LOCATION	GENE	CHR LOCATION	GENE	CHR LOCATION
APC	5q21q22	FLT3	13q12	PRPF8	17p13.3
ASXL1	20q11	GATA2	3q21	PTCH1	9q22.3
BCOR	Xp11.4	GLI1	12q13.2-q13.3	PTPN11	12q24
BCORL1	Xq25-q26.1	GLI2	2q14	RAD21	8q24.11
BTRC	10q24.32	GNB1	1p36.33	RNF25	2q35
C7orf55	7q34	GPR98	5q13	RUNX1	21q22.3
CALR	19p13.3-p13.2	IDH1	2q32-qter	SETBP1	18q21.1
CBL	11q23.3	IDH2	15q21-qter	SF3B1	2q33.1
CCDC42B	12q24.13	IRF4	6p25-p23	SIMC1	5q35.2
CDH23	10q22.1	JAK2	9q24	SMC3	10q25
CEBPA	19q13.1	JAK3	19q13.1	SRSF2	17q25.1
CFTR	7q31.2	KDM6A	Xp11.2	STAG2	Xq25
CSF1R	5q32	KIT	4q11-q12	STAT3	17q21.31
CUX1	7q22.1	KRAS	12p12.1	SUZ12	17q11.2
DDX41	5q35.3	MECOM	3q26.2	TET2	4q24
DDX54	12q24.13	MED12	Xq13	TP53	17p13.1
DHX29	5q11.2	MLL/KT2A	11q23.3	U2AF1	21q22.3
DNMT3A	2p23	NF1	17q11.2	U2AF2	19q13.42
EED	11q14.2-q22.3	NPM1	5q35.1	WT1	11p13
ERBB4	2q33.3-q34	NRAS	1p13.2	ZRSR2	Xp22.1
ETV6	12p13	OGT	Xq13		
EZH2	7q35-q36	PHF6	Xq26.3		

Table 3: Clinical parameters and study group characteristics of most mutated genes by WES.

	TP53			DNMT3A			CSNK1A1			PRPF8			SF3B1			ASXL1		
	Mutated	Non mutated	P	Mutated	Non mutated	P	Mutated	Non mutated	P	Mutated	Non mutated	P	Mutated	Non mutated	P	Mutated	Non mutated	P
Age	71.0 (54-86)	71 (35-94)	-	76.5 (62-82)	71 (35-94)	-	75 (62-85)	71 (35-94)	-	72 (65-84)	71 (35-94)	-	82 (63-94)	71 (35-94)	-	79 (69-83)	71 (35-94)	0.07
Gender (M:F)	9:11	25:49	-	3:3	31:57	-	2:5	32:55	-	4:3	30:57	-	1:3	33:57	-	1:4	33:56	-
WHO 2008																		
RCUD	0	4	-	0	4	-	1	3	-	1	3	-	1	3	-	0	4	-
RARS	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-
RCMD	2	8	-	0	10	-	1	9	-	1	9	-	1	9	-	0	10	-
RAEB-1	1	12	-	2	11	-	0	13	-	1	12	-	1	12	-	0	13	-
RAEB-2	2	3	-	1	4	-	0	5	-	0	5	-	0	5	-	1	4	-
MDS 5q-	1	28	-	0	29	-	5	24	-	0	29	-	1	28	-	4	25	-
MDS-U	0	2	-	0	2	-	0	2	-	1	1	-	0	2	-	0	2	-
sAML	4	8	-	2	10	-	0	2	-	2	10	-	0	12	-	0	12	-
pAML	10	6	-	1	15	-	0	16	-	1	15	-	0	16	-	0	16	-
Clinical Parameters																		
Hemoglobin (g/L)	9.5 (7.4-10.8)	9.2 (4.3-13.4)	-	10.3 (5.9-11.4)	9.3 (4.3-13.4)	-	9.5 (7.3-12.0)	9.3 (7.3-12.0)	-	9.5 (4.3-10.3)	9.1 (5.9-13.4)	-	8.6 (5.9-9.3)	9.4 (4.3-13.4)	-	8.9 (7.3-9.8)	9.3 (4.3-13.4)	-
Platelets (L)	59 (9.0-128.0)	143 (11-653)	0.002	100.5 (9.0-653.0)	100.5 (9.0-653.0)	-	95.5 (9-653)	176 (47.0-254.0)	-	109.5 (11-340)	97.5 (9-653)	-	138.0 (85-653)	95.5 (9-550)	-	47 (42-425)	98 (9-653)	-
Leucocytes (x10 ⁹ /L)	0.8 (0.1-76.9)	3.3 (0.1-182.9)	0.018	3.9 (0.1-11.9)	3.1 (0.1-182.9)	-	3.0 (2.6-8.4)	3.2 (0.1-182.0)	-	3.6 (0.1-10.1)	3.2 (0-182)	-	3.3 (2.6-5.1)	3.2 (0.1-182.9)	-	2.6 (1.6-2.9)	3.2 (0-182.9)	-
ANC (L)	0.1 (0.1-3.75)	1.4 (0.1-89.6)	0.003	1.83 (0.1-6.0)	1.1 (0.1-89.61)	-	1.4 (0.8-5.0)	1.1 (0.1-89.6)	-	2.4 (0.1-4.9)	1.1 (0.1-89.6)	-	1.6 (0.9-3.8)	1.1 (0.9-3.8)	-	1.1 (0.07-1.10)	1.15 (0.0-89.6)	-
BM Blasts (%)	17.0 (1.0-64.0)	3.0 (0-76)	0.012	13.0 (3.0-45.0)	3.0 (0.0-76.0)	0.034	3.0 (0-76)	2.8 (0.0-4.0)	-	2.0 (0-35)	3.0 (0-76)	-	0.5 (0.0-7.0)	3.0 (0.0-76.0)	-	3.0 (0-15)	3.0 (0-76)	-
Study Group																		
MDS 5q-	1	30	<0.001	0	31	-	5	26	0.074	0	31	-	1	30	-	4	27	-
Isolated 5q-	0	20		2	18	-	1	19		2	18	-	2	18	-	0	20	-
5q- + 1 alt	1	7		2	6	-	1	7		1	7	-	1	7	-	0	8	-
5q- + complex	18	17		2	33	-	0	35		4	31	-	0	35	-	1	34	-
Presence of other mutations																		
Mutations alone	10	17	-	1	26	-	1	26	-	0	27	-	2	25	-	0	27	-
Mutations ≥2	10	33	-	5	38	-	6	37	-	7	36	-	2	41	-	5	38	-
Sample point																		
Diagnosis	4	46	0.076	2	48	-	6	44	-	3	47	-	4	46	-	3	47	-
Treatment	2	14		1	15	-	0	16	-	2	14	-	0	16	-	1	15	-
Progression	4	9		2	11	-	1	12	-	1	12	-	0	13	-	1	12	-
OS	4.9 (0.0-13.1)	28.3 (16.3-40.3)	-	14.8 (0.1-33.0)	28.3 (19.2-37.4)	-	57.7 (0.1-119.5)	27.4 (17.4-37.4)	-	NR	27.4 (16.9-38.0)	-	17.9 (12.3-23.6)	28.3 (18.8-37.8)	-	NR	27.4 (14.2-40.6)	-

Gender: M: Male, F: Female; WHO 2008: RCUD: Refractory Cytopenia with unilineage dysplasia; RARS: Refractory Anemia with Ring Sideroblasts; RCMD: Refractory Cytopenia with multilineage dysplasia; RAEB: Refractory Anemia with Excess Blasts type -1 and 2; MDS 5q-: MDS with isolated del(5q); MDS-U: MDS Unclassifiable; sAML: secondary AML; pAML: primary AML. Study group: MDS 5q-: MDS with isolated del(5q); NR: Non reached.

Table 4: Relation of number of mutations detected by TruSeq and study group.

	Isolated 5q		+1 alt		CK (n=41)	
	Mutations	OS* (P=0.652)	Mutations	OS* (P=0.450)	Mutations	OS* (P=0.799)
0 alterations	24	NR	2	17.0 (-)	16	5.5 (3.1-7.9)
1 alteration	10	NR	6	14.8** (0.1-32.2)	12	6.1 (0.1-13.7)
≥2 alterations	4	17.93 (0.1-57)	1	-	13	5.2 (3.3-7.7)

* OS: median months; ** 1 alteration and ≥2 alterations were grouped. NR: non-reached.

Table 5: Clinical parameters and study group characteristics of most mutated genes by TruSeq and WES.

	TP53			DNMT3A			PRPF8			SF3B1			ASXL1		
	Mutated	Non mutated	P	Mutated	Non mutated	P	Mutated	Non mutated	P	Mutated	Non mutated	P	Mutated	Non mutated	P
Age	68 (24-86)	69 (35-94)	-	73.0 (38-84)	68.0 (24-94)	-	72 (55-84)	69 (24-94)	-	74 (48-94)	68 (24-88)	-	72 (31-84)	68 (24-94)	-
Gender (M:F)	37:26	65:96	-	12:11	90:111	-	8:5	87:105	-	4:12	98:110	-	9:9	93:113	-
WHO 2008															
RCUD	1	14	-	1	14	-	1	11	-	2	2	-	1	14	-
RARS	0	2	-	1	1	-	0	2	-	1	1	-	0	2	-
RCMD	10	19	-	3	26	-	1	27	-	5	5	-	3	26	-
RAEB-1	6	30	-	4	32	-	1	27	-	1	1	-	3	33	-
RAEB-2	19	11	-	4	26	-	2	27	-	1	1	-	1	29	-
MDS 5q-	1	44	-	3	42	-	1	38	-	4	4	-	4	41	-
MDS-U	1	3	-	0	4	-	1	3	-	0	0	-	0	4	-
pAML	12	15	-	2	25	-	1	26	-	0	0	-	0	27	-
sAML	10	17	-	4	23	-	4	23	-	2	2	-	2	25	-
Clinical Parameters															
Hemoglobin	9.5 (5.7-13.5)	9.3 (4.3-82.0)	-	10.0 (5.9-82.0)	9.3 (4.3-13.5)	-	9.5 (4.3-10.3)	9.3 (4.7-82.0)	-	8.7 (5.9-11.1)	9.4 (4.3-82.0)	-	9.2 (7.3-82.0)	9.4 (4.3-13.5)	-
Platelets	43 (6-340)	119 (3-1042)	<0.001	49 (3-386)	85 (6-1042)	-	59.5 (11-340)	63 (3-653)	-	159.0 (12-653)	72.0 (3-1042)	-	46.0 (3-425)	88.0 (6-1042)	-
Leucocytes	2.6 (0.1-88.4)	3.3 (0.1-182.9)	-	3.8 (0.1-17.6)	3.1 (0.1-182.9)	-	2.8 (0.1-22.9)	3.1 (0.1-182.9)	-	3.5 (0.32-7.4)	3.2 (0.1-182.9)	-	2.6 (0.7-22.9)	3.3 (0.1-182.9)	-
ANC	0.6 (0.1-5.9)	1.4 (0.1-89.6)	-	1.5 (0.1-6.3)	1.1 (0.1-89.6)	-	1.4 (0.1-5.0)	1.0 (0.0-89.6)	-	1.4 (0.1-6.3)	1.1 (0.1-89.6)	-	1.0 (0.1-5.0)	1.2 (0.1-89.6)	-
BM Blasts (%)	10.50 (0.0-79.0)	3.0 (0.0-87.0)	<0.001	10 (1-87)	4.0 (0-79)	-	5.0 (0-87)	4.5 (0.0-79.0)	-	2.0 (0.0-40.0)	5.0 (0.0-87.0)	-	4.0 (0.0-79.0)	5.0 (0.0-87.0)	-
Study Group															
MDS 5q-	1	46	-	3	44	-	1	40	-	4	43	-	4	43	-
Isolated 5q-	0	38	-	4	34	-	2	30	-	5	33	-	2	36	-
5q- + 1 alt	3	20	-	4	19	-	1	18	-	5	18	-	0	23	-
5q + complex	59	57	-	12	104	-	9	104	-	2	114	-	12	104	-
Presence of mutations															
Mutations alone	13	29	-	6	36	-	4	38	-	4	38	-	2	40	-
Mutations ≥2	13	17	-	5	25	-	3	27	-	5	25	-	4	26	-
Sample Status															
Diagnosis	10	85	-	8	87	-	4	81	-	12	83	-	5	90	-
Treatment	4	31	-	4	31	-	2	31	-	0	35	-	2	33	-
Progression	6	12	-	4	14	-	2	16	-	1	17	-	1	17	-
OS	7.3 (2.3-12.4)	23.7 (12.5-40.0)	<0.001	14.8 (0.6-28.9)	20.7 (10.7-30.7)	0.039	NR	17.0 (13.2-20.7)	-	18.0 (17.9-18.1)	17.3 (9.6-25.0)	-	23.2 (0.1-71.8)	17.3 (12.3-22.3)	-

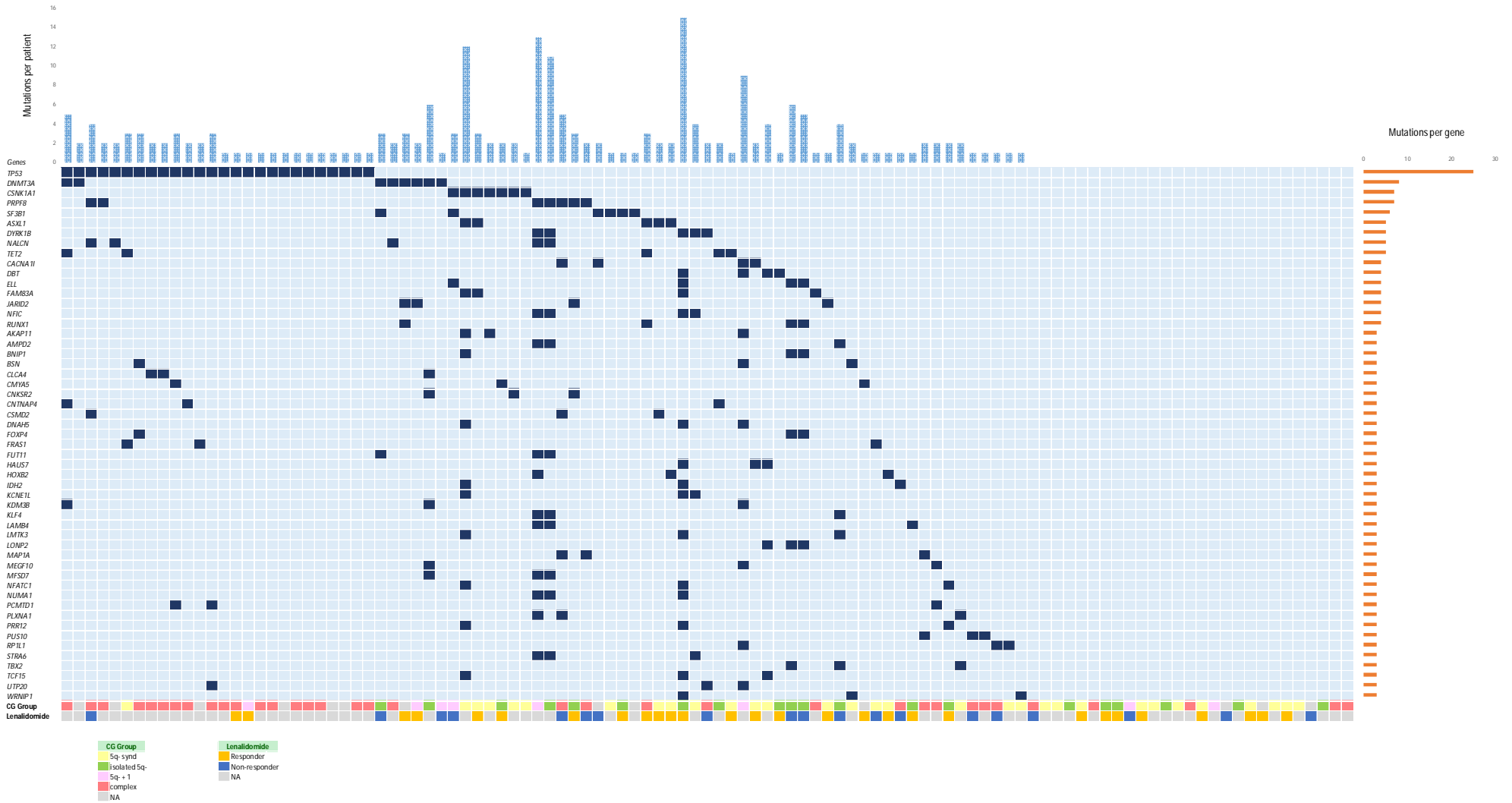
Gender: M: Male, F: Female; WHO 2008: RCUD: Refractory Cytopenia with unilineage dysplasia; RARS: Refractory Anemia with Ring Sideroblasts; RCMD: Refractory Cytopenia with multilineage dysplasia; RAEB: Refractory Anemia with Excess Blasts type -1 and 2; MDS 5q-: MDS with isolated del(5q); MDS-U: MDS Unclassifiable; sAML: secondary AML; pAML: primary AML. Study group: MDS 5q-: MDS with isolated del(5q); NR: Non reached.

Table 6: Serial sample mutational characteristics.

Patient ID	WHO 2008	Study Group	Mutations at diagnosis	Mutations during treatment		Mutations in progression	
				Months from diagnosis	Number of Mutations	Months from diagnosis	Number of Mutations
1	MDS with isolated del(5q)	MDS with isolated del(5q)	1			+ 5 months	3
2	MDS with isolated del(5q)	MDS with isolated del(5q)	6 (<i>CSNK1A1</i> : 3%)			+ 48 months	64 (<i>CSNK1A1</i> : 91%)
3	MDS with isolated del(5q)	MDS with isolated del(5q)	15 (<i>DNMT3A</i> : 38.9%)	+8 months LEN +12 months without treatment	8 (<i>DNMT3A</i> 19.1%)		
4	MDS with isolated del(5q)	MDS with isolated del(5q)	22 (<i>ASXL1</i> : 29%)	+ 8 months LEN (CR)	8 (no <i>ASXL1</i>)		
5	RAEB-1	Isolated del(5q)	21 (<i>RUNX1</i> : 8.0%)	+ 6 months LEN (CR)	16 (<i>RUNX1</i> : 31.2%)		
6	RCUD (RA)	5q- +1 alteration	10 (<i>SF3B1</i> : 16.3%)	+ 9 months LEN (CR)	4 (no <i>SF3B1</i>)		
7	RAEB-1	Isolated del(5q)	6	+ 24 months LEN (PR)	71 (<i>IDH2</i> :44%)		
8	RCMD	Isolated del(5q)	10	+ 12 months LEN (SD)	7		
9	RCMD	Isolated del(5q)	39 (<i>PRPF8</i> : 27.7%)	+ 8 months LEN (CR)	34 (<i>PRPF8</i> : 47.2%)		
10	RCMD	Isolated del(5q)	22 (<i>CSNK1A1</i> : 41.9%)	+10 months LEN (CR)	26 (no <i>CSNK1A1</i>)		
11	MDS with isolated del(5q)	MDS with isolated del(5q)	8 (<i>TET2</i> : 25.4%)	+24 months LEN (CR)	16 (no <i>TET2</i> , <i>ASXL1</i> : 35.5%)		
12	RCMD	5q- complex karyotype		+1 month LEN (NR)		+ 5 months AML progression	
13	RCUD (RA)	5q- complex karyotype	12 (<i>PRPF8</i> : 6.0%)	+ 2 months LEN (NR)		+ 1 month AML progression	29 (<i>PRPF8</i> : 3.0%)
14	RAEB-1	5q- complex karyotype		+ 10 months LEN (CR)	13 (<i>dnmt3a</i> : 21.8%)	+10 months AML progression	26 (<i>DNMT3A</i> : 23.3%; <i>RUNX1</i> : 12.5%)

* Only represented those mutations previously reported in MDS and VAF percentage.

Figure 1: Representation of non-synonymous variants detected by WES



SUPPLEMENTARY INFORMATION

Whole-exome sequencing analysis

All raw 100bp and 75bp were aligned to the human genome reference sequence (hg19) using BWA v.0.5.9-r16 with default parameters for paired-end reads. Aligned reads were realigned using GATK's Indel Realigner v 1.6-5-g557da77 combining all reads from the same patients and subsequently splitting them. Duplicate reads were removed using Picard Tools (<http://picard.sourceforge.net>) v 1.65 Mark Duplicates. Finally the GATK's Table Recalibration tool was used to recalibrate the reads' base quality scores. Median coverage was 60x. Somatic SNVs were identified by using VarScan2 v 2.3 to compare the tumor to the normal sample and identify, for each patient, the single nucleotide variants (SNVs) and small insertions and deletions (indels) that are inherited (germline variants), acquired in the tumor (somatic mutations), resulting from a loss of heterozygosity (LOH) or of unknown status. The required pileup files for VarScan2 were generated using SAMTools (PUBMED-ID: 19505943) mpileup v 0.1.18.

REFERENCES

- Bejar, R., Stevenson, K., Abdel-Wahab, O., Galili, N., Nilsson, B., Garcia-Manero, G., Kantarjian, H., Raza, A., Levine, R.L., Neuberg, D., et al. (2011). Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N. Engl. J. Med.* *364*, 2496–2506.
- Van den Berghe, H., Cassiman, J.J., David, G., Fryns, J.P., Michaux, J.L., and Sokal, G. (1974). Distinct haematological disorder with deletion of long arm of no. 5 chromosome. *Nature* *251*, 437–438.
- Boulton, J., Lewis, S., and Wainscoat, J.S. (1994). The 5q-syndrome. *Blood* *84*, 3253–3260.
- Boulton, J., Fidler, C., Strickson, A.J., Watkins, F., Gama, S., Kearney, L., Tosi, S., Kasprzyk, A., Cheng, J.-F., Jaju, R.J., et al. (2002). Narrowing and genomic annotation of the commonly deleted region of the 5q- syndrome. *Blood* *99*, 4638–4641.
- Cazzola, M., Della Porta, M.G., and Malcovati, L. (2013). The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. *Blood* *122*, 4021–4034.
- Cheson, B.D., Greenberg, P.L., Bennett, J.M., Lowenberg, B., Wijermans, P.W., Nimer, S.D., Pinto, A., Beran, M., de Witte, T.M., Stone, R.M., et al. (2006). Clinical application and proposal for modification of the International Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia. *Blood* *108*, 419–425.
- Ebert, B.L. (2011). Molecular dissection of the 5q deletion in myelodysplastic syndrome. *Semin. Oncol.* *38*, 621–626.
- Garcia-Manero, G. (2015). Myelodysplastic syndromes: 2015 Update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am. J. Hematol.* *90*, 831–841.
- Greenberg, P.L., Tuechler, H., Schanz, J., Sanz, G., Garcia-Manero, G., Solé, F., Bennett, J.M., Bowen, D., Fenaux, P., Dreyfus, F., et al. (2012). Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* *120*, 2454–2465.
- Haase, D., Germing, U., Schanz, J., Pfeilstöcker, M., Nösslinger, T., Hildebrandt, B., Kundgen, A., Lübbert, M., Kunzmann, R., Giagounidis, A.A.N., et al. (2007). New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* *110*, 4385–4395.
- Jädersten, M., Saft, L., Smith, A., Kulasekararaj, A., Pomplun, S., Göhring, G., Hedlund, A., Hast, R., Schlegelberger, B., Porwit, A., et al. (2011). TP53 mutations in low-risk myelodysplastic syndromes with del(5q) predict disease progression. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *29*, 1971–1979.
- Jaffe, E.S., Harris, N.L., and Stein, H. (2001). *Pathology and Genetics: Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* (Lyon, France).
- Jaiswal, S., Fontanillas, P., Flannick, J., Manning, A., Grauman, P.V., Mar, B.G., Lindsley, R.C., Mermel, C.H., Burt, N., Chavez, A., et al. (2014). Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N. Engl. J. Med.* *371*, 2488–2498.
- Krönke, J., Fink, E.C., Hollenbach, P.W., MacBeth, K.J., Hurst, S.N., Udeshi, N.D., Chamberlain, P.P., Mani, D.R., Man, H.W., Gandhi, A.K., et al. (2015). Lenalidomide induces ubiquitination and degradation of CK1α in del(5q) MDS. *Nature* *523*, 183–188.
- List, A., Dewald, G., Bennett, J., Giagounidis, A., Raza, A., Feldman, E., Powell, B., Greenberg, P., Thomas, D., Stone, R., et al. (2006). Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *N. Engl. J. Med.* *355*, 1456–1465.

- Makishima, H., and Maciejewski, J.P. (2011). Pathogenesis and consequences of uniparental disomy in cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17, 3913–3923.
- Malcovati, L., Germing, U., Kuendgen, A., Della Porta, M.G., Pascutto, C., Invernizzi, R., Giagounidis, A., Hildebrandt, B., Bernasconi, P., Knipp, S., et al. (2007). Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 25, 3503–3510.
- Mallo, M., Del Rey, M., Ibáñez, M., Calasanz, M.J., Arenillas, L., Larráyo, M.J., Pedro, C., Jerez, A., Maciejewski, J., Costa, D., et al. (2013). Response to lenalidomide in myelodysplastic syndromes with del(5q): influence of cytogenetics and mutations. *Br. J. Haematol.* 162, 74–86.
- Papaemmanuil, E., Cazzola, M., Boulton, J., Malcovati, L., Vyas, P., Bowen, D., Pellagatti, A., Wainscoat, J.S., Hellstrom-Lindberg, E., Gambacorti-Passerini, C., et al. (2011). Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N. Engl. J. Med.* 365, 1384–1395.
- Pellagatti, A., Fernandez-Mercado, M., Di Genua, C., Larrayoz, M.J., Killick, S., Dolatshad, H., Burns, A., Calasanz, M.J., Schuh, A., and Boulton, J. (2014). Whole-exome sequencing in del(5q) myelodysplastic syndromes in transformation to acute myeloid leukemia. *Leukemia* 28, 1148–1151.
- Raza, A., Gezer, S., Mundle, S., Gao, X.Z., Alvi, S., Borok, R., Rifkin, S., Iftikhar, A., Shetty, V., and Parcharidou, A. (1995). Apoptosis in bone marrow biopsy samples involving stromal and hematopoietic cells in 50 patients with myelodysplastic syndromes. *Blood* 86, 268–276.
- Schanz, J., Tüchler, H., Solé, F., Mallo, M., Luño, E., Cervera, J., Granada, I., Hildebrandt, B., Slovak, M.L., Ohyashiki, K., et al. (2012). 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. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 30, 820–829.
- Schneider, R.K., Ademà, V., Heckl, D., Järås, M., Mallo, M., Lord, A.M., Chu, L.P., McConkey, M.E., Kramann, R., Mullally, A., et al. (2014). Role of casein kinase 1A1 in the biology and targeted therapy of del(5q) MDS. *Cancer Cell* 26, 509–520.
- Shaffer, L., McGowan-Jordan, J., and Schmid, M. (2013). An International System for Human Cytogenetic Nomenclature.
- Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J., and Vardiman, J.W. (2008). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (Lyon, France).
- Tefferi, A., and Vardiman, J.W. (2009). Myelodysplastic syndromes. *N. Engl. J. Med.* 361, 1872–1885.
- Yang, L., Rau, R., and Goodell, M.A. (2015). DNMT3A in haematological malignancies. *Nat. Rev. Cancer* 15, 152–165.

DISCUSIÓN

“Cuando ya no somos capaces de cambiar una situación,
nos encontramos ante el desafío de
cambiarnos a nosotros mismos”

Víctor Frankl

5 DISCUSIÓN

Los síndromes mielodisplásicos es una entidad altamente heterogénea que se caracteriza por citopenias en SP y un riesgo incrementado de progresión a LMA. Su diagnóstico se basa en la evidencia morfológica de la displasia mediante la observación de un aspirado de MO, y los pacientes se clasifican en 7 grupos morfológicos de acuerdo con los criterios establecidos por la WHO 2008 (Swerdlow et al., 2008). El pronóstico se mide mediante el cálculo de índices pronósticos, el más utilizado es el IPSS-R (Greenberg et al., 2012) que incluye las citopenias, el porcentaje de blastos en MO y las características citogenéticas. La estratificación del riesgo de estos pacientes nos permitirá determinar cuál es la mejor terapia para el paciente, ya que los objetivos en pacientes de bajo riesgo y alto riesgo serán distintos. En pacientes de bajo riesgo el objetivo es disminuir los requerimientos transfusionales y prevenir la transformación a un SMD de alto riesgo o la progresión a una LMA. En el caso de los pacientes de alto riesgo el objetivo será prolongar la supervivencia.

La primera parte de esta tesis se centra en el estudio de pacientes mediante técnicas de citogenética convencional y FISH. Ambas técnicas se consideran el “*gold estándar*” en los laboratorios de citogenética par el estudio de las neoplasias mieloides.

El **estudio I** (punto 4.1) de esta tesis se basa en el estudio del cariotipo complejo, este se detecta en un 15% de los pacientes con SMD y presenta un pronóstico adverso, aunque heterogéneo. Durante los últimos años y a raíz de la definición del cariotipo monosómico se ha generado controversia para determinar si el cariotipo monosómico podría definir mejor un grupo de pacientes con un peor riesgo en el cariotipo complejo (Belli et al., 2011; Breems et al., 2008; McQuilten et al., 2015; Patnaik et al., 2011; Schanz et al., 2013). Para ello, analizamos las características citogenéticas de pacientes con cariotipos de menos de 3 alteraciones, cariotipos complejos y cariotipos monosómicos con el fin de determinar el impacto del cariotipo monosómico en la SG y en el riesgo de pro-

gresión a LMA de pacientes con SMD *de novo*. El **estudio II** (punto 4.2) se centró en determinar la incidencia de la delección 7q y la monosomía 7 en pacientes que mediante citogenética convencional no presentaron la delección o la monosomía del cromosoma 7, y el impacto de la información adicional que aporta el estudio mediante la técnica de FISH así cómo cuál sería el grupo de pacientes que se beneficiaría de estos estudios.

La segunda parte de esta tesis se centra en el estudio mediante técnicas de microarrays genómicos (SNP-arrays, SNP-A) y de *next-generation sequencing* para el estudio de ganancias y pérdidas o alteraciones mutacionales respectivamente en pacientes con SMD y LMA y la delección 5q. La utilidad de los SNP-A en pacientes con SMD y LMA ha sido ampliamente probada por distintos grupos (Jerez et al., 2012; Maciejewski et al., 2009; Makishima and Maciejewski, 2011; Mallo et al., 2013) y ha permitido caracterizar mejor el tamaño de la delección 5q. Los estudios moleculares en pacientes con SMD han demostrado tener una clara relación entre fenotipo y genotipo, así como implicación pronóstica. En el **estudio III** (punto 4.3) hemos estudiado un total de 228 pacientes con la delección 5q determinada mediante CC. Mediante técnicas de whole-exome sequencing y de secuenciación dirigida, para determinar si las alteraciones moleculares proporcionan información adicional que nos permitan definir mejor el pronóstico de los pacientes así como la respuesta o recaída al tratamiento.

5.1 EL CARIOTIPO MONOSÓMICO EN LOS SMD ES ÚTIL PARA DEFINIR UN SUBGRUPO DE PEOR PRONÓSTICO EN LOS PACIENTES QUE PRESENTAN UN CARIOTIPO ALTERADO, YA SEA COMPLEJO O NO, Y POR LO TANTO SER DE UTILIDAD COMO EN LOS PACIENTES CON LMA.

El **cariotipo complejo (CK, complex karyotype)** se define por presentar tres o más alteraciones clonales y se asocia claramente a un peor pronóstico (Greenberg et al., 1997, 1998, 2012; Haase et al., 2007;

Schanz et al., 2011). Actualmente y gracias a la nueva clasificación citogenética para el IPSS-R, se ha demostrado que hay un pronóstico diferenciado entre los pacientes que presentan 3 alteraciones y los que presentan más de tres alteraciones (mediana de SG 15,6 meses vs. 5,7 meses ($P<0,01$), respectivamente) (Schanz et al., 2012). Aun así es un grupo altamente heterogéneo y poco sabemos de la relevancia pronóstica que pueden tener los distintos subgrupos. Actualmente y a raíz del estudio publicado por Breems y cols (Breems et al., 2008) en el que determinaron que el **cariotipo monosómico (MK, *monosomal karyotype*)** suponía un peor pronóstico en pacientes con LMA, diferentes estudios han tratado de aclarar si el MK define un grupo de peor pronóstico en los SMD con cariotipo complejo.

En el **estudio I** analizamos un total de 1.054 pacientes con SMD de novo, de los cuales 203 (19,3%) presentaban un CK. De ellos, 150 (73,9%) también cumplían los criterios de MK (2 monosomías o una monosomía y una alteración estructural). El MK se describió en un total de 172 pacientes (16,3%), 150 (87,2%) de los cuales también cumplían criterios de CK. Esto demostraba una estrecha relación entre el CK y el MK, ya que sólo 22 pacientes presentaban un MK fuera del contexto de un CK. Schanz y cols (Schanz et al., 2013) también determinaron una fuerte relación entre el MK y un alto número de alteraciones, ya que observaron que el porcentaje de MK incrementa a medida que incrementa el número de alteraciones, así pues pacientes con 2, 3, 4 ó ≥ 5 alteraciones citogenéticas adicionales presentan, 13%, 37%, 73% y un 84% de pacientes con MK, respectivamente.

Inicialmente, analizamos el impacto de las alteraciones citogenéticas en los pacientes con CK para determinar si había algún grupo de peor pronóstico dentro del CK. Determinamos que la SG disminuía con el incremento en la complejidad del cariotipo, es decir, pacientes con CK y más de 3 alteraciones presentaban una peor SG que los pacientes con CK de 3 alteraciones y que los pacientes sin CK (mediana SG: 7,56 vs. 10,23 vs. 47,7; $P<0,001$, respectivamente). Estos resultados concuerdan con los determinados para la clasificación citogenética del IPSS-R

realizada por Schanz y cols (Schanz et al., 2012) en el que demuestra que el CK con más de 3 alteraciones presenta una SG peor y significativamente diferente que los pacientes con CK de tres alteraciones (mediana SG: 5,7 vs. 15,6; $P < 0,01$, meses respectivamente).

Realizamos el mismo análisis para los pacientes con MK, demostrando que cariotipos con más alteraciones presentaban una peor supervivencia. La mediana de SG disminuía al incrementar el número de alteraciones en los grupos sin CK, CK de tres alteraciones y CK de más de tres alteraciones (20,57 vs. 9,38 vs. 7,62; $P = 0,02$, meses respectivamente). Cuando analizamos el efecto en la SG del MK en pacientes con CK, vimos una tendencia a una menor SG ($P = 0,092$) (Figura 25), pero en todo caso no resultó significativa en el análisis univariado.

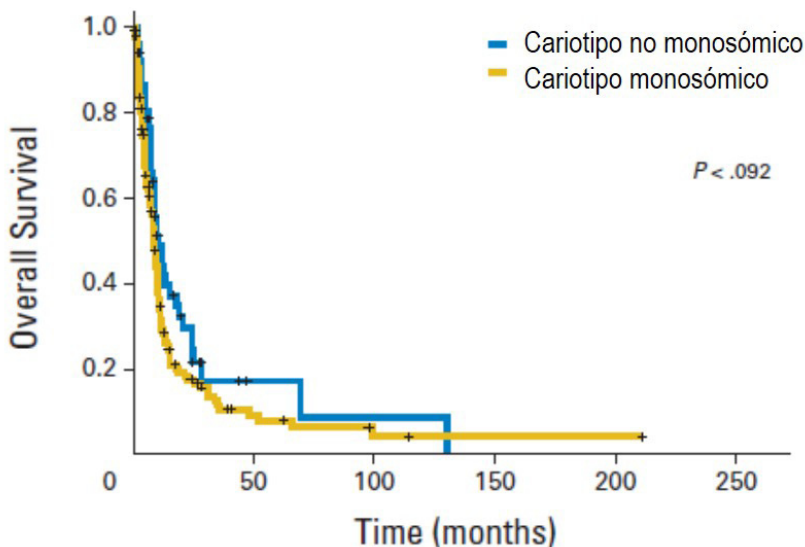


Figura 25_ Curva Kaplan-Meier de la SG de pacientes con CK, comparación entre pacientes que además presentaban MK vs. pacientes sin MK.

El efecto del MK en pacientes con CK tampoco presentó influencia en el análisis multivariado. En el estudio de Schanz y cols (Schanz et al., 2013), los resultados fueron similares a los nuestros y aunque el MK no mantuvo su influencia en la SG en el análisis multivariado, sí determinaron una relación significativa entre el número de alteraciones

adicionales y el MK hasta un máximo de 4 alteraciones, es decir, el MK presentaba influencia en la SG en MK con 2, 3 y 4 alteraciones (mediana SG: 13,4 vs. 8,0 vs. 7,9; $P < 0,001$; meses respectivamente) pero a partir de 5 alteraciones el efecto negativo del cariotipo estaba muy influenciado por el número de alteraciones y no por la presencia de un MK. Contrariamente McQuilten y cols (McQuilten et al., 2015) determinaron que la influencia del MK sí que se mantenía en pacientes con más de 4 alteraciones citogenéticas respecto a pacientes sin MK (mediana SG: 6,0 vs. 9,0; $P = 0,02$; meses respectivamente), igual que los resultados obtenidos Patnaik y cols (Patnaik et al., 2011) que difieren de los nuestros, ya que, en ambos estudios el MK mantuvo su influencia independiente en el análisis multivariado. En el estudio de Belli y cols (Belli et al., 2011) determinaron un comportamiento similar entre el CK y el MK pero no incluyeron el MK en el análisis multivariado, con lo que no podemos saber si se habría mantenido o no significativo.

Para intentar esclarecer este punto y debido a la alta relación que detectamos entre el MK y las alteraciones citogenéticas adicionales, decidimos analizar la SG de los pacientes con un máximo de dos alteraciones citogenéticas. De esta manera, manteníamos la definición de MK sin el contexto de un CK. Los pacientes con dos alteraciones que cumplían criterios de MK presentaron una SG inferior a los pacientes sin MK (mediana de la SG: 20,8 vs. 36,2; $P = 0,02$; meses respectivamente) en el análisis univariado (Figura 26). Pero la influencia del MK se perdió en el análisis multivariado. Este hecho refuerza la hipótesis que la complejidad del cariotipo determina el peor pronóstico en los pacientes con MK y CK, además cuando hacemos el análisis teniendo en cuenta si el CK tiene influencia en el MK, este demuestra tener un impacto independiente en los pacientes con MK tanto en el estudio univariado como en multivariado. Los resultados obtenidos por Schanz y cols (Schanz et al., 2013) apoyan esta teoría, ya que el pronóstico de los pacientes con MK empeora cuando incrementan el número de alteraciones adicionales, con lo que determinan que es el número de alteraciones lo que define el peor pronóstico independientemente del MK. En los estudios de McQuilten y cols, Patnaik y cols y Schanz y cols (McQuilten et al., 2015;

Patnaik et al., 2011; Schanz et al., 2013) no estudiaron el efecto del MK fuera del contexto de un CK.

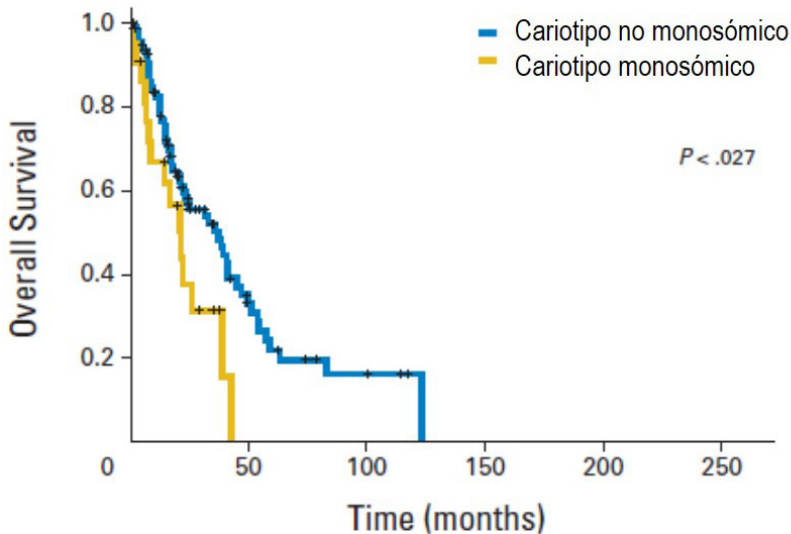


Figura 26_ Curva Kaplan-Meier de la SG de pacientes con MK de 2 alteraciones vs. pacientes con cariotipo no monosómico de 2 alteraciones.

Aunque la influencia del MK no se mantuvo en el análisis multivariado, pero si en el análisis univariado, quisimos determinar si las monosomías en el cromosoma 5 y cromosoma 7, que son las más frecuentes en pacientes con MK, presentaban influencia en el MK. La SG de los pacientes con MK y monosomías 5 y/ó 7 presentaron una peor SG que los pacientes con MK que involucraban otras alteraciones citogenéticas o los pacientes sin MK (mediana de SG: 8,12 vs. 8,19 vs. 46,17; $P < 0,001$; meses respectivamente). La presencia de estas monosomías mantuvo su influencia en la SG en el análisis multivariado. En el estudio de McQuilten y cols (McQuilten et al., 2015) ambas alteraciones fueron significativas en el análisis univariado pero no mantuvieron su significación en el análisis multivariado, probablemente porque la mayoría se encontraba formando parte de un CK. Contrariamente, en los estudios de Patnaik y cols (Patnaik et al., 2011) la SG fue similar entre pacientes con MK y monosomías 5 y/ó 7 que en pacientes con otras monosomías. Del

mismo modo, Schanz y cols (Schanz et al., 2013) no determinaron diferencias significativas entre la SG de pacientes con MK y monosomías 5 y/ó 7 y los pacientes con MK con otras monosomías. Sin embargo cuando dividieron los pacientes en más o menos de 5 alteraciones los pacientes con menos de 5 alteraciones y sin los cromosomas 5 ó 7 involucrados presentaban una mejor SG (mediana de SG: 12,2 vs. 8,2; $P=0,053$; meses respectivamente), la presencia de estas monosomías no presentaba ningún efecto en CK de más de 5 alteraciones. Seguramente nuestro estudio determinó diferencias significativas, ya que la mayoría de los pacientes con MK involucraban estos cromosomas. El impacto de la monosomía 5, es controvertido, ya que en la mayoría de los casos no es una monosomía real (Galván et al., 2010) sino que determina una elevada inestabilidad clonal que enmascara reordenamientos de la del(5q). En el caso de la monosomía 7, se incluye como alteración de mal pronóstico en la nueva clasificación citogenética para el IPSS-R (Greenberg et al., 2012; Schanz et al., 2012) y demuestra una peor SG, con lo que su efecto negativo en el cariotipo monosómico era esperable.

Respecto al riesgo de progresión a LMA, el MK no presentó influencia en la evolución a LMA, mientras que si lo hizo la complejidad cromosómica. Patnaik y cols (Patnaik et al., 2011) tampoco obtuvieron resultados estadísticamente significativos, aunque la probabilidad de progresar a una LMA fue superior en pacientes con MK que en pacientes con CK (HR: 2,9, IC 95%, 0,8-9,0; $P=0,09$; respectivamente). En el estudio de Schanz y cols (Schanz et al., 2013) el MK tampoco presentó influencia independiente del riesgo de progresión a LMA.

Con los datos obtenidos, parece ser que el MK no presenta una influencia independiente en la SG de los pacientes con SMD. En cambio, la complejidad del cariotipo, es decir el número de alteraciones citogenéticas sí que presentan un impacto independiente en la SG y en la probabilidad de progresión a LMA.

5.2 APLICABILIDAD Y UTILIDAD DE LAS TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA CONVENCIONAL Y FISH DE 7Q PARA EL ESTUDIO DE LOS SMD.

El **estudio citogenético** de MO es una de las variables más importantes en el cálculo del pronóstico de los pacientes con SMD y en algunos casos, en la elección de la terapia más efectiva. Además de la citogenética otros estudios pueden ser útiles para el diagnóstico de los SMD, como la técnica molecular de FISH. La **técnica de FISH** nos permite detectar ganancias, pérdidas y translocaciones desequilibradas presentando una mayor sensibilidad que la CC convencional. Mediante el uso de sondas específicas de secuencia podremos estudiar células en interfase y evitar la necesidad de la obtención de células en metafase.

Una de las alteraciones más representativas en los SMD de alto riesgo son las que involucran el cromosoma 7, tanto la monosomía (-7) como la pérdida intersticial de 7q [del(7q)]. Aproximadamente un 10% de los pacientes con SMD presentan alteraciones en este cromosoma, tanto de manera aislada como formando parte de un cariotipo complejo (Haase et al., 2007).

En el **estudio II** analizamos un total de 820 pacientes con SMD y realizamos el FISH aplicando la sonda 7q31 [D7S486/CEN 7 (D7Z1)]. En nuestro estudio pudimos detectar un total de 5,2% de casos positivos, demostrando que la técnica de FISH presenta una mayor sensibilidad en la detección de la -7 o la del(7q).

Detectamos un total de 5,2% de casos positivos y la mayoría se detectaron en pacientes con cariotipo normal. Dicho hallazgo no es extrañar ya que el porcentaje de pacientes con SMD y cariotipo normal asciende al 50%, constituyendo un grupo altamente heterogéneo. Además, estudios anteriores mediante FISH de pacientes con SMD y cariotipo normal, como el de Bernasconi y cols (Bernasconi et al., 2003), el de Rigolini y cols (Rigolin et al., 2001) y el de Ketterling y cols (Ketterling et al., 2002) demostraron que la técnica de CC puede fallar en

revelar algunas alteraciones citogenéticas. Esto puede ser debido a alteraciones crípticas, en cuyo caso sería por una relación directa con la resolución de la técnica, pero en otros casos puede deberse a la incapacidad del clon displásico de dividirse correctamente *in vitro*, es decir, porque presenta un bajo índice mitótico, o debido a una MO pobre en celularidad o un bajo porcentaje de células con la alteración.

Para determinar si el FISH era igual de resolutivo en todos los pacientes con cariotipo normal, estratificamos el cariotipo normal en función del número de metafases que pudieron ser cariotipadas de acuerdo con el estudio de Mallo y cols (Mallo et al., 2008), y pudimos determinar una relación inversamente proporcional entre el número de metafases analizadas y el número de casos positivos, es decir, a mayor número de metafases analizadas menor porcentaje de casos positivos mediante FISH. Al mismo tiempo, los pacientes con un cariotipo sin metafases y los pacientes que presentaron entre 1 y 9 metafases normales presentaron un porcentaje similar de casos positivos por FISH (11,1% vs. 8,6%, respectivamente), estos resultados confirmarían las hipótesis de estudios anteriores respecto a la sensibilidad por un bajo porcentaje de células con la alteración o por un bajo índice mitótico del clon displásico (Bernasconi et al., 2003; Ketterling et al., 2002; Rigolin et al., 2001). También sería importante la aplicación del FISH para verificar monosomías o deleciones que no alcanzan el mínimo de metafases para ser consideradas alteraciones clonales (las monosomías y las deleciones deben detectarse en un mínimo de 3 metafases o 2 metafases, respectivamente) de acuerdo con las guías del ISCN 2013 (Shaffer et al., 2013), en el estudio de Wyandt y cols (Wyandt et al., 1998) pudieron confirmar, aunque no todas, algunas de las monosomías 7. Siendo la monosomía 7 una alteración de mal pronóstico (Greenberg et al., 1997, 1998, 2012), sería recomendable realizar el FISH cuando la clonalidad no se puede establecer. El grupo control de nuestro estudio (n=47) de pacientes con -7 o del(7q) por CC presentaron una correlación del 100% con la técnica de FISH.

Aun así, la utilidad de la técnica de FISH presenta cierta controversia.

Bernasconi y cols y Rigolin y cols (Bernasconi et al., 2003; Rigolin et al., 2001) demostraron que la aplicación de un panel de sondas en pacientes con cariotipo normal permitía detectar entre un 18% y un 15% de casos positivos, respectivamente. Demostrando que la efectividad del FISH no sólo residía en su mayor sensibilidad sino también en la capacidad de detectar clones minoritarios o clones tumorales con muy bajo índice mitótico. En cambio, estudios realizados por Cherry y cols (en pacientes con cariotipo normal y alterado) y Ketterling y cols (pacientes con cariotipo normal) (Cherry et al., 2003; Ketterling et al., 2002) no determinaron la superioridad del FISH respecto a la CC. Ambos estudios se realizaron en pacientes que presentaban un menor riesgo de acuerdo con el IPSS (Greenberg et al., 1997, 1998), de manera que la probabilidad de determinar nuevas alteraciones era menor. Ambos estudios determinaron la limitación de la técnica de FISH en base a la heterogeneidad existente en los pacientes con SMD, ya que las alteraciones detectadas mediante FISH responden únicamente a las sondas que se aplican. En el estudio de Romeo y cols (Romeo et al., 2002) determinaron las ventajas y las desventajas de ambas técnicas, ya que el resultado de su estudio les permitió por una parte correlacionar los resultados mediante FISH y CC, por otra parte determinar la mayor utilidad de la CC cuando las alteraciones, como por ejemplo, translocaciones que involucran otras regiones del cromosoma que no se corresponden a la sonda de FISH o alteraciones para las cuales no se había incluido la sonda de FISH, no pueden ser detectadas por FISH, y por último demostrar la utilidad del FISH en muestras sin metafases, ya que la aplicación del FISH les permitió determinar alteraciones en CC no informativas.

En casos con cariotipos complejos, el FISH nos ayuda a definir mejor la alteración, ya que algunas deleciones o monosomías del cromosoma 7 en cariotipos complejos implican reordenamientos complejos que pueden alcanzar zonas terminales y brazos cromosómicos enteros o implicar pequeñas inserciones, que pueden acabar formando pequeños marcadores muy difíciles de identificar sin la ayuda del FISH (Shaffer et al., 2013). Aun así, y de acuerdo con el estudio de Li y cols (Li et al., 2008), técnicas de pintado cromosómico como, el SKY (*Spectral Karyotyping*) o el M-FISH (*Multicolor-FISH*) serán de más utilidad, ya que permiten mejorar la caracterización de alteraciones cromosómicas complejas y

permiten descifrar marcadores cromosómicos inclasificables.

En nuestro estudio, también determinamos que la detección por FISH de la -7 o de la del(7q) suponía una disminución en la SG de los pacientes con FISH positivo (mediana SG: 38,7 vs. 82,8, $P < 0,001$; meses respectivamente). En nuestro estudio comparamos la SG entre los pacientes con -7 o del(7q) en los grupos de bajo riesgo, riesgo intermedio y de alto riesgo morfológico según la WHO 2008. Sólo pudimos determinar diferencias significativas en la SG en los pacientes de riesgo intermedio (mediana SG: 31,7 vs. 75,8; $P = 0,009$; meses respectivamente) (Figura 27). En los pacientes de bajo riesgo, no se pudo calcular debido al bajo porcentaje de pacientes con monosomía 7, y en los de alto riesgo la diferencia entre ambas alteraciones no fue significativa debido a que la mayoría presentaban un cariotipo complejo (que supone un efecto negativo en estos pacientes). Los resultados en el grupo de riesgo intermedio concuerdan con la nueva clasificación citogenética del IPSS-R de Schanz y cols (Schanz et al., 2012) en el que la monosomía 7 se clasifica como alteración de mal pronóstico y en cambio la del(7q) como alteración de riesgo intermedio (mediana SG: 9,9 vs. 37,1; $P = 0,006$; meses, respectivamente).

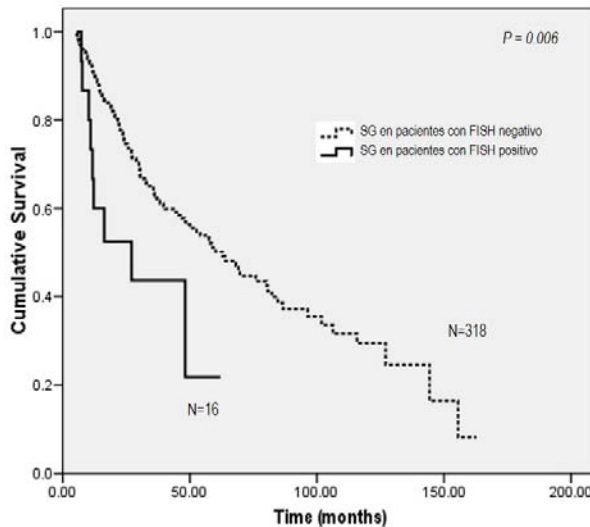


Figura 27 _ Curva Kaplan-Meier de la SG de pacientes con SMD y grupo de riesgo intermedio (Swerdlow et al., 2008) con resultado de FISH positivo vs. negativo.

Así pues, la técnica de FISH nos permite verificar alteraciones no clonales así como detectar alteraciones en pacientes que presentan un cariotipo normal. Pacientes con un riesgo intermedio, de acuerdo con la clasificación morfológica de la WHO 2008, se pueden beneficiar de la aplicación del FISH ya que nos permitirá discriminar pacientes que a priori esperaríamos que tuvieran una mejor SG, a pacientes con un claro alto riesgo.

5.3 LA ELEVADA HETEROGENEIDAD DE LA ARQUITECTURA MUTACIONAL DE LA DELECIÓN 5Q MEDIANTE TÉCNICAS DE MICROARRAYS GENÓMICOS (SNP ARRAY) Y NEXT-GENERATION SEQUENCING.

La delección 5q es una de las alteraciones más comunes en los SMD, la podemos detectar en un 20%-30% de los pacientes (en un 5% se encontrará asociada a otra alteración y hasta un 10% formando parte de un cariotipo complejo) (Haase, 2008; Raza and Galili, 2012). En el [estudio III](#), analizamos un total de 228 pacientes (241 muestras, incluyen muestras de seguimiento), de los cuales 47 presentaban un SMD con del(5q) aislada (WHO 2008, (Swerdlow et al., 2008)), 38 presentaban un SMD o LMA con una delección aislada en 5q, 23 presentaban SMD o LMA del(5q) más una alteración acompañante y 115 con SMD o LMA la del(5q) formaba parte de un cariotipo complejo.

La SG se evaluó en un total de 152 pacientes, que se clasificaron de acuerdo con **3 grupos de estudio**: casos con del(5q) aislada, casos con del(5q) +1 alteración adicional y casos con cariotipo complejo y 5q-. Se determinaron diferencias estadísticamente significativas en la SG entre los diferentes grupos de estudio. Mostrando una peor SG el grupo del(5q) en cariotipo complejo respecto al grupo con del(5q) aislada y del(5q) +1 alteración adicional (mediana SG (IC 95%): 6,1 (4,3-7,9), 57,7 (33,6-81,8), 23,2 (7,3-39,0), respectivamente, $P < 0,001$) (Figura 28). Como se ha comentado anteriormente, el impacto pronóstico del cariotipo complejo en los SMD, ha sido ampliamente validado y confirmado por la clasificación citogenética del IPSS-R (Schanz et al., 2012),

que determinó dos pronósticos significativamente ($P < 0,01$) distintos en función del número de alteraciones, mal pronóstico 3 alteraciones o más de 3 alteraciones muy mal pronóstico (mediana de SG: 15,6 vs. 5,6, meses respectivamente). Generalmente los cariotipos complejos se asocian a una mayor inestabilidad genómica y a un mayor número de citopenias que disminuyen la vida del paciente (Haase et al., 2007; Schanz et al., 2012).

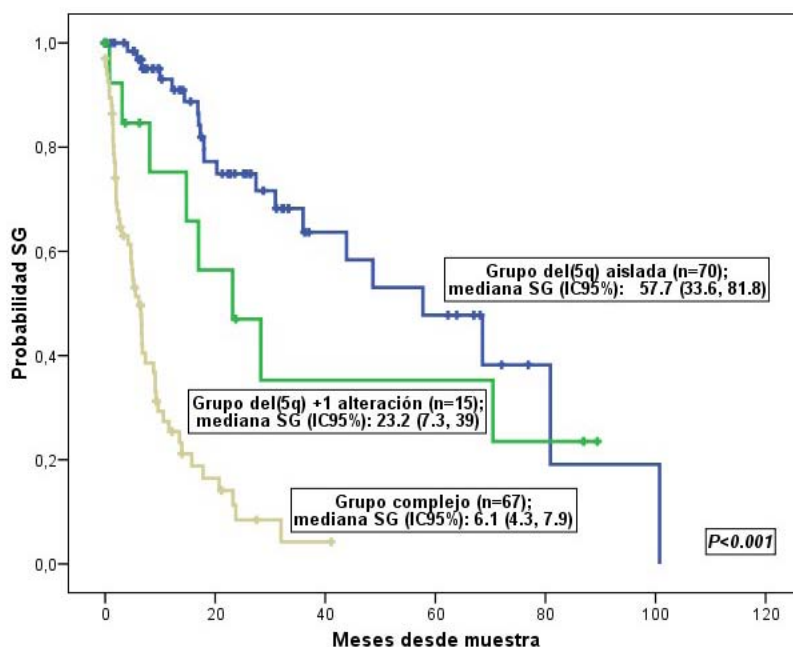


Figura 28_ Curva Kaplan-Meier de la SG en función de la situación de la del(5q), azul: del(5q) aislada, verde del(5q) + 1 alteración y amarillo del(5q) en un cariotipo complejo.

Respecto a los grupos del(5q) aislada y del(5q) +1 alteración adicional no se determinaron diferencias significativas entre los grupos respecto a la SG. De acuerdo con la clasificación citogenética del IPSS-R (Greenberg et al., 2012) los pacientes con dobles alteraciones con el 5q- [que no incluyen la del(7q)] no presentan una peor SG y se incluyen en el mismo grupo pronóstico (Buen pronóstico) que los pacientes con la del(5q) aislada. Estudios anteriores de Mallo y cols (Mallo et al., 2011), Holtan y cols (Holtan et al., 2008) y Haase y cols (Haase et al., 2007), tampoco

determinaron diferencias en la SG. Aun así, el estudio de Giagounidis y cols (Giagounidis et al., 2004b) determinó una peor SG en pacientes con 5q- y una alteración adicional, sin que ninguna de ellas fuera del cromosoma 7. En nuestro estudio los pacientes presentaron una miscelánea de alteraciones acompañantes (sólo un paciente involucró el cromosoma 7) y aunque la SG no fue significativamente diferente, los pacientes con una alteración adicional sí presentaron una estimación de la mediana de SG en meses inferior a los pacientes con del(5q) aislada. Realizamos una subclasificación a la clasificación de riesgo morfológico de la WHO 2008 (Swerdlow et al., 2008) y comparamos pacientes con SMD con del(5q) aislada, pacientes de bajo riesgo (CRDU, ARSA, CRDM) y pacientes de alto riesgo (AREB-1, AREB-2 y LMA), presentaron diferencias estadísticamente significativas en la SG, con una mediana de SG (IC 95%) de 80,9 (57,6-104,2), 28,3 (13,1-43,5) y 6,8 (4,6-9,0); ($P < 0,001$), meses respectivamente (Figura 29).

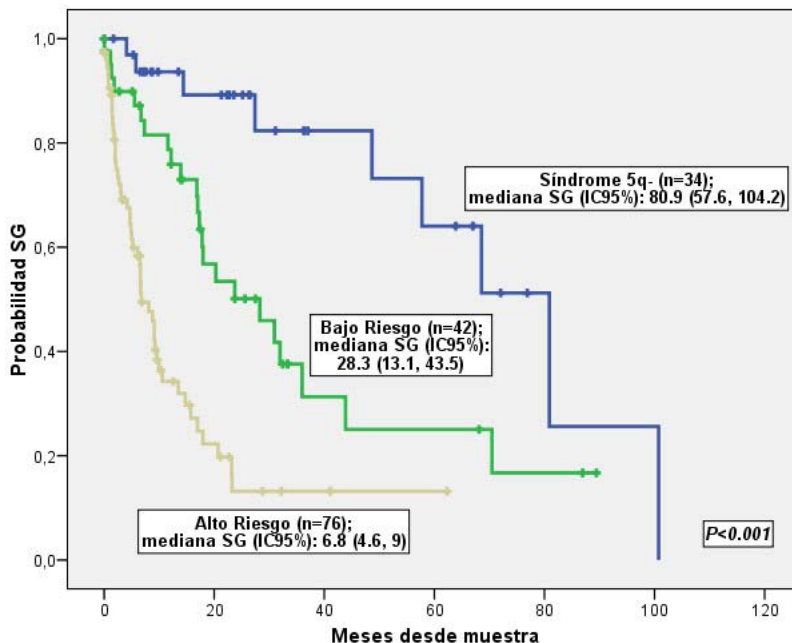


Figura 29_ Curva de la SG de casos con SMD con del(5q) aislada, pacientes de bajo riesgo (CRDU, ARSA, CRDM) y pacientes de alto riesgo (AREB-1, AREB-2 y LMA).

5.3.1 DELECCIÓN 5q Y SNP-A

Las alteraciones detectadas por CC tienen un papel muy importante en el diagnóstico y pronóstico de los SMD (Haase et al., 2007; Schanz et al., 2011, 2012) ya que la clasificación pronóstica depende de la presencia o ausencia de la ganancia o pérdida de ciertos cromosomas (Greenberg et al., 1997, 1998, 2012). Aunque la CC es la técnica más ampliamente utilizada, el estudio mediante SNP-A nos permite aumentar la resolución en la detección de alteraciones crípticas, así como en la definición de dichas alteraciones, en pacientes con SMD (Maciejewski et al., 2009; Tiu et al., 2011).

Si nos centramos en los pacientes con del(5q) aislada, la mayoría (67,6%) de los casos del(5q) aislada (n=25/37) no presentaron alteraciones adicionales mediante SNP-A, confirmando el bueno pronóstico de los pacientes con SMD y del(5q) aislada. Referente al resto de pacientes, los SNP-A mostraron alteraciones adicionales, 6 pacientes presentaron entre 2 y 3 alteraciones adicionales, 2 pacientes entre 6 y 9 alteraciones y 4 pacientes presentaron más de 10 alteraciones. Estos pacientes con alteraciones adicionales, presentaron una característica común, ninguno de ellos alcanzó las 20 metafases mediante CC, esto puede relacionarse con una baja ratio de división de las células displásicas que contienen las alteraciones, que a su vez puede deberse a la apoptosis incrementada que ha sido descrita en los SMD (Raza et al., 1995, 1996) o a la variabilidad en la proporción de células con alteraciones clonales y no clonales que pueden presentar diferente tasa de crecimiento (Makishima et al., 2010b). Determinar alteraciones acompañantes es importante ya que, aunque en la revisión de la clasificación del IPSS-R la del(5q) aislada y doble presenta el mismo pronóstico (Buen pronóstico), si estas se acompañan de otras alteraciones pasarían a formar parte del cariotipo complejo (Mal o Muy mal pronóstico) con una SG inferior y un incremento en el riesgo de progresión a LMA (Greenberg et al., 2012). Debido al bajo número de pacientes con alteraciones adicionales y datos de seguimiento no pudimos realizar el estudio de la SG.

Aunque los SNP-A nos permitieron detectar alteraciones adicionales,

actualmente la clasificación diagnóstica y pronóstica de los SMD no incluye técnicas que no sea la CC. La aplicación de los SNP-A en los cariotipos complejos, en nuestra serie de estudio, no tiene una aplicación tan directa en el pronóstico, ya que todos los pacientes presentaban más de 4 alteraciones, es decir presentaban un Muy mal pronóstico según la clasificación citogenética del IPSS-R (Greenberg et al., 2012; Schanz et al., 2012). Sin embargo sí nos permitieron definir cromosomas marcadores que no pudieron ser interpretados por CC, así como definir mejor los reordenamientos complejos. Un ejemplo lo tenemos en la monosomía 5, en el año 2011 Galván y cols (Galván et al., 2010) demostraron que la monosomía 5 detectada por CC raramente se podía confirmar mediante FISH en neoplasias mieloides y que, en realidad, escondía una del(5q) reordenada en un cariotipo complejo. En nuestra serie tampoco pudimos validar la monosomía 5 observada en un total de seis pacientes por CC y la add(5q) que detectamos en seis pacientes, todos ellos presentaban un cariotipo complejo. Mediante los SNP-A determinamos una delección intersticial del brazo q del cromosoma 5 reordenada dentro del cariotipo complejo.

La mayor resolución de los SNP-A también nos permitió redefinir los puntos de rotura en 5q. La CC determinó la banda 5q13 como la más frecuente de rotura proximal, que fue redefinida mediante los SNP-A en 5q14 para los grupos de estudio SMD con del(5q) aislada, del(5q) aislada y para la del(5q) más una alteración adicional, en cambio los pacientes con la del(5q) en un cariotipo complejo que presentaron mediante CC el inicio de la delección en 5q13, mediante SNP-A se definió en 5q14 (28%) y en 5q11 (27%), el resto de alteraciones mostraron correlación entre la CC y los SNP-A. Respecto a la región terminal, fue definida en 5q33 por ambas técnicas en el grupo SMD con del(5q) aislada, del(5q) aislada y del(5q) más una alteración adicional y en el cariotipo complejo con 5q- presentaron el mismo número de pacientes con la posición 5q33 y 5q35.

La definición de los puntos de rotura es importante desde dos puntos de vista, primero de acuerdo con el estudio realizado por Jerez y cols en 2012 (Jerez et al., 2012) en el que determinaron que las delecciones que

no involucraban los extremos de las regiones centromérica (5q14.2) y telomérica (5q31.2-5q31.3) se asociaban a un curso más indolente. En nuestra serie y como se puede observar en la Figura 30, los pacientes con del(5q) aislada y del(5q) con una alteración adicional presentaron una muy baja afectación tanto de la CRR1 como la CRR2 (8% y 10%, respectivamente), mientras que la del(5q) en el cariotipo complejo presentó un 46,6% de los casos con afectación en la CRR1 y un 50% de los casos con afectación en la CRR2. Una explicación es que los cariotipos complejos presentan una elevada inestabilidad genómica, que les permite acumular alteraciones cromosómicas a lo largo de los ciclos celulares, debido a esta permisividad y a la elevada inestabilidad se producen reordenamientos que afectan a grandes fragmentos de cromosomas. La deleción en 5q, presentó diferentes tamaños de pérdida, siendo de una mediana de 92,6Mb en el cariotipo complejo, de 70,3 Mb en la del(5q) más una alteración adicional y de 67,2Mb en la del(5q) aislada. Aunque el tamaño de la deleción no presentó un impacto en la SG, sí que presentó una relación significativa con el grupo de estudio, es decir, las pérdidas de mayor tamaño se relacionaron con los cariotipos complejos.

También es importante definir el punto de rotura de la deleción, para delimitar los genes implicados en la región delecionada. Las CDR son regiones ricas en genes, de los cuales algunos presentan una estrecha relación con la patogenicidad de los SMD y se vieron delecionados en nuestro estudio. Como ya se ha mencionado anteriormente la deleción 5q presenta dos regiones comúnmente delecionadas, la CDR1 (5q32-q33.2) en la que localizamos al gen RPS14 que produce un deterioro de la eritropoyesis pero que mantiene relativamente la megacariopoyesis (Ebert et al., 2008), los microARNs, miR-145 y miR-146 en 5q33, que pueden proporcionar una ventaja proliferativa del clon 5q- y causar un aumento en la cifra plaquetar (Kumar et al., 2011; Starczynowski et al., 2010) y *CSNK1A1* (5q32) que en modelos murinos con inactivación heterocigota de *Csnk1a1* causan la expansión de las células madre hematopoyéticas y la activación de β -catenina (Schneider et al., 2014). En la CDR2 (5q31.2-5q31.3) se localizan los genes *EGR1*, que incrementa

la renovación de células madre cuando una de las copias está delecionada (Joslin et al., 2007) y el gen *SPARC* (5q31.3q32) que en haploinsuficiencia incrementa la adhesión de las células (Boulton et al., 2002; Pellagatti et al., 2007). La afectación de *NPM1* en 5q35 se determinó sobretodo en casos de LMA y SMD de alto riesgo (Falini et al., 2005; Grisendi et al., 2005; Jerez et al., 2012). La implicación de los genes afectados en las CDRs afecta tanto a pacientes con SMD como LMA, por lo que parece que la deleción de todos estos genes presentarían un efecto fenotípico y que la interacción con otras alteraciones a lo largo del genoma podrían ser una de las explicaciones de las diferencias que detectamos entre los grupos de estudio.

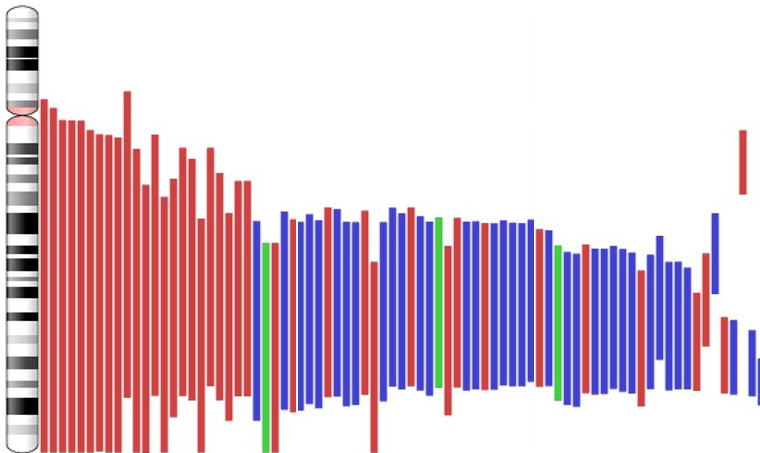


Figura 30_ Representación gráfica del cromosoma 5 y de las distintas deleciones determinadas mediante SNP-A (rojo: cariotipo complejo, azul: SMD con del(5q) aislada, verde: del(5q) con una alteración adicional).

5.3.2 ESTUDIOS MOLECULARES

En el año 2011 se publicó el estudio de Bejar y cols (Bejar et al., 2011b) en el que estudiaron 111 genes en 493 pacientes con SMD para determinar la implicación de estos genes (Figura 31) en la clasificación al diagnóstico de los pacientes con SMD así como la capacidad de estos genes para estratificar las diferentes subcategorías de acuerdo con el IPSS (Greenberg et al., 1997, 1998).

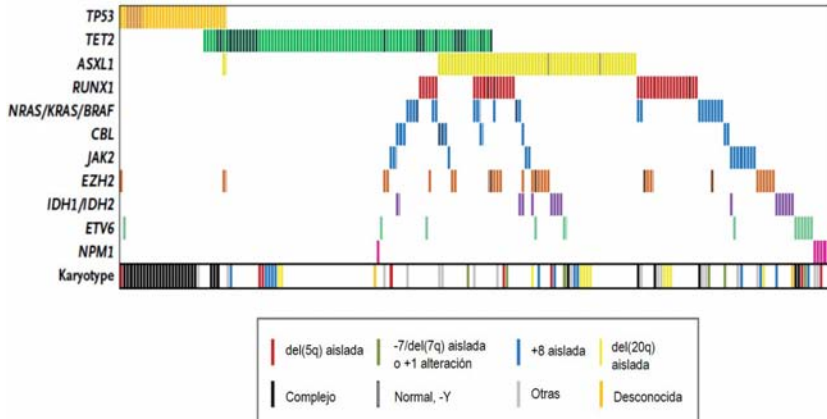


Figura 31_ Mutaciones y alteraciones citogenéticas en 223 muestras con al menos una mutación, figura adaptada de Bejar y cols (Bejar et al., 2011b).

Con este estudio Bejar y cols (Bejar et al., 2011b) determinaron el efecto clínico de mutaciones puntuales en los SMD y el potencial que presentan los datos moleculares para facilitar el diagnóstico, mejorar el pronóstico y evaluar el riesgo de progresión.

Las mutaciones más recurrentes (uniendo los resultados de WES y TruSeq) en nuestro estudio fueron: *TP53* (n=63), *DNMT3A* (n=23), *CSNK1A1* (n=6), *PRPF8* (n=13), *SF3B1* (n=16) y *ASXL1* (n=18). En el estudio de Fernandez-Mercado y cols (Fernandez-Mercado et al., 2013), aunque era un estudio de secuenciación dirigida, todos estos genes excepto *CSNK1A1* y *PRPF8* (ya que no formaban parte del panel de genes estudiados) se relacionaron con la del(5q). A continuación se discutirán los genes *DNMT3A*, *CSNK1A1*, *SF3B1* y *ASXL1*. Por otro lado la discusión sobre *TP53* se realizará más adelante y de manera más extensa debido a su relación con la falta de respuesta al tratamiento con lenalidomida.

Las mutaciones en *DNMT3A* han sido descritas en SMD y LMA asociadas a una peor SG, mayor riesgo de evolución a LMA y a una mayor edad (Lindsley and Ebert, 2013). Cuando estudiamos conjuntamente los resultados de NGS, pacientes con mutaciones en este gen presentaron una menor SG, y *DNMT3A* presentó una influencia independiente en

el análisis multivariado (HR (95%CI): 1,9 (1,02-3,5), $P=0,042$). Aun así no presentó ninguna asociación con el grupo de estudio, mutaciones en este gen, quedaron repartidas a lo largo de los 4 grupos, aunque la mayoría de mutaciones se detectaron en casos con cariotipo complejo, en el estudio de Fernandez-Mercado y cols (Fernandez-Mercado et al., 2013) tampoco determinaron una asociación con los SMD más avanzados, en ambos casos seguramente debido al bajo número de casos con *DNMT3A* mutado. Aun así nuestro estudio determinó un número más elevado de casos con mutaciones en *DNMT3A* en cariotipos con del(5q) aislada ($n=7$) que en el estudio de Fernandez-Mercado y cols ($n=2$) (Fernandez-Mercado et al., 2013). Recientemente se ha publicado una revisión sobre *DNMT3A* por Yang y cols (Yang et al., 2015) que concluyen que mutaciones en este gen se adquieren en etapas jóvenes de la vida que puede ir acumulándose a lo largo de los años, esto puede relacionarse con el estudio de Jaiswal y cols (Jaiswal et al., 2014) que detectan esta mutación en personas sin neoplasias hematológicas pero con una hematopoyesis clonal con este gen mutado. Nuestros datos no permiten relacionar las mutaciones con una edad avanzada. Aun así, uno de nuestros pacientes, que fue estudiado en el estadio de SMD y en el de LMA, dicha alteración ya estaba presente en el diagnóstico y se determinó también en el estadio de LMA. Mutaciones en *DNMT3A* no presentan una relación significativa con la edad pero si con el porcentaje de blastos en MO.

Las mutaciones en *CSNK1A1* han sido estudiadas por Heuser y cols (Heuser et al., 2015), en su estudio determinaron una frecuencia de mutación de 7,2% en pacientes con la del(5q) tanto SMD como LMA, en nuestra serie la frecuencia de mutación fue de 6,4% en pacientes con SMD y del(5q) aislada, pero no detectamos ningún caso con LMA y mutaciones en este gen. Además de obtener frecuencias parecidas, también coincidimos en la falta de mutaciones concurrentes entre *TP53* y *CSNK1A1*, y en la concurrencia con *ASXL1*. Respecto a la relación que determinan dichos autores (Heuser et al., 2015), entre la mutación y una mayor edad y una menor cifra de plaquetas, en nuestro estudio el número de casos mutados fue demasiado bajo para poder extraer

diferencias significativas entre los pacientes mutados y no mutados. Aun así, si se apunta una mayor edad y una cifra menor de plaquetas, pero no son valores significativos.

SF3B1 es el gen del spliceosoma más mutado en los SMD, afectando entre un 14-28% de los pacientes. Se relaciona con la presencia de SA y a una mayor SG y a una menor progresión a LMA (Papaemmanuil et al., 2011). De acuerdo con el estudio de Cazzola y cols (Cazzola et al., 2013) las mutaciones en genes relacionados con el *spliceosoma* se producirían en etapas iniciales de la enfermedad. En cinco de los casos con SF3B1 pudimos determinar el tamaño clonal y la alteración en SF3B1 fue en cuatro casos menor que el porcentaje de la del(5q) y en un caso que fue superior el porcentaje de SF3B1 al de la del(5q) fue menor que el de otros genes.

PRPF8 ha sido relacionado recientemente con los SMD de alto riesgo en el estudio de Kurtovic-Kozaric y cols (Kurtovic-Kozaric et al., 2015). En este mismo estudio relacionan mutaciones en este gen con SA hecho que no pudimos comprobar en nuestra serie y por su posición en 17p ha sido relacionado con TP53. Así en nuestra serie, dos casos que presentaban LMA y cariotipo complejo presentaron mutaciones en TP53 y PRPF8, confirmando la coocurrencia entre ambos genes y la presencia en pacientes de alto riesgo. Kurtovic-Kozaric y cols (Kurtovic-Kozaric et al., 2015).

ASXL1 presenta un papel crítico en la remodelación de la cromatina actuando como modificadores de histonas o metilando el ADN. Las mutaciones en ASXL1 se han asociado a una peor SG con los SMD independientemente de otros parámetros clínicos (Bejar et al., 2011a, 2011b). En nuestra serie la mayoría de mutaciones se concentraron en el grupo con cariotipo complejo. Este gen también se ha relacionado con la edad de acuerdo con el estudio de Jaiswal y cols (Jaiswal et al., 2014). Si tenemos sólo en cuenta los pacientes estudiados por WES sí se determina una diferencia significativa entre la edad de los pacientes, esta relación no se mantiene cuando añadimos los casos estudiados por TruSeq. Además dos pacientes fueron estudiados al diagnóstico y

durante el tratamiento con lenalidomida y el otro en evolución. Al diagnóstico ninguno de los dos presentó mutación en *ASXL1* que sí presentaron en la segunda muestra estudiada, con lo cual creemos que las mutaciones en este gen, en nuestros casos se relacionan con la enfermedad y no con la edad de los pacientes.

5.3.2 DELECCIÓN 5q, MUTACIONES EN TP53 Y RESPUESTA A LA LENALIDOMIDA

En 2006 List y cols (List et al., 2006) presentaron los resultados del ensayo clínico (*MDS-001, NCT00065156*) en el que estudiaron la efectividad de la lenalidomida¹ demostrando su efectividad en pacientes con SMD con del(5q) aislada con tasas de respuesta de alrededor de 70%-80% (List et al., 2006) y una tasa de respuesta del 12% en pacientes con una alteración adicional (Komrokji and List, 2011) y de un 26% en pacientes con un cariotipo complejo (Komrokji and List, 2011).

En nuestro estudio un total de 38 pacientes fueron tratados con lenalidomida al diagnóstico, 27 pacientes con del(5q) aislada, 5 pacientes con una alteración adicional y 6 pacientes con cariotipo complejo. La tasa de respuesta fue del 60,5% (23 respondedores vs. 14 no respondedores). Los resultados concuerdan con lo descrito en el estudio de List y cols (List et al., 2006). Actualmente, el mecanismo de acción de la lenalidomida no está totalmente definido y sigue siendo motivo de estudio, pero sí se relaciona la buena respuesta de estos pacientes con la haploinsuficiencia de algunos genes localizados en la del(5q).

Gracias a la aplicación de la técnica de SNP-A, pudimos definir mejor los puntos de rotura en la del(5q) y así, determinar que en todos nuestros pacientes los genes localizados en las CDR estaban deletados. La lenalidomida induce la sobreexpresión del gen supresor de tumores *SPARC* y *TGFβ* en las células progenitoras hematopoyéticas con del(5q), de manera que promueve la apoptosis.

¹ Lenalidomida está aprobada para el tratamiento de pacientes con SMD, IPSS Bajo o intermedio-1 (Greenberg et al., 1997, 1998), dependencia transfusional y la delección 5q aislada por la EMA (European Medicines Agency) o para pacientes con dicha delección con o sin otras alteraciones por la FDA (Food and Drug Administration).

La haploinsuficiencia en *RPS14* (Figura 32) produce una biogénesis ribosomal defectuosa que produce una liberación nuclear de proteínas ribosomales que se unen a MDM2A e inducen su autoubiquitinización, de manera que no puede unirse a p53 (que se acumula en los precursores eritroides) y por lo tanto se produce la apoptosis celular. La lenalidomida inhibe la autoubiquitinización de MDM2 mediante la hiperfosforilación (mediada por PP2A) restaurando la funcionalidad en el SMD con del(5q) aislada, de manera que rescata la activación de p53 en respuesta al estrés ribosomal.

Wei y cols (Wei et al., 2013) demostraron que la lenalidomida era selectivamente citotóxica en las células con la del(5q) ya que produce una inhibición directa e indirecta de las fosfatasa haploinsuficientes, PP2A y CDC25. En condiciones normales, PP2A defosforila CDC25 de manera que la célula puede entrar en el ciclo celular y dividirse. Cuando se produce la haploinsuficiencia de PP2A no puede defosforilar CDC25 y la célula queda arrestada en G2/M y eso conduce a la apoptosis de la célula. La lenalidomida inhibe directamente CDC25 por lo que inhibe indirectamente PP2A, y esto se traduce en un arresto del ciclo en G2 y por lo tanto en apoptosis, células haploinsuficientes serán más sensibles al efecto de la lenalidomida.

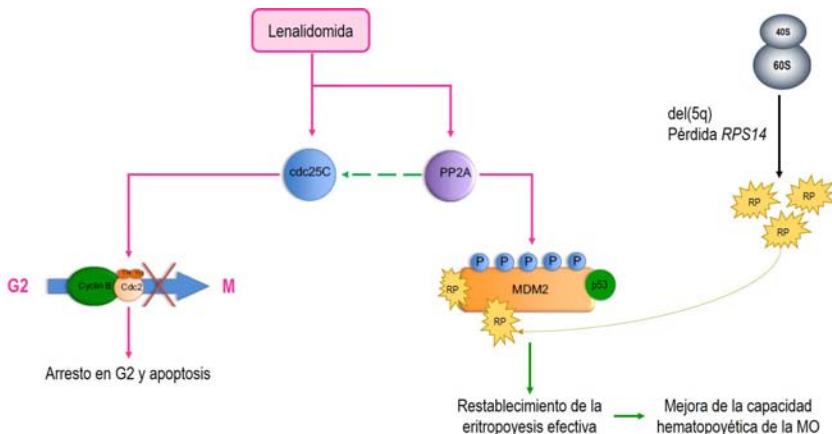


Figura 32_ Esquema de la haploinsuficiencia de RPS14, PP2A y CDC25. Adaptado de Sallman y cols (Sallman et al., 2014).

La haploinsuficiencia de *CSNK1A1* (Figura 33) ha sido descrita recientemente por Schneider y cols (Schneider et al., 2014) determinando que en condiciones normales, *CSNK1A1* regula negativamente los niveles proteicos de p53 y β -catenina por su interacción con MDM2A y β -catenina. En haploinsuficiencia los niveles de β -catenina incrementan de manera que se produce una dominancia clonal que contribuye a la patogénesis de la enfermedad. En homocigosis produce la inducción de p53 y la muerte de las células hematopoyéticas. Krönke y cols (Krönke et al., 2015) han descrito que la actividad de la lenalidomida induce la degradación de *CSNK1A1* por debajo de los valores de la haploinsuficiencia de manera que se induce la actividad de p53 y la inhibición del crecimiento.

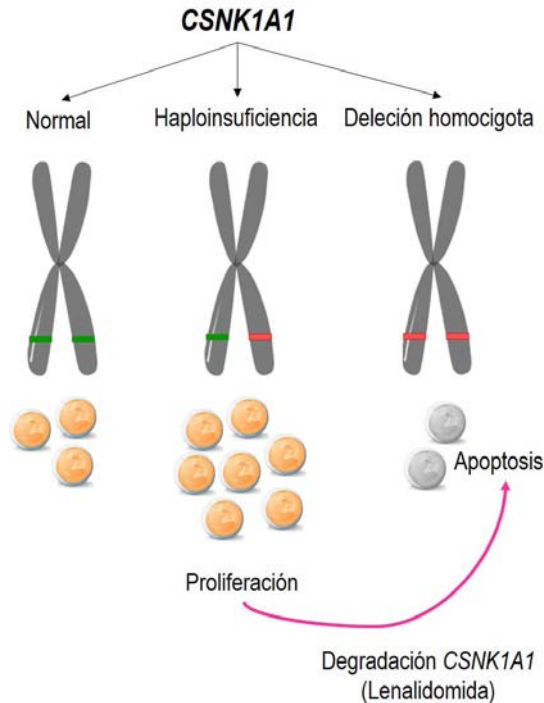


Figura 33_ Esquema de la actividad de *CSNK1A1* adaptado de Schneider y cols (Schneider et al., 2014) (en verde *CSNK1A1* no mutado y en rojo *CSNK1A1* mutado)

La resistencia o falta de respuesta a la lenalidomida se ha relacionado a mutaciones en *TP53*. Las mutaciones en este gen son frecuentes en

los SMD (5%-12%), sobretodo se detectan en pacientes con del(5q) y cariotipos complejos (Bejar et al., 2011b). En nuestra serie un 28% (n=63/228) de los pacientes presentaron mutaciones en *TP53*, de los que el 94% eran pacientes con un cariotipo complejo, los pacientes que presentaron clasificación de la WHO 2008 (Swerdlow et al., 2008), 25 presentaban un SMD de alto riesgo (AREB tipo 1 y 2), 10 presentaban una LMA secundaria a SMD y 12 una LMA de novo. Las mutaciones se observaron preferentemente en pacientes con cariotipo complejo (n=59), una mutación fue descrita en el grupo del(5q) aislada y 3 mutaciones en del(5q) con una alteración acompañante. La SG de los pacientes con *TP53* mutado fue significativamente inferior que los pacientes sin la mutación (mediana de SG, 7,3 (2,3-12,4) vs. 23.7 (12,5-35,0), $P<0,001$; meses respectivamente), con lo que pudimos establecer una relación entre la mutación y una peor SG, aun así y debido a la elevada correlación de *TP53* y el cariotipo complejo, en el análisis multivariado el cariotipo complejo fue el que retuvo la influencia en la SG (HR (95%CI): 5 (2,3, 10,9), $P<0,001$).

Las mutaciones en *TP53* son de especial interés en los pacientes con del(5q), ya que se han relacionado con la resistencia o falta de respuesta a la lenalidomida. Jädersten y cols (Jädersten et al., 2011) demostraron que los clones con *TP53* incrementan de manera gradual con la evolución de la enfermedad, ya que serían clones resistentes a la lenalidomida. Ocho de los 10 pacientes con mutación en *TP53* recibieron tratamiento con lenalidomida, y observaron una tendencia a un mayor riesgo de progresión a LMA y una menor respuesta a la lenalidomida. En nuestro estudio, un único paciente con SMD y del(5q) aislada presentó mutación en *TP53* pero no fue tratado con lenalidomida. En relación a los pacientes con del(5q) y una alteración adicional, uno de los pacientes fue tratado con lenalidomida y respondió al tratamiento durante 2 años, pero perdió la respuesta y evolucionó, este resultado concuerda con la tendencia observada por Jädersten y cols (Jädersten et al., 2011). Aun así, el número de casos de los que disponemos nos hace imposible determinar cualquier relación entre *TP53* y la respuesta o no a la lenalidomida.

En este estudio hemos podido determinar la elevada heterogeneidad que presentan los pacientes con del(5q) y aunque no hayamos podido definir un perfil molecular para la del(5q) sí que hemos podido detectar 6 genes que parecen relacionarse con la del(5q). Entre ellos destacan *CSNK1A1*, *TP53* y *DNMT3A*. Estudios mutacionales iniciales que nos permitan determinar mutaciones en *CSNK1A1*, nos pueden ayudar a predecir una mejor respuesta a la lenalidomida. En cambio, pacientes con *TP53* mutado deberían tenerse en cuenta por su relación con un peor pronóstico y con una peor respuesta al tratamiento con lenalidomida. Ya por último, *DNMT3A* ha demostrado tener un impacto pronóstico independiente en nuestros pacientes con del(5q) con lo que futuros estudios pueden ayudar a describir mejor esta relación.

CONCLUSIONS

“There are far better things ahead than any we have behind”
C.S. Lewis

6 CONCLUSIONS / CONCLUSIONES

1_ The monosomal karyotype study in MDS patients indicates

1.1_ MK does not have an independent impact on the OS in patients with MDS and CK. However, MK without CK display a worse OS in the univariate analysis. This impact is lost when this variant is included into the multivariate analysis. The influence of CK on the OS MK patients is statistically significant in both univariate and multivariate analyses.

1.2_ Monosomies of chromosomes 5 and/or 7 had an independent impact on the OS in patients with MK compared to other affected chromosomes.

1.3_ Karyotype complexity has a statistically significance on the OS and risk of AML progression, being patients with more alterations the ones with worse outcome (less OS and increased risk of AML progression).

2_ FISH 7q study in patients with normal cytogenetics or without monosomy 7 or 7q deletion detected by conventional cytogenetics (CC), demonstrate:

2.1_ A total of 5.2% positive cases were detected by 7q FISH technique. A greater part of positive cases were detected when there was a low number of metaphases analyzed or unsuccessful CC study.

2.2_ In patients with intermediate morphologic risk, the application of FISH 7q allowed us to differentiate two groups with different OS, being worse for patients with -7 or del(7q) detected by FISH. It would be recommendable to perform FISH 7q in this group of patients.

2.3_ FISH 7q should be mandatory when clonality does not fulfill the established criteria by CC.

3_ The application of SNP-A and Next generation sequencing technology in patients with del(5q) helped to determine:

3.1_ Related to SNP-A technique:

3.1.1. SNP arrays enable to better define the proximal break point at 5q14 and the terminal breakpoint at 5q33.

- 3.1.2. The size of the CDR is larger in patients with complex karyotypes rather than in patients with isolated del(5q) and del(5q) + 1 alteration.
- 3.1.3. In 32.4% of patients with isolated del(5q), additional alterations were determined by SNP-A.
- 3.1.4. In patients with complex karyotype, SNP-A elucidate complex rearrangements, and explains that monosomy 5 masks multiple rearrangements involving chromosome 5.

- 3.2_ Next-Generation Sequencing technology allowed us to illustrate
 - 3.2.1. Top six mutated genes: *TP53*, *DNMT3A*, *CSNK1A1*, *PRPF8*, *SF3B1* and *ASXL1*.
 - 3.2.2. High molecular heterogeneity included in del(5q) patients whether isolated or with other alterations.
- 3.3_ Relation between clinical and Next-Generation Sequencing findings:
 - 3.3.1. *DNMT3A* and complex karyotype have a statistically significant negative impact on the OS of the studied patients, on the multivariate analysis.
 - 3.3.2. *TP53* had an statistically significant negative impact on the OS on the univariate analysis.

1_ El estudio del cariotipo monosómico en pacientes con SMD muestra que:

- 1.1_ El MK no presenta una influencia independiente en la SG en pacientes con SMD y cariotipo complejo. Sin embargo, en el análisis univariado el MK sin el contexto de un CK presenta una peor SG, esta influencia se pierde en el análisis multivariado. Por otra parte la influencia en la SG del CK en pacientes con MK si es estadísticamente significativa, tanto en el análisis univariado como multivariado.
- 1.2_ Las monosomías 5 y/o 7 presentan una influencia independiente en la SG en pacientes con MK comparado con la afectación de otros cromosomas.
- 1.3_ La complejidad del cariotipo presenta, en el análisis multivariado,

una relación significativa independiente en la evolución del paciente (peor SG y mayor riesgo de progresión a LMA).

2_ El estudio mediante FISH de 7q en pacientes con citogenética normal o sin monosomía 7 o deleción(7q) mediante CC nos ha permitido observar:

2.1_ Se detectaron un total de 5,2% de casos positivos por la técnica de FISH 7q. La mayoría de los casos positivos se detectaron en pacientes con un bajo número de metafases estudiadas o con una CC no informativa.

2.2_ En pacientes con riesgo morfológico intermedio, la aplicación de la técnica de FISH 7q permite diferenciar dos grupos con diferencias significativas en la SG, siendo el grupo con -7 o 7q- mediante FISH el de peor pronóstico. En estos casos sería recomendable aplicar esta técnica.

2.3_ La aplicación del FISH sería extremadamente recomendable en esos casos que requieren confirmación de la clonalidad citogenética.

3_ El estudio mediante SNP-Arrays y Next-Generation Sequencing de pacientes con la del(5q) nos ha permitido determinar:

3.1_ La técnica de SNP-A nos permite:

- 3.1.1. Definir con mayor precisión el punto de rotura proximal en 5q14 y en el punto de rotura terminal en 5q33.
- 3.1.2. Determinar un tamaño mayor de la CDR en pacientes con un cariotipo complejo, que en pacientes con del(5q) aislada o pacientes con del(5q)+ 1 alteración.
- 3.1.3. Detectar alteraciones adicionales en un 32.4% de los pacientes con del(5q) aislada.
- 3.1.4. En pacientes con cariotipo complejo, los SNP-A definen mejor las anomalías complejas, y explican que la monosomía 5 enmascara múltiples reordenamientos que involucran el cromosoma 5.

3.2_ La aplicación de las técnicas de *Next-generation sequencing* nos permiten:

- 3.2.1. Determinar un *top 6* de genes: *TP53*, *DNMT3A*, *CSN K1A1*, *PRPF8*, *SF3B1* y *ASXL1*.
- 3.2.2. Determinar una elevada heterogeneidad molecular en los pacientes con del(5q) tanto aislada como acompañada de otras alteraciones citogenéticas.

3.3_ Relación clínico patológica con las alteraciones de *Next-generation sequencing*

- 3.3.1. *DNMT3A* y el cariotipo complejo presentaron una influencia negativa estadísticamente significativa en la SG de los pacientes estudiados, en el análisis multivariado.
- 3.3.2. *TP53* presentó una influencia negativa estadísticamente significativa en la SG de los pacientes en el análisis univariado.

BIBLIOGRAFÍA

“La ciencia no solo es una disciplina de razón, sino también de romance y pasión”

Stephen Hawking

7 BIBLIOGRAFIA

Adès, L., Itzykson, R., and Fenaux, P. (2014). Myelodysplastic syndromes. *Lancet Lond. Engl.* 383, 2239–2252.

Aksoy, M., Ozeriř, S., Sabuncu, H., Inanici, Y., and Yanardağ, R. (1987). Exposure to benzene in Turkey between 1983 and 1985: a haematological study on 231 workers. *Br. J. Ind. Med.* 44, 785–787.

Anastasi, J., Feng, J., Le Beau, M.M., Larson, R.A., Rowley, J.D., and Vardiman, J.W. (1993). Cytogenetic clonality in myelodysplastic syndromes studied with fluorescence in situ hybridization: lineage, response to growth factor therapy, and clone expansion. *Blood* 81, 1580–1585.

Asou, H., Matsui, H., Ozaki, Y., Nagamachi, A., Nakamura, M., Aki, D., and Inaba, T. (2009). Identification of a common microdeletion cluster in 7q21.3 subband among patients with myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 383, 245–251.

Aul, C., Gattermann, N., and Schneider, W. (1992). Age-related incidence and other epidemiological aspects of myelodysplastic syndromes. *Br. J. Haematol.* 82, 358–367.

Aul, C., Gattermann, N., Germing, U., Runde, V., Heyll, A., and Schneider, W. (1994). Risk assessment in primary myelodysplastic syndromes: validation of the Düsseldorf score. *Leukemia* 8, 1906–1913.

Barcellos-Hoff, M.H., Park, C., and Wright, E.G. (2005). Radiation and the microenvironment - tumorigenesis and therapy. *Nat. Rev. Cancer* 5, 867–875.

Barlow, J.L., Drynan, L.F., Hewett, D.R., Holmes, L.R., Lorenzo-Abalde, S., Lane, A.L., Jolin, H.E., Pannell, R., Middleton, A.J., Wong, S.H., et al. (2010). A p53-dependent mechanism underlies macrocytic anemia in a mouse model of human 5q- syndrome. *Nat. Med.* 16, 59–66.

Le Beau, M.M., Espinosa, R., Davis, E.M., Eisenbart, J.D., Larson, R.A., and Green, E.D. (1996). Cytogenetic and molecular delineation of a region of chromosome 7 commonly deleted in malignant myeloid diseases. *Blood* 88, 1930–1935.

Bejar, R. (2015). Myelodysplastic Syndromes Diagnosis: What Is the Role of Molecular Testing? *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 10, 282–291.

Bejar, R., and Abdel-Wahab, O. (2013). The importance of subclonal genetic events in MDS. *Blood* 122, 3550–3551.

Bejar, R., Levine, R., and Ebert, B.L. (2011a). Unraveling the molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 29, 504–515.

Bejar, R., Stevenson, K., Abdel-Wahab, O., Galili, N., Nilsson, B., Garcia-Manero, G., Kantarjian, H., Raza, A., Levine, R.L., Neuberg, D., et al. (2011b). Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N. Engl. J. Med.* 364, 2496–2506.

Bejar, R., Stevenson, K.E., Caughey, B., Lindsley, R.C., Mar, B.G., Stojanov, P., Getz, G., Steensma, D.P., Ritz, J., Soiffer, R., et al. (2014). Somatic mutations predict poor outcome in patients with myelodysplastic syndrome after hematopoietic stem-cell transplantation. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 32, 2691–2698.

Belli, C.B., Bengiό, R., Aranguren, P.N., Sakamoto, F., Flores, M.G., Watman, N., Nucifora, E., Prates, M.V., Arbelbide, J., and Larripa, I. (2011). Partial and total monosomal karyotypes in myelodysplastic syndromes: comparative prognostic relevance among 421 patients. *Am. J. Hematol.* 86, 540–545.

Bench, A.J., Nacheva, E.P., Hood, T.L., Holden, J.L., French, L., Swanton, S., Champion, K.M., Li, J., Whittaker, P., Stavrides, G., et al. (2000). Chromosome 20 deletions in myeloid malignancies: reduction of the common deleted region, generation of a PAC/BAC contig and identifi-

cation of candidate genes. UK Cancer Cytogenetics Group (UKCCG). *Oncogene* 19, 3902–3913.

Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R., and Sultan, C. (1982). Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br. J. Haematol.* 51, 189–199.

Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H., Sultan, C., and Cox, C. (1994). The chronic myeloid leukaemias: guidelines for distinguishing chronic granulocytic, atypical chronic myeloid, and chronic myelomonocytic leukaemia. Proposals by the French-American-British Cooperative Leukaemia Group. *Br. J. Haematol.* 87, 746–754.

Bentley, D.R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H.P., Smith, G.P., Milton, J., Brown, C.G., Hall, K.P., Evers, D.J., Barnes, C.L., Bignell, H.R., et al. (2008). Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 456, 53–59.

Beran, M., Shen, Y., Kantarjian, H., O'Brien, S., Koller, C.A., Giles, F.J., Cortes, J., Thomas, D.A., Faderl, S., Despa, S., et al. (2001). High-dose chemotherapy in high-risk myelodysplastic syndrome: covariate-adjusted comparison of five regimens. *Cancer* 92, 1999–2015.

Van den Berghe, H., Cassiman, J.J., David, G., Fryns, J.P., Michaux, J.L., and Sokal, G. (1974). Distinct haematological disorder with deletion of long arm of no. 5 chromosome. *Nature* 251, 437–438.

Bernasconi, P., Cavigliano, P.M., Boni, M., Calatroni, S., Klersy, C., Giardini, I., Rocca, B., Crosetto, N., Caresana, M., Lazzarino, M., et al. (2003). Is FISH a relevant prognostic tool in myelodysplastic syndromes with a normal chromosome pattern on conventional cytogenetics? A study on 57 patients. *Leukemia* 17, 2107–2112.

Birren, B.W., Tachi-iri, Y., Kim, U.J., Nguyen, M., Shizuya, H., Korenberg,

J.R., and Simon, M.I. (1996). A human chromosome 22 fosmid resource: mapping and analysis of 96 clones. *Genomics* 34, 97–106.

Bjorkman, S.E. (1956). Chronic refractory anemia with sideroblastic bone marrow; a study of four cases. *Blood* 11, 250–259.

Block, M., Jacobson, L.O., and Bethard, W.F. (1953). Preleukemic acute human leukemia. *J. Am. Med. Assoc.* 152, 1018–1028.

Boultonwood, J. (2011). The role of haploinsufficiency of RPS14 and p53 activation in the molecular pathogenesis of the 5q- syndrome. *Pediatr. Rep.* 3 Suppl 2, e10.

Boultonwood, J. (2013). CUX1 in leukemia: dosage matters. *Blood* 121, 869–871.

Boultonwood, J., Lewis, S., and Wainscoat, J.S. (1994). The 5q-syndrome. *Blood* 84, 3253–3260.

Boultonwood, J., Fidler, C., Strickson, A.J., Watkins, F., Gama, S., Kearney, L., Tosi, S., Kasprzyk, A., Cheng, J.-F., Jaju, R.J., et al. (2002). Narrowing and genomic annotation of the commonly deleted region of the 5q-syndrome. *Blood* 99, 4638–4641.

Boultonwood, J., Pellagatti, A., Cattani, H., Lawrie, C.H., Giagounidis, A., Malcovati, L., Della Porta, M.G., Jädersten, M., Killick, S., Fidler, C., et al. (2007). Gene expression profiling of CD34+ cells in patients with the 5q- syndrome. *Br. J. Haematol.* 139, 578–589.

Boultonwood, J., Pellagatti, A., McKenzie, A.N.J., and Wainscoat, J.S. (2010). Advances in the 5q- syndrome. *Blood* 116, 5803–5811.

Bouwman, P., and Jonkers, J. (2012). The effects of deregulated DNA damage signalling on cancer chemotherapy response and resistance. *Nat. Rev. Cancer* 12, 587–598.

Bowen, D., Culligan, D., Jowitt, S., Kelsey, S., Mufti, G., Oscier, D., Parker, J., and UK MDS Guidelines Group (2003). Guidelines for the diagnosis and therapy of adult myelodysplastic syndromes. *Br. J. Haematol.* 120, 187–200.

Bozic, I., Antal, T., Ohtsuki, H., Carter, H., Kim, D., Chen, S., Karchin, R., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Nowak, M.A. (2010). Accumulation of driver and passenger mutations during tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 18545–18550.

Breccia, M., Carmosino, I., Biondo, F., Mancini, M., Russo, E., Latagliata, R., and Alimena, G. (2006). Usefulness and prognostic impact on survival of WHO reclassification in FAB low risk myelodysplastic syndromes. *Leuk. Res.* 30, 178–182.

Breems, D.A., Van Putten, W.L.J., De Greef, G.E., Van Zelderen-Bhola, S.L., Gerssen-Schoorl, K.B.J., Mellink, C.H.M., Nieuwint, A., Jotterand, M., Hagemeijer, A., Beverloo, H.B., et al. (2008). Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26, 4791–4797.

Buesche, G., Teoman, H., Wilczak, W., Ganser, A., Hecker, H., Wilkens, L., Göhring, G., Schlegelberger, B., Bock, O., Georgii, A., et al. (2008). Marrow fibrosis predicts early fatal marrow failure in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 22, 313–322.

Cairo, M.S., Jordan, C.T., Maley, C.C., Chao, C., Melnick, A., Armstrong, S.A., Shlomchik, W., Molldrem, J., Ferrone, S., Mackall, C., et al. (2010). NCI first International Workshop on the biology, prevention, and treatment of relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: report from the committee on the biological considerations of hematological relapse following allogeneic stem cell transplantation unrelated to graft-versus-tumor effects: state of the science. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 16, 709–728.

Cardis, E., Vrijheid, M., Blettner, M., Gilbert, E., Hakama, M., Hill, C., Howe, G., Kaldor, J., Muirhead, C.R., Schubauer-Berigan, M., et al. (2005). Risk of cancer after low doses of ionising radiation: retrospective cohort study in 15 countries. *BMJ* 331, 77.

Cazzola, M., and Malcovati, L. (2010). Prognostic classification and risk assessment in myelodysplastic syndromes. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 24, 459–468.

Cazzola, M., Invernizzi, R., Bergamaschi, G., Levi, S., Corsi, B., Travaglino, E., Rolandi, V., Biasiotto, G., Drysdale, J., and Arosio, P. (2003). Mitochondrial ferritin expression in erythroid cells from patients with sideroblastic anemia. *Blood* 101, 1996–2000.

Cazzola, M., Malcovati, L., and Invernizzi, R. (2011a). Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Hematol. Educ. Program Am. Soc. Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program 2011*, 264–272.

Cazzola, M., Della Porta, M.G., Travaglino, E., and Malcovati, L. (2011b). Classification and prognostic evaluation of myelodysplastic syndromes. *Semin. Oncol.* 38, 627–634.

Cazzola, M., Della Porta, M.G., and Malcovati, L. (2013). The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. *Blood* 122, 4021–4034. Cherry, A.M., Brockman, S.R., Paternoster, S.F., Hicks, G.A., Neubergh, D., Higgins, R.R., Bennett, J.M., Greenberg, P.L., Miller, K., Tallman, M.S., et al. (2003). Comparison of interphase FISH and metaphase cytogenetics to study myelodysplastic syndrome: an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) study. *Leuk. Res.* 27, 1085–1090.

Cheson, B.D., Greenberg, P.L., Bennett, J.M., Lowenberg, B., Wijermans, P.W., Nimer, S.D., Pinto, A., Beran, M., de Witte, T.M., Stone, R.M., et al. (2006). Clinical application and proposal for modification of the International Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia. *Blood* 108, 419–425.

Christiansen, D.H., Andersen, M.K., and Pedersen-Bjergaard, J. (2004). Mutations of AML1 are common in therapy-related myelodysplasia following therapy with alkylating agents and are significantly associated with deletion or loss of chromosome arm 7q and with subsequent leukemic transformation. *Blood* 104, 1474–1481.

Cordoba, I., Gonzalez-Porras, J.R., Such, E., Nomdedeu, B., Luño, E., de Paz, R., Carbonell, F., Vallespi, T., Ardanaz, M., Ramos, F., et al. (2012). The degree of neutropenia has a prognostic impact in low risk myelodysplastic syndrome. *Leuk. Res.* 36, 287–292.

Corey, S.J., Minden, M.D., Barber, D.L., Kantarjian, H., Wang, J.C.Y., and Schimmer, A.D. (2007). Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. *Nat. Rev. Cancer* 7, 118–129.

Crawford, J., Cella, D., Cleeland, C.S., Cremieux, P.-Y., Demetri, G.D., Sarokhan, B.J., Slavin, M.B., and Glaspy, J.A. (2002). Relationship between changes in hemoglobin level and quality of life during chemotherapy in anemic cancer patients receiving epoetin alfa therapy. *Cancer* 95, 888–895.

Czader, M., and Orazi, A. (2009). Therapy-related myeloid neoplasms. *Am. J. Clin. Pathol.* 132, 410–425.

Daids, M.S., and Steensma, D.P. (2010). The molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Cancer Biol. Ther.* 10, 309–319.

Deeg, H.J., Scott, B.L., Fang, M., Shulman, H.M., Gyurkocza, B., Myerson, D., Pagel, J.M., Platzbecker, U., Ramakrishnan, A., Radich, J.P., et al. (2012). Five-group cytogenetic risk classification, monosomal karyotype, and outcome after hematopoietic cell transplantation for MDS or acute leukemia evolving from MDS. *Blood* 120, 1398–1408.

Della Porta, M.G., Malcovati, L., Boveri, E., Travaglino, E., Pietra, D., Pascutto, C., Passamonti, F., Invernizzi, R., Castello, A., Magrini, U., et

al. (2009). Clinical relevance of bone marrow fibrosis and CD34-positive cell clusters in primary myelodysplastic syndromes. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27, 754–762.

Della Porta, M.G., Malcovati, L., Strupp, C., Ambaglio, I., Kuendgen, A., Zipperer, E., Travaglino, E., Invernizzi, R., Pascutto, C., Lazzarino, M., et al. (2011). Risk stratification based on both disease status and extra-hematologic comorbidities in patients with myelodysplastic syndrome. *Haematologica* 96, 441–449.

Deschler, B., de Witte, T., Mertelsmann, R., and Lübbert, M. (2006). Treatment decision-making for older patients with high-risk myelodysplastic syndrome or acute myeloid leukemia: problems and approaches. *Haematologica* 91, 1513–1522.

Döhner, K., Brown, J., Hehmann, U., Hetzel, C., Stewart, J., Lowther, G., Scholl, C., Fröhling, S., Cuneo, A., Tsui, L.C., et al. (1998). Molecular cytogenetic characterization of a critical region in bands 7q35-q36 commonly deleted in malignant myeloid disorders. *Blood* 92, 4031–4035.

Drabick, J.J., Davis, B.J., and Byrd, J.C. (2001). Concurrent pernicious anemia and myelodysplastic syndrome. *Ann. Hematol.* 80, 243–245.

Ebert, B.L. (2010). Genetic deletions in AML and MDS. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 23, 457–461.

Ebert, B.L. (2011). Molecular dissection of the 5q deletion in myelodysplastic syndrome. *Semin. Oncol.* 38, 621–626.

Ebert, B.L., Pretz, J., Bosco, J., Chang, C.Y., Tamayo, P., Galili, N., Raza, A., Root, D.E., Attar, E., Ellis, S.R., et al. (2008). Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature* 451, 335–339.

Elyada, E., Pribluda, A., Goldstein, R.E., Morgenstern, Y., Brachya, G., Cojocaru, G., Snir-Alkalay, I., Burstain, I., Haffner-Krausz, R., Jung, S., et al. (2011). CK1 α ablation highlights a critical role for p53 in invasive-

ness control. *Nature* 470, 409–413.

Ernst, T., Chase, A.J., Score, J., Hidalgo-Curtis, C.E., Bryant, C., Jones, A.V., Waghorn, K., Zoi, K., Ross, F.M., Reiter, A., et al. (2010). Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene *EZH2* in myeloid disorders. *Nat. Genet.* 42, 722–726.

Estey, E. (2007). Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in older patients. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 25, 1908–1915.

Estey, E.H., Thall, P.F., Cortes, J.E., Giles, F.J., O'Brien, S., Pierce, S.A., Wang, X., Kantarjian, H.M., and Beran, M. (2001). Comparison of idarubicin + ara-C-, fludarabine + ara-C-, and topotecan + ara-C-based regimens in treatment of newly diagnosed acute myeloid leukemia, refractory anemia with excess blasts in transformation, or refractory anemia with excess blasts. *Blood* 98, 3575–3583.

Falini, B., Mecucci, C., Tiacci, E., Alcalay, M., Rosati, R., Pasqualucci, L., La Starza, R., Diverio, D., Colombo, E., Santucci, A., et al. (2005). Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N. Engl. J. Med.* 352, 254–266.

Fang, S., Jensen, J.P., Ludwig, R.L., Vousden, K.H., and Weissman, A.M. (2000). Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J. Biol. Chem.* 275, 8945–8951.

Fenaux, P., and Rose, C. (2009). Impact of iron overload in myelodysplastic syndromes. *Blood Rev.* 23 Suppl 1, S15–19.

Fenaux, P., Mufti, G.J., Hellstrom-Lindberg, E., Santini, V., Finelli, C., Giagounidis, A., Schoch, R., Gattermann, N., Sanz, G., List, A., et al. (2009). Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol.* 10, 223–232.

Fernandez-Mercado, M., Burns, A., Pellagatti, A., Giagounidis, A., Germing, U., Agirre, X., Prosper, F., Aul, C., Killick, S., Wainscoat, J.S., et al. (2013). Targeted re-sequencing analysis of 25 genes commonly mutated in myeloid disorders in del(5q) myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 98, 1856–1864.

Ferreira-Cerca, S., and Hurt, E. (2009). Cell biology: Arrest by ribosome. *Nature* 459, 46–47.

Fidler, C., Watkins, F., Bowen, D.T., Littlewood, T.J., Wainscoat, J.S., and Boulwood, J. (2004). NRAS, FLT3 and TP53 mutations in patients with myelodysplastic syndrome and a del(5q). *Haematologica* 89, 865–866.

Fischer, K., Fröhling, S., Scherer, S.W., McAllister Brown, J., Scholl, C., Stilgenbauer, S., Tsui, L.C., Lichter, P., and Döhner, H. (1997). Molecular cytogenetic delineation of deletions and translocations involving chromosome band 7q22 in myeloid leukemias. *Blood* 89, 2036–2041.

G Galván, A.B., Mallo, M., Arenillas, L., Salido, M., Espinet, B., Pedro, C., Florensa, L., Serrano, S., and Solé, F. (2010). Does monosomy 5 really exist in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia? *Leuk. Res.* 34, 1242–1245.

Garand, R., Gardais, J., Bizet, M., Bremond, J.L., Accard, F., Callat, M.P., de Bouchony, E.T., and Goasguen, J.E. (1992). Heterogeneity of acquired idiopathic sideroblastic anaemia (AISA). *Leuk. Res.* 16, 463–468.

Garcia-Manero, G. (2014). Myelodysplastic syndromes: 2014 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am. J. Hematol.* 89, 97–108.

Gattermann, N., Aul, C., and Schneider, W. (1990). Two types of acquired idiopathic sideroblastic anaemia (AISA). *Br. J. Haematol.* 74, 45–52.

Gatto, S., Ball, G., Onida, F., Kantarjian, H.M., Estey, E.H., and Beran, M. (2003). Contribution of beta-2 microglobulin levels to the prognostic stratification of survival in patients with myelodysplastic syndrome (MDS). *Blood* 102, 1622–1625.

Genovese, G., Kähler, A.K., Handsaker, R.E., Lindberg, J., Rose, S.A., Bakhoun, S.F., Chambert, K., Mick, E., Neale, B.M., Fromer, M., et al. (2014). Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N. Engl. J. Med.* 371, 2477–2487.

Germing, U., Gattermann, N., Minning, H., Heyll, A., and Aul, C. (1998). Problems in the classification of CMML--dysplastic versus proliferative type. *Leuk. Res.* 22, 871–878.

Germing, U., Gattermann, N., Strupp, C., Aivado, M., and Aul, C. (2000a). Validation of the WHO proposals for a new classification of primary myelodysplastic syndromes: a retrospective analysis of 1600 patients. *Leuk. Res.* 24, 983–992.

Germing, U., Gattermann, N., Aivado, M., Hildebrandt, B., and Aul, C. (2000b). Two types of acquired idiopathic sideroblastic anaemia (AISA): a time-tested distinction. *Br. J. Haematol.* 108, 724–728.

Germing, U., Strupp, C., Kündgen, A., Bowen, D., Aul, C., Haas, R., and Gattermann, N. (2004). No increase in age-specific incidence of myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 89, 905–910.

Germing, U., Hildebrandt, B., Pfeilstöcker, M., Nösslinger, T., Valent, P., Fonatsch, C., Lübbert, M., Haase, D., Steidl, C., Krieger, O., et al. (2005). Refinement of the international prognostic scoring system (IPSS) by including LDH as an additional prognostic variable to improve risk assessment in patients with primary myelodysplastic syndromes (MDS). *Leukemia* 19, 2223–2231.

Germing, U., Strupp, C., Kuendgen, A., Isa, S., Knipp, S., Hildebrandt, B., Giagounidis, A., Aul, C., Gattermann, N., and Haas, R. (2006). Prospective validation of the WHO proposals for the classification of myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 91, 1596–1604.

Germing, U., Strupp, C., Knipp, S., Kuendgen, A., Giagounidis, A., Hilde-

brandt, B., Aul, C., Haas, R., Gattermann, N., and Bennett, J.M. (2007). Chronic myelomonocytic leukemia in the light of the WHO proposals. *Haematologica* 92, 974–977.

GESMD, and SEHH (2012). Guías españolas de diagnóstico y tratamiento de los síndromes mielodisplásicos y la leucemia mielomonocítica crónica (Hematológica).

Giagounidis, A. a. N., Germing, U., Haase, S., Hildebrandt, B., Schlegelberger, B., Schoch, C., Wilkens, L., Heinsch, M., Willems, H., Aivado, M., et al. (2004a). Clinical, morphological, cytogenetic, and prognostic features of patients with myelodysplastic syndromes and del(5q) including band q31. *Leukemia* 18, 113–119.

Giagounidis, A. a. N., Germing, U., Wainscoat, J.S., Boulwood, J., and Aul, C. (2004b). The 5q- syndrome. *Hematol. Amst. Neth.* 9, 271–277.

Giagounidis, A. a. N., Germing, U., Strupp, C., Hildebrandt, B., Heinsch, M., and Aul, C. (2005). Prognosis of patients with del(5q) MDS and complex karyotype and the possible role of lenalidomide in this patient subgroup. *Ann. Hematol.* 84, 569–571.

Giagounidis, A.A.N., Germing, U., and Aul, C. (2006). Biological and prognostic significance of chromosome 5q deletions in myeloid malignancies. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 12, 5–10.

Gondek, L.P., Tiu, R., O’Keefe, C.L., Sekeres, M.A., Theil, K.S., and Maciejewski, J.P. (2008). Chromosomal lesions and uniparental disomy detected by SNP arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-derived AML. *Blood* 111, 1534–1542.

Gonzalez-Porras, J.R., Cordoba, I., Such, E., Nomdedeu, B., Vallespi, T., Carbonell, F., Luño, E., Ardanaz, M., Ramos, F., Pedro, C., et al. (2011). Prognostic impact of severe thrombocytopenia in low-risk myelodysplastic syndrome. *Cancer* 117, 5529–5537.

Grasso, J.A., Myers, T.J., Hines, J.D., and Sullivan, A.L. (1980). Energy-

dispersive X-ray analysis of the mitochondria of sideroblastic anaemia. *Br. J. Haematol.* 46, 57–72.

Graubert, T.A., Payton, M.A., Shao, J., Walgren, R.A., Monahan, R.S., Frater, J.L., Walshauer, M.A., Martin, M.G., Kasai, Y., and Walter, M.J. (2009). Integrated genomic analysis implicates haploinsufficiency of multiple chromosome 5q31.2 genes in de novo myelodysplastic syndromes pathogenesis. *PLoS One* 4, e4583.

Graubert, T.A., Shen, D., Ding, L., Okeyo-Owuor, T., Lunn, C.L., Shao, J., Krysiak, K., Harris, C.C., Koboldt, D.C., Larson, D.E., et al. (2012). Recurrent mutations in the U2AF1 splicing factor in myelodysplastic syndromes. *Nat. Genet.* 44, 53–57.

Greaves, M. (2015). Evolutionary determinants of cancer. *Cancer Discov.* 5, 806–820.

Greaves, M., and Maley, C.C. (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature* 481, 306–313.

Greenberg, P., Cox, C., LeBeau, M.M., Fenau, P., Morel, P., Sanz, G., Sanz, M., Vallespi, T., Hamblin, T., Oscier, D., et al. (1997). International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 89, 2079–2088.

Greenberg, P., Cox, C., Le Beau, M.M., Fenau, P., Morel, P., Sanz, G., Sanz, M., Vallespi, T., Hamblin, T., Oscier, D., et al. (1998). Erratum: International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 91(3), 1100.

Greenberg, P.L., Sun, Z., Miller, K.B., Bennett, J.M., Tallman, M.S., Dewald, G., Paietta, E., van der Jagt, R., Houston, J., Thomas, M.L., et al. (2009). Treatment of myelodysplastic syndrome patients with erythropoietin with or without granulocyte colony-stimulating factor: results of a prospective randomized phase 3 trial by the Eastern Cooperative Oncol-

ogy Group (E1996). *Blood* 114, 2393–2400.

Greenberg, P.L., Tuechler, H., Schanz, J., Sanz, G., Garcia-Manero, G., Solé, F., Bennett, J.M., Bowen, D., Fenaux, P., Dreyfus, F., et al. (2012). Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* 120, 2454–2465.

Griffiths, E.A., and Gore, S.D. (2008). DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Semin. Hematol.* 45, 23–30.

Grisendi, S., Bernardi, R., Rossi, M., Cheng, K., Khandker, L., Manova, K., and Pandolfi, P.P. (2005). Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. *Nature* 437, 147–153.

Haase, D. (2008). Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. *Ann. Hematol.* 87, 515–526.

Haase, D., Germing, U., Schanz, J., Pfeilstöcker, M., Nösslinger, T., Hildebrandt, B., Kundgen, A., Lübbert, M., Kunzmann, R., Giagounidis, A.A.N., et al. (2007). New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* 110, 4385–4395.

Hamilton-Paterson, J.L. (1949). Pre-leukaemic anaemia. *Acta Haematol.* 2, 309–316.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.

Harris, N.L., Jaffe, E.S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H.K., Vardiman, J., Lister, T.A., and Bloomfield, C.D. (1999). World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting—Airlie House, Virginia, November 1997. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 17, 3835–3849.

Heaney, M.L., and Golde, D.W. (1999). Myelodysplasia. *N. Engl. J. Med.* 340, 1649–1660.

Heim, S., and Mitelman, F. (1986). Chromosome abnormalities in the myelodysplastic syndromes. *Clin. Haematol.* 15, 1003–1021.

Heinrichs, S., Kulkarni, R.V., Bueso-Ramos, C.E., Levine, R.L., Loh, M.L., Li, C., Neuberg, D., Kornblau, S.M., Issa, J.-P., Gilliland, D.G., et al. (2009). Accurate detection of uniparental disomy and microdeletions by SNP array analysis in myelodysplastic syndromes with normal cytogenetics. *Leukemia* 23, 1605–1613.

Heise, C., Carter, T., Schafer, P., and Chopra, R. (2010). Pleiotropic mechanisms of action of lenalidomide efficacy in del(5q) myelodysplastic syndromes. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 10, 1663–1672.

Hellström-Lindberg, E., and Malcovati, L. (2008). Supportive care, growth factors, and new therapies in myelodysplastic syndromes. *Blood Rev.* 22, 75–91.

Hellström-Lindberg, E., Gulbrandsen, N., Lindberg, G., Ahlgren, T., Dahl, I.M.S., Dybedal, I., Grimfors, G., Hesse-Sundin, E., Hjorth, M., Kanter-Lewensohn, L., et al. (2003). A validated decision model for treating the anaemia of myelodysplastic syndromes with erythropoietin + granulocyte colony-stimulating factor: significant effects on quality of life. *Br. J. Haematol.* 120, 1037–1046.

Hemmat, M., Chen, W., Anguiano, A., Naggar, M.E., Racke, F.K., Jones, D., Wang, Y., Strom, C.M., Chang, K., and Boyar, F.Z. (2014). Submicroscopic deletion of 5q involving tumor suppressor genes (CTNNA1, HSPA9) and copy neutral loss of heterozygosity associated with TET2 and EZH2 mutations in a case of MDS with normal chromosome and FISH results. *Mol. Cytogenet.* 7, 35.

Heuser, M., Meggendorfer, M., Cruz, M.M.A., Fabisch, J., Klesse, S.,

Köhler, L., Göhring, G., Ganster, C., Shirneshan, K., Gutermuth, A., et al. (2015). Frequency and prognostic impact of casein kinase 1A1 mutations in MDS patients with deletion of chromosome 5q. *Leukemia* 29, 1942–1945.

Hirai, H., Kobayashi, Y., Mano, H., Hagiwara, K., Maru, Y., Omine, M., Mizoguchi, H., Nishida, J., and Takaku, F. (1987). A point mutation at codon 13 of the N-ras oncogene in myelodysplastic syndrome. *Nature* 327, 430–432.

Holtan, S.G., Santana-Davila, R., Dewald, G.W., Khetterling, R.P., Knudson, R.A., Hoyer, J.D., Chen, D., Hanson, C.A., Porrata, L., Tefferi, A., et al. (2008). Myelodysplastic syndromes associated with interstitial deletion of chromosome 5q: clinicopathologic correlations and new insights from the pre-lenalidomide era. *Am. J. Hematol.* 83, 708–713.

Horrigan, S.K., Arbieva, Z.H., Xie, H.Y., Kravarusic, J., Fulton, N.C., Naik, H., Le, T.T., and Westbrook, C.A. (2000). Delineation of a minimal interval and identification of 9 candidates for a tumor suppressor gene in malignant myeloid disorders on 5q31. *Blood* 95, 2372–2377.

Hosono, N., Makishima, H., Jerez, A., Yoshida, K., Przychodzen, B., McMahon, S., Shiraishi, Y., Chiba, K., Tanaka, H., Miyano, S., et al. (2014). Recurrent genetic defects on chromosome 7q in myeloid neoplasms. *Leukemia* 28, 1348–1351.

Howe, R.B., Porwit-MacDonald, A., Wanat, R., Tehranchi, R., and Hellström-Lindberg, E. (2004). The WHO classification of MDS does make a difference. *Blood* 103, 3265–3270.

Howell, V.M., Jones, J.M., Bergren, S.K., Li, L., Billi, A.C., Avenarius, M.R., and Meisler, M.H. (2007). Evidence for a direct role of the disease modifier SCNM1 in splicing. *Hum. Mol. Genet.* 16, 2506–2516.

Hulea, L., and Nepveu, A. (2012). CUX1 transcription factors: from bio-

chemical activities and cell-based assays to mouse models and human diseases. *Gene* 497, 18–26.

Itzykson, R., Kosmider, O., Cluzeau, T., Mansat-De Mas, V., Dreyfus, F., Beyne-Rauzy, O., Quesnel, B., Vey, N., Gelsi-Boyer, V., Raynaud, S., et al. (2011). Impact of TET2 mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias. *Leukemia* 25, 1147–1152.

Iwanaga, M., Hsu, W.-L., Soda, M., Takasaki, Y., Tawara, M., Joh, T., Amenomori, T., Yamamura, M., Yoshida, Y., Koba, T., et al. (2011). Risk of myelodysplastic syndromes in people exposed to ionizing radiation: a retrospective cohort study of Nagasaki atomic bomb survivors. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 29, 428–434.

Jädersten, M., Montgomery, S.M., Dybedal, I., Porwit-MacDonald, A., and Hellström-Lindberg, E. (2005). Long-term outcome of treatment of anemia in MDS with erythropoietin and G-CSF. *Blood* 106, 803–811.

Jädersten, M., Malcovati, L., Dybedal, I., Della Porta, M.G., Invernizzi, R., Montgomery, S.M., Pascutto, C., Porwit, A., Cazzola, M., and Hellström-Lindberg, E. (2008). Erythropoietin and granulocyte-colony stimulating factor treatment associated with improved survival in myelodysplastic syndrome. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26, 3607–3613.

Jädersten, M., Saft, L., Pellagatti, A., Göhring, G., Wainscoat, J.S., Boulwood, J., Porwit, A., Schlegelberger, B., and Hellström-Lindberg, E. (2009). Clonal heterogeneity in the 5q- syndrome: p53 expressing progenitors prevail during lenalidomide treatment and expand at disease progression. *Haematologica* 94, 1762–1766.

Jädersten, M., Saft, L., Smith, A., Kulasekararaj, A., Pomplun, S., Göhring, G., Hedlund, A., Hast, R., Schlegelberger, B., Porwit, A., et al. (2011). TP53 mutations in low-risk myelodysplastic syndromes with del(5q) predict disease progression. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin.*

Oncol. 29, 1971–1979.

Jaffe, E.S., Harris, N.L., and Stein, H. (2001). Pathology and Genetics: Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (Lyon, France).

Jaiswal, S., Fontanillas, P., Flannick, J., Manning, A., Grauman, P.V., Mar, B.G., Lindsley, R.C., Mermel, C.H., Burt, N., Chavez, A., et al. (2014). Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N. Engl. J. Med.* 371, 2488–2498.

Jerez, A., Gondek, L.P., Jankowska, A.M., Makishima, H., Przychodzen, B., Tiu, R.V., O'Keefe, C.L., Mohamedali, A.M., Batista, D., Sekeres, M.A., et al. (2012). Topography, clinical, and genomic correlates of 5q myeloid malignancies revisited. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 30, 1343–1349.

Joslin, J.M., Fernald, A.A., Tennant, T.R., Davis, E.M., Kogan, S.C., Anastasi, J., Crispino, J.D., and Le Beau, M.M. (2007). Haploinsufficiency of *EGR1*, a candidate gene in the del(5q), leads to the development of myeloid disorders. *Blood* 110, 719–726.

Kallioniemi, A., Kallioniemi, O.P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J.W., Waldman, F., and Pinkel, D. (1992). Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258, 818–821.

Kantarjian, H., Beran, M., Cortes, J., O'Brien, S., Giles, F., Pierce, S., Shan, J., Plunkett, W., Keating, M., and Estey, E. (2006). Long-term follow-up results of the combination of topotecan and cytarabine and other intensive chemotherapy regimens in myelodysplastic syndrome. *Cancer* 106, 1099–1109.

Kantarjian, H., Giles, F., List, A., Lyons, R., Sekeres, M.A., Pierce, S., Deuson, R., and Leveque, J. (2007). The incidence and impact of thrombocytopenia in myelodysplastic syndromes. *Cancer* 109, 1705–1714.

Kantarjian, H., O'Brien, S., Ravandi, F., Borthakur, G., Faderl, S., Bueso-Ramos, C., Abruzzo, L., Pierce, S., Shan, J., Issa, J.-P., et al. (2009). The heterogeneous prognosis of patients with myelodysplastic syndrome and chromosome 5 abnormalities: how does it relate to the original lenalidomide experience in MDS? *Cancer* 115, 5202–5209.

Kao, J.M., McMillan, A., and Greenberg, P.L. (2008). International MDS risk analysis workshop (IMRAW)/IPSS reanalyzed: impact of cytopenias on clinical outcomes in myelodysplastic syndromes. *Am. J. Hematol.* 83, 765–770.

Kask, M., Pruunsild, P., and Timmusk, T. (2011). Bidirectional transcription from human LRRTM2/CTNNA1 and LRRTM1/CTNNA2 gene loci leads to expression of N-terminally truncated CTNNA1 and CTNNA2 isoforms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 411, 56–61.

Kelaidi, C., Park, S., Brechignac, S., Mannone, L., Vey, N., Dombret, H., Aljasseem, L., Stamatoullas, A., Adès, L., Giraudier, S., et al. (2008). Treatment of myelodysplastic syndromes with 5q deletion before the lenalidomide era; the GFM experience with EPO and thalidomide. *Leuk. Res.* 32, 1049–1053.

Kerkhofs, H., Hermans, J., Haak, H.L., and Leeksa, C.H. (1987). Utility of the FAB classification for myelodysplastic syndromes: investigation of prognostic factors in 237 cases. *Br. J. Haematol.* 65, 73–81.

Ketterling, R.P., Wyatt, W.A., VanWier, S.A., Law, M., Hodnefield, J.M., Hanson, C.A., and Dewald, G.W. (2002). Primary myelodysplastic syndrome with normal cytogenetics: utility of “FISH panel testing” and M-FISH. *Leuk. Res.* 26, 235–240.

Knipp, S., Strupp, C., Gattermann, N., Hildebrandt, B., Schapira, M., Giagounidis, A., Aul, C., Haas, R., and Germing, U. (2008). Presence of peripheral blasts in refractory anemia and refractory cytopenia with multilineage dysplasia predicts an unfavourable outcome. *Leuk. Res.*

32, 33–37.

Komrokji, R.S., and List, A.F. (2011). Role of lenalidomide in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Semin. Oncol.* 38, 648–657.

Kosmider, O., Gelsi-Boyer, V., Slama, L., Dreyfus, F., Beyne-Rauzy, O., Quesnel, B., Hunault-Berger, M., Slama, B., Vey, N., Lacombe, C., et al. (2010). Mutations of IDH1 and IDH2 genes in early and accelerated phases of myelodysplastic syndromes and MDS/myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 24, 1094–1096.

Krönke, J., Fink, E.C., Hollenbach, P.W., MacBeth, K.J., Hurst, S.N., Udeshi, N.D., Chamberlain, P.P., Mani, D.R., Man, H.W., Gandhi, A.K., et al. (2015). Lenalidomide induces ubiquitination and degradation of CK1 α in del(5q) MDS. *Nature* 523, 183–188.

Kulasekararaj, A.G., Mohamedali, A.M., and Mufti, G.J. (2013). Recent advances in understanding the molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Br. J. Haematol.* 162, 587–605.

Kumar, M.S., Narla, A., Nonami, A., Mullally, A., Dimitrova, N., Ball, B., McAuley, J.R., Poveromo, L., Kutok, J.L., Galili, N., et al. (2011). Coordinate loss of a microRNA and protein-coding gene cooperate in the pathogenesis of 5q- syndrome. *Blood* 118, 4666–4673.

Kurtovic-Kozaric, A., Przychodzen, B., Singh, J., Konarska, M.M., Clemente, M.J., Otrrock, Z.K., Nakashima, M., Hsi, E.D., Yoshida, K., Shiraishi, Y., et al. (2015). PRPF8 defects cause missplicing in myeloid malignancies. *Leukemia* 29, 126–136.

Landau, D.A., Carter, S.L., Getz, G., and Wu, C.J. (2014). Clonal evolution in hematological malignancies and therapeutic implications. *Leukemia* 28, 34–43.

Lane, S.W., Sykes, S.M., Al-Shahrour, F., Shterental, S., Paktinat, M., Lo

Celso, C., Jesneck, J.L., Ebert, B.L., Williams, D.A., and Gilliland, D.G. (2010). The Apc(min) mouse has altered hematopoietic stem cell function and provides a model for MPD/MDS. *Blood* 115, 3489–3497.

Leone, G., Fianchi, L., and Voso, M.T. (2011). Therapy-related myeloid neoplasms. *Curr. Opin. Oncol.* 23, 672–680.

Li, J.-Y., Xiao, B., Chen, L.-J., Pan, J.-L., Xu, W., Qiu, H.-R., Li, L., and Xue, Y.-Q. (2008). An analysis of complex chromosomal aberrations in seven cases of myelodysplastic syndromes by M-FISH and whole chromosome painting. *Int. J. Hematol.* 88, 369–373.

Liehr, T., Weise, A., Heller, A., Starke, H., Mrasek, K., Kuechler, A., Weier, H.-U.G., and Claussen, U. (2002). Multicolor chromosome banding (MCB) with YAC/BAC-based probes and region-specific microdissection DNA libraries. *Cytogenet. Genome Res.* 97, 43–50.

Lim, Z.Y., Killick, S., Germing, U., Cavenagh, J., Culligan, D., Bacigalupo, A., Marsh, J., and Mufti, G.J. (2007). Low IPSS score and bone marrow hypocellularity in MDS patients predict hematological responses to antithymocyte globulin. *Leukemia* 21, 1436–1441.

Lindsley, R.C., and Ebert, B.L. (2013). Molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes. *Annu. Rev. Pathol.* 8, 21–47.

List, A., Dewald, G., Bennett, J., Giagounidis, A., Raza, A., Feldman, E., Powell, B., Greenberg, P., Thomas, D., Stone, R., et al. (2006). Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *N. Engl. J. Med.* 355, 1456–1465.

Liu, E., Hjelle, B., Morgan, R., Hecht, F., and Bishop, J.M. (1987). Mutations of the Kirsten-ras proto-oncogene in human preleukaemia. *Nature* 330, 186–188.

Liu, T.X., Becker, M.W., Jelinek, J., Wu, W.-S., Deng, M., Mikhalkevich, N., Hsu, K., Bloomfield, C.D., Stone, R.M., DeAngelo, D.J., et al. (2007).

Chromosome 5q deletion and epigenetic suppression of the gene encoding alpha-catenin (CTNNA1) in myeloid cell transformation. *Nat. Med.* 13, 78–83.

Loeb, L.A. (2011). Human cancers express mutator phenotypes: origin, consequences and targeting. *Nat. Rev. Cancer* 11, 450–457.

Loh, M.L., Martinelli, S., Cordeddu, V., Reynolds, M.G., Vattikuti, S., Lee, C.M., Wulfert, M., Germing, U., Haas, P., Niemeyer, C., et al. (2005). Acquired PTPN11 mutations occur rarely in adult patients with myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia. *Leuk. Res.* 29, 459–462.

Lübbert, M., Wijermans, P., Kunzmann, R., Verhoef, G., Bosly, A., Ravoet, C., Andre, M., and Ferrant, A. (2001). Cytogenetic responses in high-risk myelodysplastic syndrome following low-dose treatment with the DNA methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine. *Br. J. Haematol.* 114, 349–357.

Luckey, J.A., Drossman, H., Kostichka, A.J., Mead, D.A., D'Cunha, J., Norris, T.B., and Smith, L.M. (1990). High speed DNA sequencing by capillary electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 18, 4417–4421.

MMaassen, A., Strupp, C., Giagounidis, A., Kuendgen, A., Nachtkamp, K., Hildebrandt, B., Gattermann, N., Aul, C., Haas, R., and Germing, U. (2013). Validation and proposals for a refinement of the WHO 2008 classification of myelodysplastic syndromes without excess of blasts. *Leuk. Res.* 37, 64–70.

Maciejewski, J.P., Tiu, R.V., and O'Keefe, C. (2009). Application of array-based whole genome scanning technologies as a cytogenetic tool in haematological malignancies. *Br. J. Haematol.* 146, 479–488.

Magee, J.A., Piskounova, E., and Morrison, S.J. (2012). Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell* 21, 283–296.

Makishima, H., and Maciejewski, J.P. (2011). Pathogenesis and consequences of uniparental disomy in cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17, 3913–3923.

Makishima, H., Jankowska, A.M., Tiu, R.V., Szpurka, H., Sugimoto, Y., Hu, Z., Sauntharajah, Y., Guinta, K., Keddache, M.A., Putnam, P., et al. (2010a). Novel homo- and hemizygous mutations in EZH2 in myeloid malignancies. *Leukemia* 24, 1799–1804.

Makishima, H., Rataul, M., Gondek, L.P., Huh, J., Cook, J.R., Theil, K.S., Sekeres, M.A., Kuczkowski, E., O’Keefe, C., and Maciejewski, J.P. (2010b). FISH and SNP-A karyotyping in myelodysplastic syndromes: improving cytogenetic detection of del(5q), monosomy 7, del(7q), trisomy 8 and del(20q). *Leuk. Res.* 34, 447–453.

Malcovati, L., Porta, M.G.D., Pascutto, C., Invernizzi, R., Boni, M., Travaglino, E., Passamonti, F., Arcaini, L., Maffioli, M., Bernasconi, P., et al. (2005). Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision making. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 23, 7594–7603.

Malcovati, L., Germing, U., Kuendgen, A., Della Porta, M.G., Pascutto, C., Invernizzi, R., Giagounidis, A., Hildebrandt, B., Bernasconi, P., Knipp, S., et al. (2007). Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 25, 3503–3510.

Malcovati, L., Della Porta, M.G., Strupp, C., Ambaglio, I., Kuendgen, A., Nachtkamp, K., Travaglino, E., Invernizzi, R., Pascutto, C., Lazzarino, M., et al. (2011). Impact of the degree of anemia on the outcome of patients with myelodysplastic syndrome and its integration into the WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS). *Haematologica* 96, 1433–1440.

Mallo, M., Arenillas, L., Espinet, B., Salido, M., Hernández, J.M., Lum-

breras, E., del Rey, M., Arranz, E., Ramiro, S., Font, P., et al. (2008). Fluorescence in situ hybridization improves the detection of 5q31 deletion in myelodysplastic syndromes without cytogenetic evidence of 5q-. *Haematologica* 93, 1001–1008.

Mallo, M., Cervera, J., Schanz, J., Such, E., García-Manero, G., Luño, E., Steidl, C., Espinet, B., Vallespi, T., Germing, U., et al. (2011). Impact of adjunct cytogenetic abnormalities for prognostic stratification in patients with myelodysplastic syndrome and deletion 5q. *Leukemia* 25, 110–120.

Mallo, M., Del Rey, M., Ibáñez, M., Calasanz, M.J., Arenillas, L., Laráyoz, M.J., Pedro, C., Jerez, A., Maciejewski, J., Costa, D., et al. (2013). Response to lenalidomide in myelodysplastic syndromes with del(5q): influence of cytogenetics and mutations. *Br. J. Haematol.* 162, 74–86.

Mark, H.F.L., Wyandt, H., Huang, X.L., and Milunsky, J.M. (2005). Delineation of a supernumerary marker chromosome utilizing a multimodal approach of G-banding, fluorescent in situ hybridization, confirmatory P1 artificial chromosome fluorescent in situ hybridization, and high-resolution comparative genomic hybridization. *Clin. Genet.* 68, 146–151.

Matsuda, A., Jinnai, I., Yagasaki, F., Kusumoto, S., Minamihisamatsu, M., Honda, S., Murohashi, I., Bessho, M., and Hirashima, K. (1998). Refractory anemia with severe dysplasia: clinical significance of morphological features in refractory anemia. *Leukemia* 12, 482–485.

McGowan, K.A., Li, J.Z., Park, C.Y., Beaudry, V., Tabor, H.K., Sabnis, A.J., Zhang, W., Fuchs, H., de Angelis, M.H., Myers, R.M., et al. (2008). Ribosomal mutations cause p53-mediated dark skin and pleiotropic effects. *Nat. Genet.* 40, 963–970.

McNerney, M.E., Brown, C.D., Wang, X., Bartom, E.T., Karmakar, S., Bandlamudi, C., Yu, S., Ko, J., Sandall, B.P., Stricker, T., et al. (2013). CUX1 is a haploinsufficient tumor suppressor gene on chromosome 7

frequently inactivated in acute myeloid leukemia. *Blood* 121, 975–983.

McQuilten, Z.K., Sundararajan, V., Andrianopoulos, N., Curtis, D.J., Wood, E.M., Campbell, L.J., and Wall, M. (2015). Monosomal karyotype predicts inferior survival independently of a complex karyotype in patients with myelodysplastic syndromes. *Cancer* 121, 2892–2899.

Mei, R., Galipeau, P.C., Prass, C., Berno, A., Ghandour, G., Patil, N., Wolff, R.K., Chee, M.S., Reid, B.J., and Lockhart, D.J. (2000). Genome-wide detection of allelic imbalance using human SNPs and high-density DNA arrays. *Genome Res.* 10, 1126–1137.

Merlo, L.M.F., Pepper, J.W., Reid, B.J., and Maley, C.C. (2006). Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat. Rev. Cancer* 6, 924–935.
Michaux, J.L., and Martiat, P. (1993). Chronic myelomonocytic leukaemia (CMML)—a myelodysplastic or myeloproliferative syndrome? *Leuk. Lymphoma* 9, 35–41.

Morel, P., Hebbar, M., Lai, J.L., Duhamel, A., Preudhomme, C., Wattel, E., Bauters, F., and Fenaux, P. (1993). Cytogenetic analysis has strong independent prognostic value in de novo myelodysplastic syndromes and can be incorporated in a new scoring system: a report on 408 cases. *Leukemia* 7, 1315–1323.

Mufti, G.J., Stevens, J.R., Oscier, D.G., Hamblin, T.J., and Machin, D. (1985). Myelodysplastic syndromes: a scoring system with prognostic significance. *Br. J. Haematol.* 59, 425–433.

Müller-Berndorff, H., Haas, P.S., Kunzmann, R., Schulte-Mönting, J., and Lübbert, M. (2006). Comparison of five prognostic scoring systems, the French-American-British (FAB) and World Health Organization (WHO) classifications in patients with myelodysplastic syndromes: Results of a single-center analysis. *Ann. Hematol.* 85, 502–513.

Natelson, E.A. (2007). Benzene exposure and refractory sideroblastic

erythropoiesis: is there an association? *Am. J. Med. Sci.* 334, 356–360.
Nepveu, A. (2001). Role of the multifunctional CDP/Cut/Cux homeodomain transcription factor in regulating differentiation, cell growth and development. *Gene* 270, 1–15.

Neukirchen, J., Schoonen, W.M., Strupp, C., Gattermann, N., Aul, C., Haas, R., and Germing, U. (2011). Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes: data from the Düsseldorf MDS-registry. *Leuk. Res.* 35, 1591–1596.

Neumann, F., Gattermann, N., Barthelmes, H.-U., Haas, R., and Germing, U. (2009). Levels of beta 2 microglobulin have a prognostic relevance for patients with myelodysplastic syndrome with regard to survival and the risk of transformation into acute myelogenous leukemia. *Leuk. Res.* 33, 232–236.

Nikoloski, G., Langemeijer, S.M.C., Kuiper, R.P., Knops, R., Massop, M., Tönnissen, E.R.L.T.M., van der Heijden, A., Scheele, T.N., Vandenberghe, P., de Witte, T., et al. (2010). Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nat. Genet.* 42, 665–667.

Nisse, C., Haguenoer, J.M., Grandbastien, B., Preudhomme, C., Fontaine, B., Brillet, J.M., Lejeune, R., and Fenaux, P. (2001). Occupational and environmental risk factors of the myelodysplastic syndromes in the North of France. *Br. J. Haematol.* 112, 927–935.

Nösslinger, T., Tüchler, H., Germing, U., Sperr, W.R., Krieger, O., Haase, D., Lübbert, M., Stauder, R., Giagounidis, A., Valent, P., et al. (2010). Prognostic impact of age and gender in 897 untreated patients with primary myelodysplastic syndromes. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* 21, 120–125.

Nybakken, G.E., and Bagg, A. (2014). The genetic basis and expanding role of molecular analysis in the diagnosis, prognosis, and therapeutic

design for myelodysplastic syndromes. *J. Mol. Diagn. JMD* 16, 145–158.

Olney, H.J., and Le Beau, M.M. (2007). Evaluation of recurring cytogenetic abnormalities in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Leuk. Res.* 31, 427–434.

Panić, L., Montagne, J., Cokarić, M., and Volarević, S. (2007). S6-haploinsufficiency activates the p53 tumor suppressor. *Cell Cycle Georget. Tex* 6, 20–24.

Papaemmanuil, E., Cazzola, M., Boulwood, J., Malcovati, L., Vyas, P., Bowen, D., Pellagatti, A., Wainscoat, J.S., Hellstrom-Lindberg, E., Gambacorti-Passerini, C., et al. (2011). Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N. Engl. J. Med.* 365, 1384–1395.

Papaemmanuil, E., Gerstung, M., Malcovati, L., Tauro, S., Gundem, G., Van Loo, P., Yoon, C.J., Ellis, P., Wedge, D.C., Pellagatti, A., et al. (2013). Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood* 122, 3616–3627; quiz 3699.

Park, S., Grabar, S., Kelaidi, C., Beyne-Rauzy, O., Picard, F., Bardet, V., Coiteux, V., Leroux, G., Lepelley, P., Daniel, M.-T., et al. (2008). Predictive factors of response and survival in myelodysplastic syndrome treated with erythropoietin and G-CSF: the GFM experience. *Blood* 111, 574–582.

Parker, J.E., Fishlock, K.L., Mijovic, A., Czepulkowski, B., Pagliuca, A., and Mufti, G.J. (1998). “Low-risk” myelodysplastic syndrome is associated with excessive apoptosis and an increased ratio of pro- versus anti-apoptotic bcl-2-related proteins. *Br. J. Haematol.* 103, 1075–1082.

Parker, J.E., Mufti, G.J., Rasool, F., Mijovic, A., Devereux, S., and Pagliuca, A. (2000). The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS. *Blood* 96, 3932–3938.

Patnaik, M.M., Hanson, C.A., Hodnefield, J.M., Knudson, R., Van Dyke, D.L., and Tefferi, A. (2011). Monosomal karyotype in myelodysplastic syndromes, with or without monosomy 7 or 5, is prognostically worse than an otherwise complex karyotype. *Leukemia* 25, 266–270.

Pedersen-Bjergaard, J., Christiansen, D.H., Desta, F., and Andersen, M.K. (2006). Alternative genetic pathways and cooperating genetic abnormalities in the pathogenesis of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia* 20, 1943–1949.

Pellagatti, A., and Boultonwood, J. (2015). The molecular pathogenesis of the myelodysplastic syndromes. *Eur. J. Haematol.* 95, 3–15.

Pellagatti, A., Jädersten, M., Forsblom, A.-M., Cattan, H., Christensson, B., Emanuelsson, E.K., Merup, M., Nilsson, L., Samuelsson, J., Sander, B., et al. (2007). Lenalidomide inhibits the malignant clone and up-regulates the SPARC gene mapping to the commonly deleted region in 5q- syndrome patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 11406–11411.

Pellagatti, A., Marafioti, T., Paterson, J.C., Barlow, J.L., Drynan, L.F., Giagounidis, A., Pileri, S.A., Cazzola, M., McKenzie, A.N.J., Wainscoat, J.S., et al. (2010). Induction of p53 and up-regulation of the p53 pathway in the human 5q- syndrome. *Blood* 115, 2721–2723.

Pinkel, D., Seagraves, R., Sudar, D., Clark, S., Poole, I., Kowbel, D., Collins, C., Kuo, W.L., Chen, C., Zhai, Y., et al. (1998). High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat. Genet.* 20, 207–211.

Qu, S., Xu, Z., Zhang, Y., Qin, T., Zhang, T., Cui, R., and Xiao, Z. (2012). Impacts of cytogenetic categories in the Revised International Prognostic Scoring System on the prognosis of primary myelodysplastic syndromes: results of a single-center study. *Leuk. Lymphoma* 53, 940–946.

Raaijmakers, M.H.G.P., Mukherjee, S., Guo, S., Zhang, S., Kobayashi,

T., Schoonmaker, J.A., Ebert, B.L., Al-Shahrour, F., Hasserjian, R.P., Scadden, E.O., et al. (2010). Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature* 464, 852–857.

Raza, A., and Galili, N. (2012). The genetic basis of phenotypic heterogeneity in myelodysplastic syndromes. *Nat. Rev. Cancer* 12, 849–859.

Raza, A., Gezer, S., Mundle, S., Gao, X.Z., Alvi, S., Borok, R., Rifkin, S., Iftikhar, A., Shetty, V., and Parcharidou, A. (1995). Apoptosis in bone marrow biopsy samples involving stromal and hematopoietic cells in 50 patients with myelodysplastic syndromes. *Blood* 86, 268–276.

Raza, A., Mundle, S., Shetty, V., Alvi, S., Chopra, H., Span, L., Parcharidou, A., Dar, S., Venugopal, P., Borok, R., et al. (1996). Novel insights into the biology of myelodysplastic syndromes: excessive apoptosis and the role of cytokines. *Int. J. Hematol.* 63, 265–278.

Rheingold, J.J., Kaufman, R., Adelson, E., and Lear, A. (1963). Smoldering acute leukemia. *N. Engl. J. Med.* 268, 812–815.

Ribera, J.M., Cervantes, F., and Rozman, C. (1987). A multivariate analysis of prognostic factors in chronic myelomonocytic leukaemia according to the FAB criteria. *Br. J. Haematol.* 65, 307–311.

Rigby, P.W., Dieckmann, M., Rhodes, C., and Berg, P. (1977). Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113, 237–251.

Rigolin, G.M., Cuneo, A., Roberti, M.G., Bardi, A., Bigoni, R., Piva, N., Minotto, C., Agostini, P., De Angeli, C., Del Senno, L., et al. (1998). Exposure to myelotoxic agents and myelodysplasia: case-control study and correlation with clinicobiological findings. *Br. J. Haematol.* 103, 189–197.

Rigolin, G.M., Bigoni, R., Milani, R., Cavazzini, F., Roberti, M.G., Bardi, A., Agostini, P., Della Porta, M., Tieghi, A., Piva, N., et al. (2001). Clini-

cal importance of interphase cytogenetics detecting occult chromosome lesions in myelodysplastic syndromes with normal karyotype. *Leukemia* 15, 1841–1847.

Rollison, D.E., Howlader, N., Smith, M.T., Strom, S.S., Merritt, W.D., Ries, L.A., Edwards, B.K., and List, A.F. (2008). Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001-2004, using data from the NAACCR and SEER programs. *Blood* 112, 45–52.

Romeo, M., Chauffaille, M. de L., Silva, M.R.R., Bahia, D.M.M., and Kerbaux, J. (2002). Comparison of cytogenetics with FISH in 40 myelodysplastic syndrome patients. *Leuk. Res.* 26, 993–996.

Rosati, S., Mick, R., Xu, F., Stonys, E., Le Beau, M.M., Larson, R., and Vardiman, J.W. (1996). Refractory cytopenia with multilineage dysplasia: further characterization of an “unclassifiable” myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 10, 20–26.

Sallman, D.A., Wei, S., and List, A. (2014). PP2A: The Achilles Heal in MDS with 5q Deletion. *Front. Oncol.* 4, 264.

Sanada, M., Suzuki, T., Shih, L.-Y., Otsu, M., Kato, M., Yamazaki, S., Tamura, A., Honda, H., Sakata-Yanagimoto, M., Kumano, K., et al. (2009). Gain-of-function of mutated C-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms. *Nature* 460, 904–908.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5463–5467.

Sanz, G., Mena-Duran, A.V., Ribera, J.M., Bernal, T., Palomera, L., and Del Cañizo, C. (2005). Autologous stem cell transplantation after FLAG-IDA chemotherapy for high-risk myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myeloid leukemias secondary to MDS (sAML) does not improve

outcome: A PETHEMA experience in 103 patients. *ASH Annu. Meet. Abstr. Blood* 106(11), 793.

Sanz, G.F., Sanz, M.A., Vallespí, T., Cañizo, M.C., Torrabadella, M., García, S., Irrigüible, D., and San Miguel, J.F. (1989). Two regression models and a scoring system for predicting survival and planning treatment in myelodysplastic syndromes: a multivariate analysis of prognostic factors in 370 patients. *Blood* 74, 395–408.

Schanz, J., Steidl, C., Fonatsch, C., Pfeilstöcker, M., Nösslinger, T., Tuechler, H., Valent, P., Hildebrandt, B., Giagounidis, A., Aul, C., et al. (2011). Coalesced multicentric analysis of 2,351 patients with myelodysplastic syndromes indicates an underestimation of poor-risk cytogenetics of myelodysplastic syndromes in the international prognostic scoring system. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 29, 1963–1970.

Schanz, J., Tüchler, H., Solé, F., Mallo, M., Luño, E., Cervera, J., Granada, I., Hildebrandt, B., Slovak, M.L., Ohyashiki, K., et al. (2012). 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. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 30, 820–829.

Schanz, J., Tüchler, H., Solé, F., Mallo, M., Luño, E., Cervera, J., Grau, J., Hildebrandt, B., Slovak, M.L., Ohyashiki, K., et al. (2013). Monosomal karyotype in MDS: explaining the poor prognosis? *Leukemia* 27, 1988–1995.

Schneider, R.K., Ademà, V., Heckl, D., Järås, M., Mallo, M., Lord, A.M., Chu, L.P., McConkey, M.E., Kramann, R., Mullally, A., et al. (2014). Role of casein kinase 1A1 in the biology and targeted therapy of del(5q) MDS. *Cancer Cell* 26, 509–520.

Schoch, C., Kern, W., Kohlmann, A., Hiddemann, W., Schnittger, S., and Haferlach, T. (2005). Acute myeloid leukemia with a complex aberrant

karyotype is a distinct biological entity characterized by genomic imbalances and a specific gene expression profile. *Genes. Chromosomes Cancer* 43, 227–238.

Seymour, J.F., and Estey, E.H. (1995). The contribution of Auer rods to the classification and prognosis of myelodysplastic syndromes. *Leuk. Lymphoma* 17, 79–85.

Shaffer, L., McGowan-Jordan, J., and Schmid, M. (2013). An International System for Human Cytogenetic Nomenclature.

Shen, L., Kantarjian, H., Guo, Y., Lin, E., Shan, J., Huang, X., Berry, D., Ahmed, S., Zhu, W., Pierce, S., et al. (2010). DNA methylation predicts survival and response to therapy in patients with myelodysplastic syndromes. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 28, 605–613.

Silverman, L.R., Demakos, E.P., Peterson, B.L., Kornblith, A.B., Holland, J.C., Odchimar-Reissig, R., Stone, R.M., Nelson, D., Powell, B.L., DeCastro, C.M., et al. (2002). Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 20, 2429–2440.

Singh, H., Lane, A.A., Correll, M., Przychodzen, B., Sykes, D.B., Stone, R.M., Ballen, K.K., Amrein, P.C., Maciejewski, J., and Attar, E.C. (2013). Putative RNA-splicing gene LUC7L2 on 7q34 represents a candidate gene in pathogenesis of myeloid malignancies. *Blood Cancer J.* 3, e117.

Sinnberg, T., Menzel, M., Kaesler, S., Biedermann, T., Sauer, B., Nahnsen, S., Schwarz, M., Garbe, C., and Schitteck, B. (2010). Suppression of casein kinase 1alpha in melanoma cells induces a switch in beta-catenin signaling to promote metastasis. *Cancer Res.* 70, 6999–7009.

Sloand, E.M., Wu, C.O., Greenberg, P., Young, N., and Barrett, J. (2008). Factors affecting response and survival in patients with myelodysplasia

treated with immunosuppressive therapy. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26, 2505–2511.

Smith, L.M., Sanders, J.Z., Kaiser, R.J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C.R., Heiner, C., Kent, S.B., and Hood, L.E. (1986). Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321, 674–679.

Smith, S.M., Le Beau, M.M., Huo, D., Karrison, T., Sobecks, R.M., Anastasi, J., Vardiman, J.W., Rowley, J.D., and Larson, R.A. (2003). Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: the University of Chicago series. *Blood* 102, 43–52.

Sokal, G., Michaux, J.L., Van Den Berghe, H., Cordier, A., Rodhain, J., Ferrant, A., Moriau, M., De Bruyere, M., and Sonnet, J. (1975). A new hematologic syndrome with a distinct karyotype: the 5 q--chromosome. *Blood* 46, 519–533.

Solé, F., Espinet, B., Sanz, G.F., Cervera, J., Calasanz, M.J., Luño, E., Prieto, F., Granada, I., Hernández, J.M., Cigudosa, J.C., et al. (2000). Incidence, characterization and prognostic significance of chromosomal abnormalities in 640 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica. Br. J. Haematol.* 108, 346–356.

Solé, F., Luño, E., Sanzo, C., Espinet, B., Sanz, G.F., Cervera, J., Calasanz, M.J., Cigudosa, J.C., Millà, F., Ribera, J.M., et al. (2005). Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 90, 1168–1178.

Solinas-Toldo, S., Lampel, S., Stilgenbauer, S., Nickolenko, J., Benner, A., Döhner, H., Cremer, T., and Lichter, P. (1997). Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes. Chromosomes Cancer* 20, 399–407.

Starczynowski, D.T., Kuchenbauer, F., Argiropoulos, B., Sung, S., Morin, R., Muranyi, A., Hirst, M., Hogge, D., Marra, M., Wells, R.A., et al. (2010). Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q-syndrome phenotype. *Nat. Med.* 16, 49–58.

Steensma, D.P., Dewald, G.W., Lasho, T.L., Powell, H.L., McClure, R.F., Levine, R.L., Gilliland, D.G., and Tefferi, A. (2005). The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both “atypical” myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood* 106, 1207–1209.

Steensma, D.P., Bejar, R., Jaiswal, S., Lindsley, R.C., Sekeres, M.A., Hasserjian, R.P., and Ebert, B.L. (2015). Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood* 126, 9–16.

Strom, S.S., Vélez-Bravo, V., and Estey, E.H. (2008). Epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Semin. Hematol.* 45, 8–13.

Strupp, C., Gattermann, N., Giagounidis, A., Aul, C., Hildebrandt, B., Haas, R., and Germing, U. (2003). Refractory anemia with excess of blasts in transformation: analysis of reclassification according to the WHO proposals. *Leuk. Res.* 27, 397–404.

Sugimoto, K., Hirano, N., Toyoshima, H., Chiba, S., Mano, H., Takaku, F., Yazaki, Y., and Hirai, H. (1993). Mutations of the p53 gene in myelodysplastic syndrome (MDS) and MDS-derived leukemia. *Blood* 81, 3022–3026.

Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J., and Vardiman, J.W. (2008). *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* (Lyon, France).

Tefferi, A., and Vardiman, J.W. (2009). Myelodysplastic syndromes. *N. Engl. J. Med.* 361, 1872–1885.

Tiu, R.V., Gondek, L.P., O'Keefe, C.L., Elson, P., Huh, J., Mohamedali, A., Kulasekararaj, A., Advani, A.S., Paquette, R., List, A.F., et al. (2011). Prognostic impact of SNP array karyotyping in myelodysplastic syndromes and related myeloid malignancies. *Blood* 117, 4552–4560.

Toma, A., Fenaux, P., Dreyfus, F., and Cordonnier, C. (2012). Infections in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 97, 1459–1470.

Toyama, K., Ohyashiki, K., Yoshida, Y., Abe, T., Asano, S., Hirai, H., Hirashima, K., Hotta, T., Kuramoto, A., and Kuriya, S. (1993). Clinical implications of chromosomal abnormalities in 401 patients with myelodysplastic syndromes: a multicentric study in Japan. *Leukemia* 7, 499–508.

Traina, F., Visconte, V., Elson, P., Tabarrok, A., Jankowska, A.M., Hasrouni, E., Sugimoto, Y., Szpurka, H., Makishima, H., O'Keefe, C.L., et al. (2014). Impact of molecular mutations on treatment response to DNMT inhibitors in myelodysplasia and related neoplasms. *Leukemia* 28, 78–87.

Trost, D., Hildebrandt, B., Beier, M., Müller, N., Germing, U., and Royer-Pokora, B. (2006). Molecular cytogenetic profiling of complex karyotypes in primary myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* 165, 51–63.

Tsuchiya, D., Matsumoto, A., Covert, S.F., Bronson, C.R., and Taga, M. (2002). Physical mapping of plasmid and cosmid clones in filamentous fungi by fiber-FISH. *Fungal Genet. Biol.* FG B 37, 22–28.

Tuzuner, N., Cox, C., Rowe, J.M., Watrous, D., and Bennett, J.M. (1995). Hypocellular myelodysplastic syndromes (MDS): new proposals. *Br. J. Haematol.* 91, 612–617.

Vaidya, R., Caramazza, D., Begna, K.H., Gangat, N., Van Dyke, D.L., Hanson, C.A., Pardhanani, A., and Tefferi, A. (2011). Monosomal karyotype in primary myelofibrosis is detrimental to both overall and leukemia-

free survival. *Blood* 117, 5612–5615.

Vainchenker, W., Delhommeau, F., Constantinescu, S.N., and Bernard, O.A. (2011). New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood* 118, 1723–1735.

Valent, P., Horny, H.-P., Bennett, J.M., Fonatsch, C., Germing, U., Greenberg, P., Haferlach, T., Haase, D., Kolb, H.-J., Krieger, O., et al. (2007). Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leuk. Res.* 31, 727–736.

Valent, P., Bain, B.J., Bennett, J.M., Wimazal, F., Sperr, W.R., Mufti, G., and Horny, H.-P. (2012). Idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS) and idiopathic dysplasia of uncertain significance (IDUS), and their distinction from low risk MDS. *Leuk. Res.* 36, 1–5.

Vallespi, T., Imbert, M., Mecucci, C., Preudhomme, C., and Fenaux, P. (1998). Diagnosis, classification, and cytogenetics of myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 83, 258–275.

Vardiman, J. (2012). The classification of MDS: from FAB to WHO and beyond. *Leuk. Res.* 36, 1453–1458.

Vardiman, J.W., Harris, N.L., and Brunning, R.D. (2002). The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 100, 2292–2302.

Vardiman, J.W., Thiele, J., Arber, D.A., Brunning, R.D., Borowitz, M.J., Porwit, A., Harris, N.L., Le Beau, M.M., Hellström-Lindberg, E., Tefferi, A., et al. (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114, 937–951.

Verburgh, E., Achten, R., Maes, B., Hagemeijer, A., Boogaerts, M., De

Wolf-Peeters, C., and Verhoef, G. (2003). Additional prognostic value of bone marrow histology in patients subclassified according to the International Prognostic Scoring System for myelodysplastic syndromes. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 21, 273–282.

Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A., and Kinzler, K.W. (2013). Cancer genome landscapes. *Science* 339, 1546–1558.

Waanders, E., Scheijen, B., van der Meer, L.T., van Reijmersdal, S.V., van Emst, L., Kroeze, Y., Sonneveld, E., Hoogerbrugge, P.M., van Kessel, A.G., van Leeuwen, F.N., et al. (2012). The origin and nature of tightly clustered BTG1 deletions in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia support a model of multiclonal evolution. *PLoS Genet.* 8, e1002533.

Walter, M.J., Ding, L., Shen, D., Shao, J., Grillot, M., McLellan, M., Fulton, R., Schmidt, H., Kalicki-Veizer, J., O’Laughlin, M., et al. (2011). Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 25, 1153–1158.

Wang, P.W., Eisenbart, J.D., Espinosa, R., Davis, E.M., Larson, R.A., and Le Beau, M.M. (2000). Refinement of the smallest commonly deleted segment of chromosome 20 in malignant myeloid diseases and development of a PAC-based physical and transcription map. *Genomics* 67, 28–39.

Washington, L.T., Doherty, D., Glassman, A., Martins, J., Ibrahim, S., and Lai, R. (2002). Myeloid disorders with deletion of 5q as the sole karyotypic abnormality: the clinical and pathologic spectrum. *Leuk. Lymphoma* 43, 761–765.

Weber, F.P. (1904). A Case of Leukanaemia: With Great Hyperplasia of the Spleen and Prevertebral Haemolymph Glands and with Increase of Connective Tissue in the Bone Marrow. *Br. Med. J.* 1, 1416–1418.

Wei, S., Chen, X., Rocha, K., Epling-Burnette, P.K., Djeu, J.Y., Liu, Q.,

Byrd, J., Sokol, L., Lawrence, N., Pireddu, R., et al. (2009). A critical role for phosphatase haplodeficiency in the selective suppression of deletion 5q MDS by lenalidomide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 12974–12979.

Wei, S., Chen, X., McGraw, K., Zhang, L., Komrokji, R., Clark, J., Caceres, G., Billingsley, D., Sokol, L., Lancet, J., et al. (2013). Lenalidomide promotes p53 degradation by inhibiting MDM2 auto-ubiquitination in myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *Oncogene* 32, 1110–1120.

Welch, J.S., Ley, T.J., Link, D.C., Miller, C.A., Larson, D.E., Koboldt, D.C., Wartman, L.D., Lamprecht, T.L., Liu, F., Xia, J., et al. (2012). The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell* 150, 264–278.

Westers, T.M., Ireland, R., Kern, W., Alhan, C., Balleisen, J.S., Bettelheim, P., Burbury, K., Cullen, M., Cutler, J.A., Della Porta, M.G., et al. (2012). Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: a report from an international consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leukemia* 26, 1730–1741.

Wijermans, P., Lübbert, M., Verhoef, G., Bosly, A., Ravoet, C., Andre, M., and Ferrant, A. (2000). Low-dose 5-aza-2'-deoxycytidine, a DNA hypomethylating agent, for the treatment of high-risk myelodysplastic syndrome: a multicenter phase II study in elderly patients. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 18, 956–962.

Williamson, P.J., Kruger, A.R., Reynolds, P.J., Hamblin, T.J., and Oscier, D.G. (1994). Establishing the incidence of myelodysplastic syndrome. *Br. J. Haematol.* 87, 743–745.

Wimazal, F., Sperr, W.R., Kundi, M., Meidlinger, P., Fonatsch, C., Jordan, J.H., Thalhammer-Scherrer, R., Schwarzinger, I., Geissler, K., Lechner, K., et al. (2001). Prognostic value of lactate dehydrogenase activity in

myelodysplastic syndromes. *Leuk. Res.* 25, 287–294.

Wimazal, F., Fonatsch, C., Thalhammer, R., Schwarzinger, I., Müllauer, L., Sperr, W.R., Bennett, J.M., and Valent, P. (2007). Idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS) versus low risk MDS: the diagnostic interface. *Leuk. Res.* 31, 1461–1468.

Wimazal, F., Sperr, W.R., Kundi, M., Vales, A., Fonatsch, C., Thalhammer-Scherrer, R., Schwarzinger, I., and Valent, P. (2008). Prognostic significance of serial determinations of lactate dehydrogenase (LDH) in the follow-up of patients with myelodysplastic syndromes. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* 19, 970–976.

Wyandt, H.E., Chinnappan, D., Ioannidou, S., Salama, M., and O'Hara, C. (1998). Fluorescence in situ hybridization to assess aneuploidy for chromosomes 7 and 8 in hematologic disorders. *Cancer Genet. Cytogenet.* 102, 114–124.

Xie, M., Lu, C., Wang, J., McLellan, M.D., Johnson, K.J., Wendl, M.C., McMichael, J.F., Schmidt, H.K., Yellapantula, V., Miller, C.A., et al. (2014). Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat. Med.* 20, 1472–1478.

Ximeri, M., Galanopoulos, A., Klaus, M., Parcharidou, A., Giannikou, K., Psyllaki, M., Symeonidis, A., Pappa, V., Kartasis, Z., Liapi, D., et al. (2010). Effect of lenalidomide therapy on hematopoiesis of patients with myelodysplastic syndrome associated with chromosome 5q deletion. *Haematologica* 95, 406–414.

Yang, L., Rau, R., and Goodell, M.A. (2015). DNMT3A in haematological malignancies. *Nat. Rev. Cancer* 15, 152–165.

Yoshida, K., Sanada, M., Shiraishi, Y., Nowak, D., Nagata, Y., Yamamoto, R., Sato, Y., Sato-Otsubo, A., Kon, A., Nagasaki, M., et al. (2011). Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia.

Nature 478, 64–69.

Zhao, N., Stoffel, A., Wang, P.W., Eisenbart, J.D., Espinosa, R., Larson, R.A., and Le Beau, M.M. (1997). Molecular delineation of the smallest commonly deleted region of chromosome 5 in malignant myeloid diseases to 1-1.5 Mb and preparation of a PAC-based physical map. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94, 6948–6953.

ANEXO

“La acción es la llave fundacional de todo éxito”
Pablo Picasso

8 ANEXO

8.1 ARTÍCULO CIENTÍFICO PUBLICADO CON PARTE DE LOS ESTUDIOS REALIZADOS MEDIANTE NEXT-GENERATION SEQUENCING: SCHNEIDER RK, ADEMÀ V, HECKL D, JÄRÅS M, MALLO M, LORD AM, CHU LP, MCCONKEY ME, KRAMANN R, MULLALLY A, BEJAR R, SOLÉ F, EBERT BL. ROLE OF CASEIN KINASE 1A1 IN THE BIOLOGY AND TARGETED THERAPY OF DEL(5Q) MDS. CANCER CELL. 2014 OCT 13;26(4):509-20.

Role of Casein Kinase 1A1 in the Biology and Targeted Therapy of del(5q) MDS

Rebekka K. Schneider,¹ Vera Ademà,^{2,3,4} Dirk Heckl,¹ Marcus Järås,¹ Mar Mallo,^{2,3} Allegra M. Lord,¹ Lisa P. Chu,¹ Marie E. McConkey,¹ Rafael Kramann,⁵ Ann Mullally,¹ Rafael Bejar,⁶ Francesc Solé,^{2,3} and Benjamin L. Ebert^{1,7,*}

¹Division of Hematology, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA

²Josep Carreras Leukaemia Research Institute (JC), ICO-Hospital Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), 08916 Badalona, Spain

³Laboratori de Citogenètica Molecular, Servei de Patologia, Hospital del Mar, GRETNHE, IMIM (Hospital del Mar Research Institute), 08003 Barcelona, Spain

⁴Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Barcelona, Spain

⁵Renal Division, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA 02115, USA

⁶Division of Hematology and Oncology, Moores Cancer Center, University of California, San Diego, La Jolla, CA 92093-0820, USA

⁷Broad Institute of Harvard University and Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02142, USA

*Correspondence: bebert@partners.org

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2014.08.001>

SUMMARY

The casein kinase 1A1 gene (*CSNK1A1*) is a putative tumor suppressor gene located in the common deleted region for del(5q) myelodysplastic syndrome (MDS). We generated a murine model with conditional inactivation of *Csnk1a1* and found that *Csnk1a1* haploinsufficiency induces hematopoietic stem cell expansion and a competitive repopulation advantage, whereas homozygous deletion induces hematopoietic stem cell failure. Based on this finding, we found that heterozygous inactivation of *Csnk1a1* sensitizes cells to a *CSNK1* inhibitor relative to cells with two intact alleles. In addition, we identified recurrent somatic mutations in *CSNK1A1* on the nondeleted allele of patients with del(5q) MDS. These studies demonstrate that *CSNK1A1* plays a central role in the biology of del(5q) MDS and is a promising therapeutic target.

INTRODUCTION

Deletions of chromosome 5q are the most common cytogenetic abnormalities in myelodysplastic syndrome (MDS), and patients with isolated del(5q) have a distinct clinical phenotype (Ebert, 2011; Haase et al., 2007; Hasserjian et al., 2008). To date, no genes within the common deleted regions (CDRs) have been found to undergo homozygous inactivation, copy-neutral loss of heterozygosity, or recurrent mutation (Gondek et al., 2008; Graubert et al., 2009; Heinrichs et al., 2009; Jerez et al., 2012; Mallo et al., 2013). Functional studies have revealed individual genes that contribute cooperatively to the clinical phenotype through genetic haploinsufficiency (Boultonwood et al., 2010; Chen et al., 2011; Ebert, 2011; Kumar et al., 2011; Lane et al., 2010; Starczynowski et al., 2010). Heterozygous loss of the *RPS14* gene, for example, has been linked to impaired erythro-

poiesis via p53 activation (Dutt et al., 2011; Ebert et al., 2008). While several 5q genes have been reported to alter hematopoietic stem cell (HSC) function, the mechanism of clonal dominance of del(5q) cells remains a critical unsolved question (Joslin et al., 2007; Lane et al., 2010; Min et al., 2008; Wang et al., 2010a).

CSNK1A1 encodes casein kinase 1 α (CK1 α), a serine/threonine kinase, and is located in the distal CDR (5q32) in del(5q) MDS. In a careful study of gene expression in CD34⁺ cells from a large cohort of del(5q) and other MDS cases, *CSNK1A1* was one of the few genes in the del(5q) CDR that has approximately 50% normal expression (Boultonwood et al., 2007). Recent studies demonstrated that *CSNK1A1* is a tumor suppressor gene in colon cancer and melanoma, controlling proliferation by its function as a central regulator of β -catenin activity (Elyada et al., 2011; Sinnberg et al., 2010). In hematopoiesis, stem and progenitor cells respond in a graded fashion to canonical Wnt/ β -catenin

Significance

Our studies provide functional and genetic evidence indicating that *CSNK1A1* plays a central role in the pathogenesis of del(5q) MDS. We found that heterozygous inactivation of *Csnk1a1* causes hematopoietic stem cell expansion and β -catenin activation. In addition, we found that *Csnk1a1* haploinsufficiency sensitizes cells to casein kinase inhibition, demonstrating an approach for the targeting of heterozygous deletions in cancer. While no recurrently mutated genes have been previously identified in genes within the common deleted regions of chromosome 5q, we found recurrent mutations in *CSNK1A1* in a subset of del(5q) MDS patients. In aggregate, these findings indicate that *CSNK1A1* is a promising therapeutic target for the treatment of del(5q) MDS.

signaling (Luis et al., 2011). Constitutive activation of β -catenin has been reported to increase HSC numbers followed by apoptosis, HSC depletion, and bone marrow failure (Kirstetter et al., 2006; Scheller et al., 2006). In contrast, less profound activation is associated with HSC expansion with enhanced repopulation potential (Trowbridge et al., 2006). APC, like CK1 α , is a member of the β -catenin destruction complex and is inactivated in approximately 95% of cases with del(5q) MDS. Mice with heterozygous deletion of *Apc* (Wang et al., 2010a) or heterozygous for the *Apc*^{Min} allele (Lane et al., 2010) have increased repopulation potential in primary bone marrow transplants but decreased repopulation potential of secondary transplants due to loss of HSC quiescence.

We sought to explore whether haploinsufficiency or mutation of *Csnk1a1* contributes to the biology of del(5q) MDS. In addition, given evidence that *Csnk1a1* is selectively essential for murine MLL-AF9 leukemia cells relative to normal hematopoietic cells (Järås et al., 2014), we investigated whether CK1 α is a therapeutic target in del(5q) MDS.

RESULTS

Csnk1a1 Is Required for Adult Murine Hematopoiesis

To explore the role of *Csnk1a1* on HSC function, we generated a mouse model in which *Csnk1a1* exon 3, essential for CK1 α kinase function (Bidère et al., 2009), is flanked by loxP sites. Following crosses to *Mx1Cre* transgenic mice, we induced *Csnk1a1* excision in hematopoietic cells by polyinosinic-polycytidylic acid [poly(I:C)] and confirmed decreased messenger RNA and protein expression (Figure 1A; Figure S1A available online).

We first examined whether *Csnk1a1* plays a critical role in hematopoiesis. Homozygous deletion of *Csnk1a1* in the hematopoietic system (*Csnk1a1*^{-/-}*Mx1Cre*⁺) resulted in rapid lethality 5–17 days after gene excision, accompanied by a significant decrease in all peripheral blood counts and histologic evidence of fulminant bone marrow failure with evidence of ischemia in multiple organs (Figures 1B–1E and S1B).

We next examined whether the observed hematologic abnormalities were associated with changes in hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs). Ten days after *Csnk1a1* excision, *Csnk1a1*^{-/-}*Mx1Cre*⁺ mice had a highly significant reduction of HSCs (LSK; Lin^{low}Sca-1⁺ckit⁺), including long-term (LT; Lin^{low}Sca-1⁺ckit⁺CD150⁺CD48⁻) and short-term (ST; Lin^{low}Sca-1⁺ckit⁺CD150⁻CD48⁻)-HSCs and multipotent progenitor cells (MPPs; Lin^{low}Sca-1⁺ckit⁺CD150⁻CD48⁺), indicating that *Csnk1a1* is essential for HSC survival (Figures 1F and S1C).

CK1 α is a major regulator of p53 activity, so we investigated whether *Csnk1a1* ablation activates p53 in the bone marrow (Elyada et al., 2011; Wu et al., 2012). Homozygous, but not heterozygous, *Csnk1a1* deletion caused accumulation of p53 as well as of p21, a p53 target, demonstrating that p53 is both present and active (Figure 1G). Consistent with this finding, we found that only complete ablation of *Csnk1a1* led to significant induction of early and late apoptoses (Figures 1H and S1D). *Csnk1a1*-ablated HSCs exited quiescence and entered the cell cycle, with a marked decrease in the number of *Csnk1a1*^{-/-}*Mx1Cre*⁺ HSC (LSK) in G0 and a significant increase in S/G2/M compared to *Mx1Cre*⁺ controls (Figure 1I and Figures S1E and S1F).

Csnk1a1 Loss Induces Increased β -Catenin Levels in Both Hematopoietic and Stromal Cells

CK1 α is a critical regulator of β -catenin (Cheong and Virshup, 2011). In our murine model, heterozygous and homozygous knockout of *Csnk1a1* induced strong nuclear accumulation of β -catenin (Figure 1J). In the heterozygous knockout bone marrow, positive staining was predominantly in hematopoietic cells proximal to endothelial and endosteal cells, while in the homozygous knockout bone marrow, β -catenin nuclear accumulation was observed in nearly all cell types, highlighting graded β -catenin activation by *Csnk1a1* gene dosage.

In addition, we observed a striking accumulation of β -catenin in the bone marrow stroma cells of heterozygous and homozygous *Csnk1a1* knockout mice, consistent with the expression of *Mx1Cre* in bone marrow stroma (Walkley et al., 2007). We validated this finding in mesenchymal stroma cells (MSCs) isolated from endosteal bone (Zhu et al., 2010) and confirmed *Csnk1a1* excision in the stroma (Figure S1G). We found strong β -catenin expression in MSCs from heterozygous *Csnk1a1* knockout mice and even more pronounced expression in homozygous knockout mice (Figure S1H). In *in vitro* long-term culture initiating cell assays, both *Csnk1a1*^{-/+}*Mx1Cre*⁺ and *Csnk1a1*^{-/-}*Mx1Cre*⁺ MSC had significantly impaired hematopoiesis-supporting capacity. Inactivation of β -catenin rescued the effect of *Csnk1a1* loss in stromal cells (Figure S1I). The hematopoietic effects of *Csnk1a1* haploinsufficiency that we found *in vitro* were also observed *in vivo*. Eight weeks after poly(I:C) treatment, we observed a significant reduction in bone marrow cellularity and in the percentage of LT- and ST-HSCs in *Csnk1a1*^{-/+}*Mx1Cre*⁺ mice compared to *Mx1Cre*⁺ controls (Figures S1J–S1M). Consistent with this finding, the survival of *Csnk1a1*^{-/+}*Mx1Cre*⁺ primary mice was significantly impaired (Figure 1B). After 15 months, *Csnk1a1*^{-/+}*Mx1Cre*⁺ mice developed pancytopenia, a significant decrease in the LT-HSCs and ST-HSCs, and a near-complete loss of myeloid progenitor cells (Figures S1N–S1V). These results are comparable to the recently described consequences of constitutively active β -catenin in osteoblasts (Kode et al., 2014), although we did not observe any evidence of malignant transformation in *Csnk1a1*^{-/+}*Mx1Cre*⁺ mice at 15 months.

Cell Intrinsic *Csnk1a1* Ablation Leads to Bone Marrow Failure

Having observed that *Csnk1a1* excision in primary *Mx1Cre*⁺ mice has striking effects on hematopoiesis, and given the cell-extrinsic effects of stromal β -catenin activation on hematopoietic cells (Kode et al., 2014; Lane et al., 2010; Stoddart et al., 2014; Wang et al., 2010a), we examined the cell-intrinsic effects of *Csnk1a1* inactivation in hematopoietic cells using bone marrow transplantation into wild-type (WT) recipient mice. We transplanted whole bone marrow cells from *Csnk1a1*^{-/-}*Mx1Cre*⁺ or *Mx1Cre*⁺ mice (CD45.2⁺) into lethally irradiated WT recipient mice (CD45.1⁺). Prior to induction of *Csnk1a1* excision, 4 weeks after transplantation, more than 90% of peripheral blood cells in recipient mice were reconstituted with donor-derived CD45.2⁺ cells. All recipient chimeric mice reconstituted with *Csnk1a1*^{-/-}*Mx1Cre*⁺ cells became moribund with bone marrow failure 8–14 days after *Csnk1a1* excision (Figure 2A; Figures S2A–S2C). Flow cytometric analysis revealed a complete loss of HSPCs in

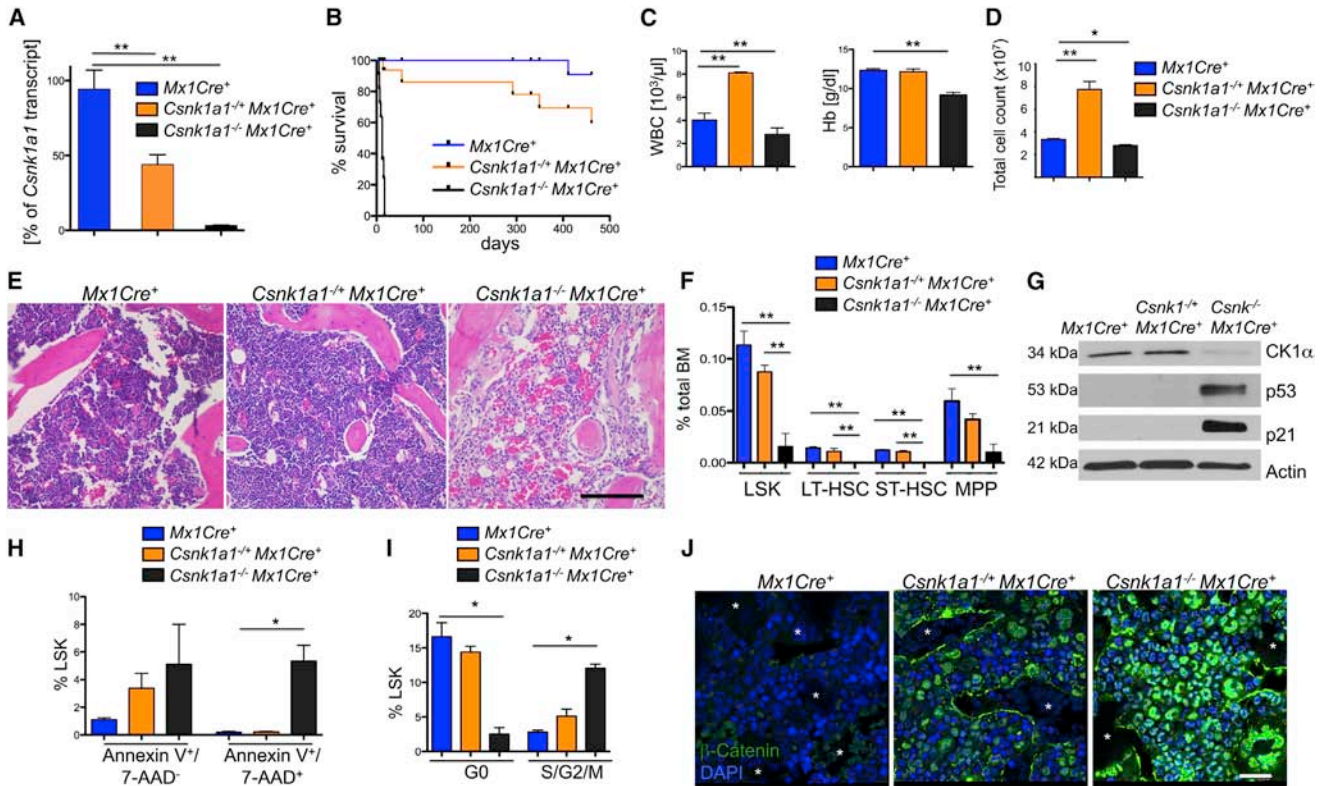


Figure 1. Conditional Homozygous Inactivation of *Csnk1a1* Results in HSPC Ablation

(A) Deletion of *Csnk1a1* in whole bone marrow cells was determined 7 days after poly(I:C) induction by quantification of *Csnk1a1* transcript levels by quantitative real-time PCR. Data are presented as remaining *Csnk1a1* transcript expression in percent relative to *Mx1Cre*⁺ control mice (mean ± SD, n = 3; **p < 0.001). (B) Kaplan-Meier survival curve of *Csnk1a1*^{-/-}*Mx1Cre*⁺ (n = 10), *Csnk1a1*^{-/-}*Mx1Cre*⁺ (n = 10), and *Mx1Cre*⁺ (n = 10) control mice. Time point 0 is the day of the first of three poly(I:C) inductions. (C) Absolute numbers of white blood cells (WBC) and hemoglobin (Hb) levels in peripheral blood from *Csnk1a1*^{-/-}*Mx1Cre*⁺, *Csnk1a1*^{-/-}*Mx1Cre*⁺, and *Mx1Cre*⁺ controls 10 days after poly(I:C) induction (mean ± SD, n = 3; **p < 0.001). (D) Numbers of whole bone marrow cells collected from tibias, femurs, and pelvis of *Mx1Cre*⁺, *Csnk1a1*^{-/-}*Mx1Cre*⁺, and *Csnk1a1*^{-/-}*Mx1Cre*⁺ 10 days after poly(I:C) induction (mean ± SD; n = 3; *p < 0.05, **p < 0.001). (E) Histological analysis of H&E-stained spine from *Csnk1a1*^{-/-}*Mx1Cre*⁺, *Csnk1a1*^{-/-}*Mx1Cre*⁺, and *Mx1Cre*⁺ controls 10 days after poly(I:C). Scale bar, 200 μm. (F) Analysis of the HSC compartment, defined as LSK cells, LT-HSCs, ST-HSCs and MPPs, in the bone marrow (BM) from *Csnk1a1*^{-/-}*Mx1Cre*⁺, *Csnk1a1*^{-/-}*Mx1Cre*⁺, and *Mx1Cre*⁺ controls 10 days after poly(I:C) (mean ± SD, n = 5; **p < 0.001). (G) Western blot of whole bone marrow lysate 8 days after induction of poly(I:C). (H) Apoptosis was assessed in the LSK fraction from bone marrow by Annexin V and 7-AAD staining (early apoptosis: Annexin V⁺/7-AAD⁻; late apoptosis: Annexin V⁺/7-AAD⁺ (mean ± SD, n = 3; *p < 0.05). (I) Cell cycle was analyzed by combined proliferation (Ki67) and cell cycle (Hoechst 33342) staining in permeabilized LSK from bone marrow (G0: Ki67⁻/Hoechst⁻; S/G2/M: Ki67⁺/Hoechst⁺) (mean ± SD, n = 5; *p < 0.05). (J) Immunofluorescence staining of paraffin-embedded bone marrow with an antibody against β-catenin (DAPI counterstaining). Asterisks highlight erythrocyte-filled sinusoids. Scale bar, 20 μm. See also Figure S1.

recipient mice. These studies confirm that a cell-intrinsic function of *Csnk1a1* is essential for hematopoiesis.

In striking contrast to mice transplanted with *Csnk1a1*^{-/-}*Mx1Cre*⁺ cells, mice transplanted with *Csnk1a1*^{-/-}*Mx1Cre*⁺ had no change in survival compared to *Mx1Cre*⁺ control mice (Figure S2A). Transplanted *Csnk1a1* haploinsufficient hematopoietic cells fully reconstituted the bone marrow, resulting in a normal-to-hypercellular marrow, a normal hemoglobin, and significantly elevated white blood cell counts with lymphocytosis (Figures 2B–2D). The lymphocytosis was caused by an increase in T cells, consistent with reports demonstrating that moderate Wnt activation promotes T cell differentiation (Luis et al., 2011,

2012). The percentage of Gr1⁺CD11b⁺ myeloid cells (Figure 2E) and CD19⁺ B cells (Figure S2D) was not affected.

Pathological evaluation of the *Csnk1a1* haploinsufficient bone marrow revealed increased and mildly dysplastic hypoblobulated (micro)megakaryocytes in atypical locations, reminiscent of the megakaryocyte morphology in del(5q) MDS (Figures 2F, S2E, and S2F). This phenotype was recapitulated in vitro when whole bone marrow cells were cultured in the presence of 10 ng/ml murine thrombopoietin. Nuclear ploidy analysis of the CD41⁺ megakaryocytes revealed a shift toward hypoploidy, consistent with hypoblobulation apparent in cytopins of the cultures (Figures 2G and 2H). Over time,

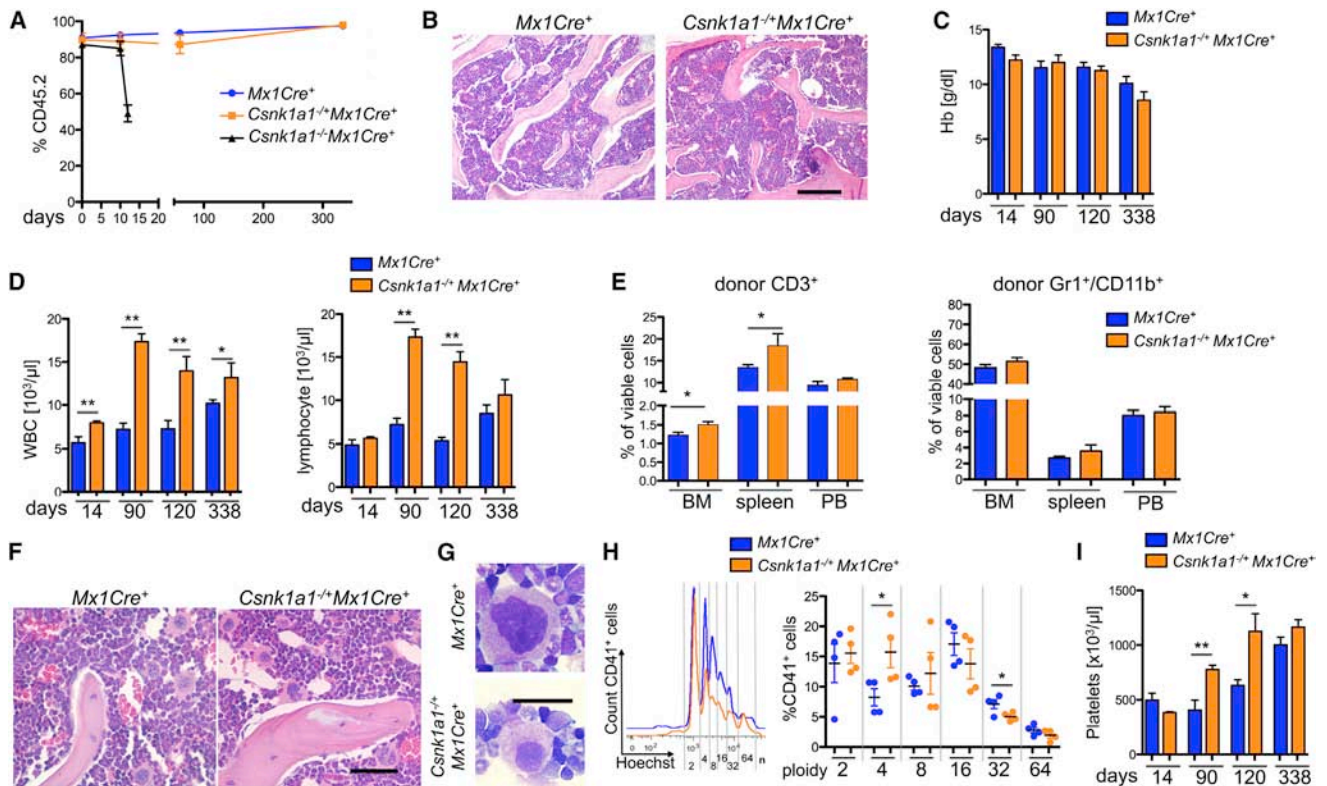


Figure 2. Homozygous *Csnk1a1* Inactivation Causes Cell-Intrinsic HSC Ablation, while *Csnk1a1* Heterozygous Inactivation Causes Cell-Intrinsic Lineage Expansion

(A) Donor chimerism (CD45.2) of *Csnk1a1*^{-/-}*Mx1Cre*⁺, *Csnk1a1*^{+/-}*Mx1Cre*⁺, and *Mx1Cre*⁺-derived hematopoietic cells was monitored over time (mean ± SD, n = 7).

(B) Histomorphological analysis of transplanted *Csnk1a1*^{-/-}*Mx1Cre*⁺ and *Mx1Cre*⁺ cells 8 weeks after poly(I:C) induction. Scale bar, 200 μm.

(C) Hemoglobin (Hb) levels were followed over time (mean ± SD, n = 7).

(D) White blood cell and lymphocyte count were monitored over time (mean ± SD, n = 7; *p < 0.05, **p < 0.001).

(E) Distribution of donor-derived (CD45.2⁺) myeloid cells (Gr1⁺/CD11b⁺) and T cells (CD3⁺) was analyzed by flow cytometry in bone marrow, spleen, and peripheral blood (mean ± SD, n = 5; *p < 0.05).

(F) Histomorphological analysis of megakaryocyte dysplasia in transplanted *Mx1Cre*⁺ and *Csnk1a1*^{-/-}*Mx1Cre*⁺ 8 weeks after poly(I:C) induction. Scale bar, 100 μm.

(G) Detailed megakaryocyte morphology on cytospin preparations (May-Grünwald-Giemsa staining, oil immersion) Scale bar, 20 μm.

(H) Representative ploidy analysis and quantification on CD45.2⁺, CD41⁺ megakaryocytes using Hoechst 33342 staining on fixed and permeabilized cells (mean ± SD, n = 4; *p < 0.05).

(I) Platelet counts were taken over time (mean ± SD, n = 7; *p < 0.05, **p < 0.001).

See also Figure S2.

the mice developed a significantly elevated platelet count (Figure 2I).

Haploinsufficiency of *Csnk1a1* Leads to β -Catenin Activation and Cell-Intrinsic Expansion of HSCs

CSNK1A1 has been reported to be a tumor suppressor gene in solid tumors due to activation of β -catenin (Elyada et al., 2011; Sinnberg et al., 2010). We first examined whether *Csnk1a1* haploinsufficiency causes a cell-intrinsic effect on the number and function of HSCs in a noncompetitive transplantation assay. We found an increase in the percentage of the HSC-enriched LSK compartment, in contrast to the decrease in LSK and Lin^{low}ckit⁺Sca-1⁻ (LK) cells observed in the setting of an abnormal microenvironment in primary *Mx1Cre*⁺ animals (Figures 1F, S1M, and S1R). In particular, the proportion of LT-HSCs was significantly elevated (Figure 3A).

To analyze whether HSC expansion might be due to exit from quiescence and enhanced HSC proliferation, we performed cell cycle analysis on HSPCs. In comparison to CD45.2⁺ *Mx1Cre*⁺ control baseline hematopoiesis, CD45.2⁺ LSK cells and LT-HSCs from *Csnk1a1*^{-/-}*Mx1Cre*⁺ cells had a significantly lower percentage of cells in the quiescent G0 fraction (in LT-HSCs but not LSK cells) and a significantly higher percentage of cells in the cycling G1 fraction (Figure 3B) and in the S phase as seen by bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation (Figure S3A), consistent with exit from quiescence.

We next examined whether *Csnk1a1* heterozygous HSCs have altered β -catenin or cyclin D1 activity, as these pathways could contribute to decreased quiescence. *Csnk1a1*^{+/-}*Mx1Cre*⁺ hematopoietic cells, transplanted into WT mice, had increased nuclear β -catenin accumulation by immunohistochemistry

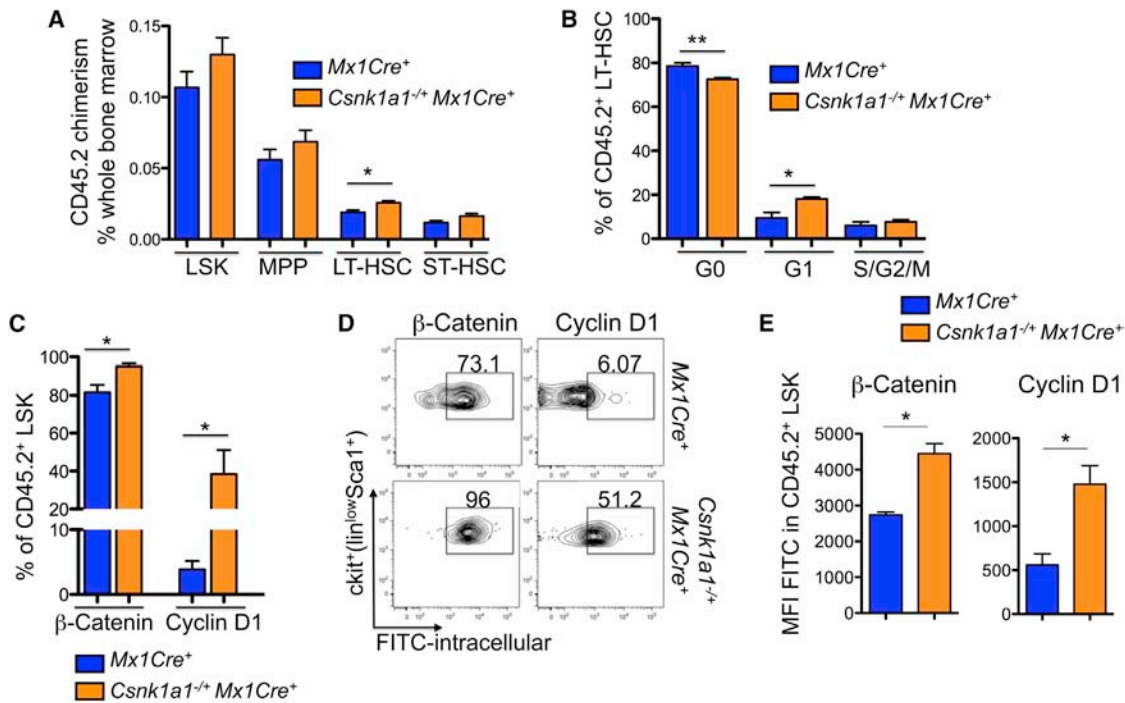


Figure 3. Haploinsufficiency of *Csnk1a1* Leads to Cell-Intrinsic Expansion of Transplanted HSCs

(A) HSC chimerism (CD45.2) was analyzed in CD45.1 mice repopulated with *Csnk1a1*^{-/-}*Mx1Cre*⁺ and *Mx1Cre*⁺ cells 8 weeks after induction with poly(I:C) in the LSK cells, MPPs, LT-HSCs, and ST-HSCs (mean ± SD, n = 5; *p < 0.05).

(B) Cell cycle was analyzed by combined proliferation (Ki67) and cell cycle (Hoechst 33342) staining in permeabilized LSK cells and LT-HSCs from bone marrow (G0: Ki67⁻/Hoechst⁺; S/G2/M: Ki67⁺/Hoechst⁺) (mean ± SD, n = 5; *p < 0.05, **p < 0.001).

(C) Intracellular flow cytometry for β-catenin and cyclin D1 (fluorescein isothiocyanate [FITC]-labeled secondary antibody each) on the CD45.2⁺ viable LSK population (mean ± SD, n = 3; *p < 0.05).

(D) Corresponding representative flow blots to the quantitative analysis of intracellular β-catenin and cyclin D1 accumulation.

(E) Mean fluorescence intensity (MFI) of intracellular β-catenin and cyclin D1 in LSK cells (mean ± SD, n = 3; *p < 0.05).

See also Figure S3.

(Figure S3B) and by intracellular flow cytometry (Figures 3C–3E). We found increased β-catenin in the stem-cell-enriched LSK fraction. β-catenin accumulation in HSCs was accompanied by significantly increased expression of cyclin D1, a major regulator of cell cycle progression, corroborating the G1-phase progression in the cell cycle of *Csnk1a1* haploinsufficient cells. In the lineage-positive fraction, the differences in β-catenin were not apparent. These experiments demonstrate that heterozygous *Csnk1a1* inactivation is associated with increased levels of β-catenin in the HSC.

As heterozygous deletion of *APC* occurs in approximately 95% of MDS cases and *APC* and *CK1α* are both negative regulators of β-catenin, we analyzed the combinatorial effect of *Csnk1a1* and *Apc* on β-catenin levels and HSC expansion (Figure S3F). Compound heterozygous (*Csnk1a1*^{-/-}*Apc*^{-/-}*Mx1Cre*⁺) hematopoietic cells were transplanted into lethally irradiated mice and analyzed over a period of 52 weeks. Compound heterozygous inactivation of *Csnk1a1* and *Apc* resulted in significantly increased LT-HSCs, increased β-catenin levels, and increased activation of the cell cycle in HSCs in long-term transplants (Figures S3G–S3J). In aggregate, our data highlight a central role for β-catenin in the pathophysiology of del(5q) MDS.

Csnk1a1 Haploinsufficient HSCs Have Increased Self-Renewal Ability In Vivo

As *Csnk1a1* haploinsufficiency leads to a significant increase in cycling LT-HSCs, we examined the functional capacity of *Csnk1a1* haploinsufficient cells in a competitive repopulation assay. Four weeks after transplantation, mice were treated with poly(I:C) to induce *Csnk1a1* deletion. *Csnk1a1* haploinsufficient cells outcompeted WT cells, while *Mx1Cre*⁺ control cells were stable over time, and cells with homozygous *Csnk1a1* inactivation were rapidly depleted (Figure 4A).

To determine the long-term repopulating potential of *Csnk1a1* haploinsufficient bone marrow, whole bone marrow cells from the primary recipients were injected into lethally irradiated secondary and tertiary recipients. *Csnk1a1* haploinsufficient bone marrow cells had a significantly impaired response to the stress of transplantation, resulting in significantly lower numbers of CD45.2⁺ donor cells in the peripheral blood compared to *Mx1Cre*⁺ controls each 4 weeks after secondary and tertiary transplantation. However, 16 weeks after each round of transplantation, *Csnk1a1* haploinsufficient cells recovered and again outcompeted the control cells (Figure 4A).

Having observed a competitive advantage for *Csnk1a1* haploinsufficient bone marrow evaluated in the peripheral blood,

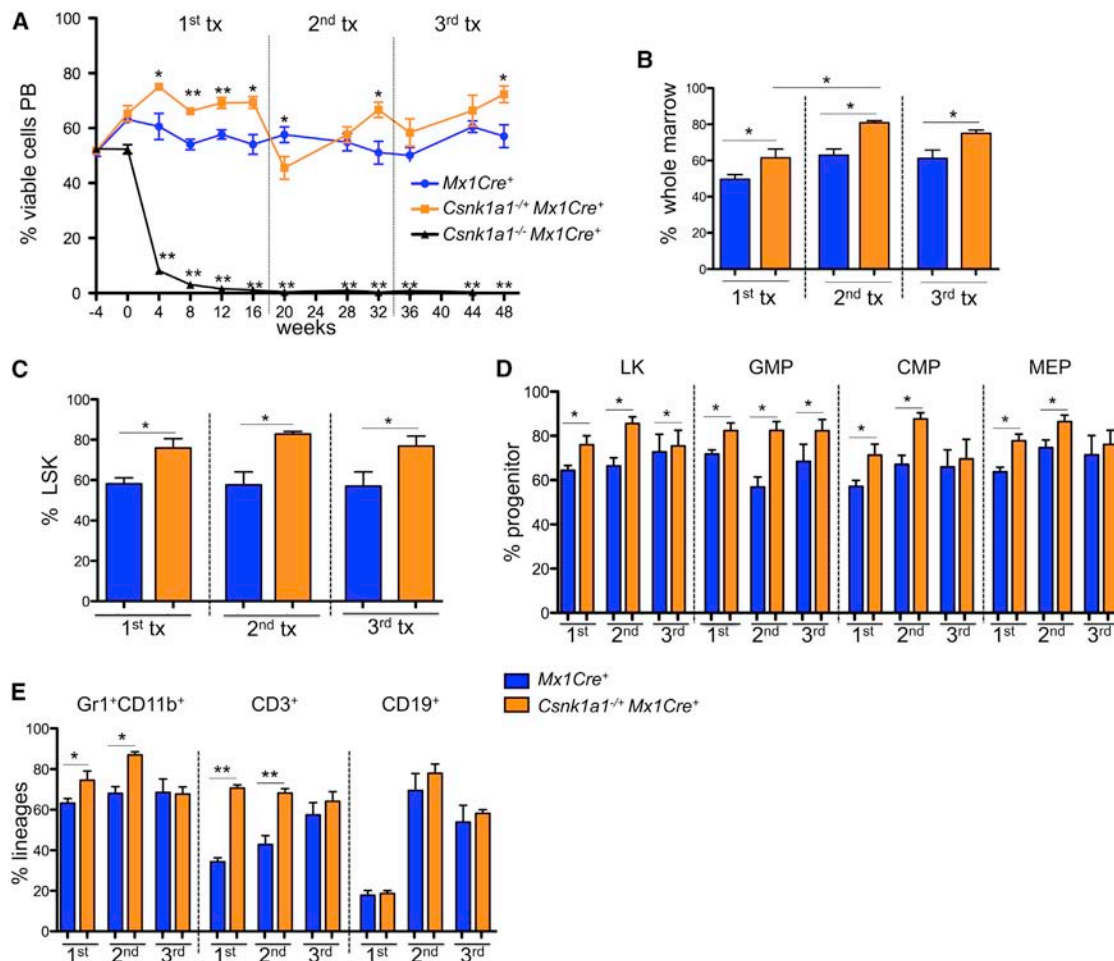


Figure 4. *Csnk1a1* Haploinsufficient HSCs Show Increased Repopulating Ability Consistent with Increased Self-Renewal

(A) Competitive repopulation assays were performed by mixing CD45.2-expressing cells (*Csnk1a1*^{-/-}*Mx1Cre*⁺, *Csnk1a1*^{-/-}*Mx1Cre*⁻, or *Mx1Cre*⁺) with CD45.1 competitor cells at an approximately 50:50 ratio and transplanting the cells into lethally irradiated CD45.1 recipients. The percentage of CD45.2 donor cell chimerism in the whole peripheral blood (PB) from peripheral blood of lethally irradiated recipient animals is shown. Time (in weeks) denotes the time relative to termination of the poly(I:C) injections; poly(I:C) = time point 0. After 16 weeks, bone marrow was harvested and transplanted for secondary transplants, and 16 weeks later for tertiary transplants in lethally irradiated mice (mean ± SD, n = 5; *p < 0.05, **p < 0.001). tx, transplant.

(B) Donor chimerism of total bone marrow cells performed at 16 (first competitive transplant), 32 (secondary competitive transplant, 16 weeks after transplantation) or 48 (tertiary competitive transplant) weeks after poly(I:C) induction (mean ± SD, n = 5; *p < 0.05).

(C and D) Donor chimerism of the HSC (LSK) (C) and progenitor cell compartments: LK; common-myeloid progenitors (CMP), LK CD34⁺CD16/32⁻; granulocyte-macrophage progenitors (GMP), LK CD34⁺CD16/32⁺; and myeloerythroid progenitors (MEP), LK CD34⁻CD16/32⁻ (D) performed at 16 (first competitive transplant), 32 (secondary competitive transplant), or 48 (tertiary competitive transplant) weeks after poly(I:C) induction (mean ± SD, n = 5; *p < 0.05).

(E) Chimerism of hematopoietic lineages in the bone marrow each 16 weeks after the first, second, and third competitive transplant. Composite data of donor (CD45.2⁺) granulocytes (Gr1⁺CD11b⁺), B cells (CD19⁺), or T cells (CD3⁺) are shown (mean ± SD, n = 5; *p < 0.05, **p < 0.001).

we next evaluated HSPCs in the setting of competitive repopulation (Figures 4B–4E). At both 16 weeks following the primary transplant and 16 weeks following the secondary transplant, *Csnk1a1* haploinsufficient cells were significantly more abundant than their WT counterparts in the percentage of LSK cells and downstream myeloid progenitor cells, Gr1⁺CD11b⁺ myeloid cells, and CD3⁺ T cells in the bone marrow.

***Csnk1a1* Haploinsufficiency Sensitizes Cells to Casein Kinase 1 Inhibition**

Having demonstrated a selective advantage for cells with heterozygous *Csnk1a1* inactivation and a severe disadvantage for

cells with homozygous *Csnk1a1* inactivation, we postulated that *Csnk1a1* haploinsufficiency might sensitize cells to CK1 α inhibition. Partial inhibition of CK1 α would be expected to cause WT cells to have a phenotype similar to haploinsufficient cells, while CK1 α inhibition in cells that already have one allele inactivated would approach closer to complete ablation of CK1 α activity, thereby establishing a therapeutic window for CK1 α inhibition in del(5q) MDS cells. We tested this hypothesis using D4476, a selective small molecule inhibitor of CK1 (Rena et al., 2004). Since D4476 has a short half-life in vivo, we treated purified myeloid progenitors from *Csnk1a1* haploinsufficient cells and *Mx1Cre*⁺ controls with D4476 in vitro. D4476 significantly

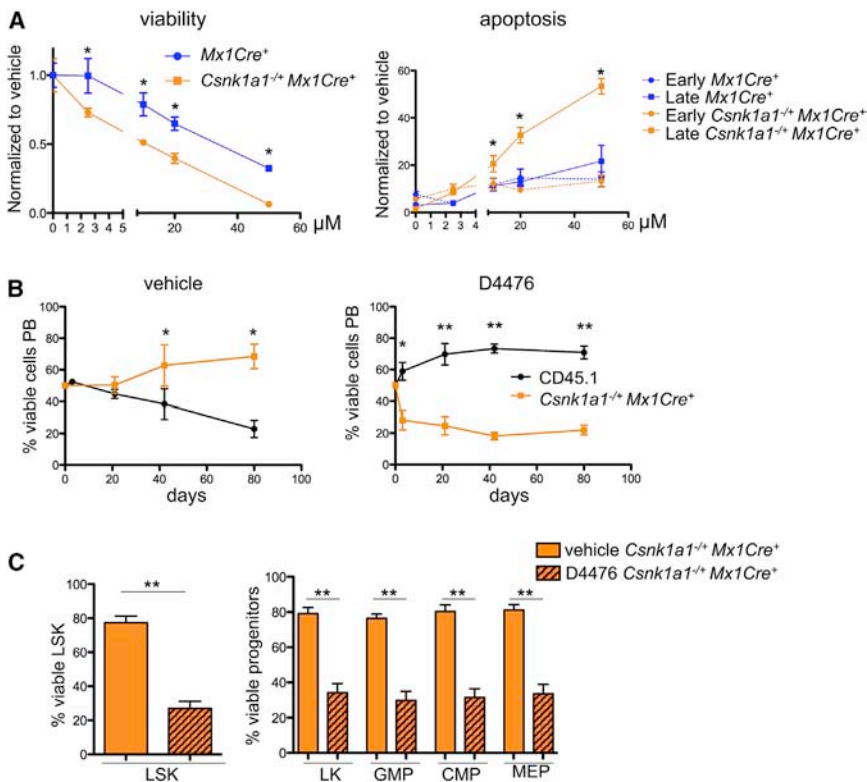


Figure 5. *Csnk1a1* Haploinsufficiency Provides a Therapeutic Window for the Specific Treatment of Disease-Propagating HSCs

(A) Sorted hematopoietic progenitor cells (LK) were prestimulated for 24 hr after the sort and treated for 72 hr with varying concentrations of D4476. Viability of cells was analyzed after 72 hr with the CellTiter-Glo assay, apoptosis by combined Annexin V and 7AAD staining discriminating early (Annexin V⁺7AAD⁻), and late apoptosis (Annexin V⁺7AAD⁺) using flow cytometry (mean ± SD, n = 5; *p < 0.05).

(B) Twenty-one days after poly(I:C) treatment, *Csnk1a1*^{-/-}*Mx1Cre*⁺ or CD45.1 bone marrow was harvested and LSK cells were sort purified. Equal ratios of *Csnk1a1*^{-/-}*Mx1Cre*⁺ and CD45.1⁺ LSK cells were mixed and treated for 72 hr ex vivo with either D4476 or DMSO, followed by transplantation into lethally irradiated CD45.1 mice. The chimerism was followed over time in the peripheral blood (PB) (mean ± SD, n = 6; *p < 0.05, **p < 0.001).

(C) The chimerism of *Csnk1a1*^{-/-}*Mx1Cre*⁺ in the bone marrow was analyzed in the LSK and progenitor fractions after 12 weeks under DMSO or D4476 treatment conditions (mean ± SD, n = 6; **p < 0.001).

See also Figure S4.

decreased viability and increased apoptosis in *Csnk1a1* haploinsufficient cells relative to *Mx1Cre*⁺ controls at a range of concentrations, consistent with a therapeutic window for targeting *Csnk1a1* haploinsufficient cells (Figure 5A).

To assess the relative effect of D4476 treatment on HSC and progenitor cell function in vivo, we performed a competitive repopulation experiment following ex vivo exposure to D4476. Purified LSK cells from *Csnk1a1*^{-/-}*Mx1Cre*⁺ (CD45.2) and WT CD45.1 mice were mixed in a 1:1 ratio and treated ex vivo with either D4476 or DMSO control for 48 hr, followed by injection of the cells into lethally irradiated mice. Following DMSO treatment, *Csnk1a1* haploinsufficient cells outcompeted the WT controls, as assessed by peripheral blood chimerism. In contrast, following treatment with D4476, *Csnk1a1* haploinsufficient cells were selectively depleted. Similarly, D4476 caused a selective depletion of *Csnk1a1* haploinsufficient stem and progenitor cells in the bone marrow (Figures 5B and 5C) and reduced *Csnk1a1* haploinsufficient HSPCs in colony-forming unit assays (Figure S4A).

To examine if partial, systemic inhibition of CK1 α would be tolerated in a therapeutic approach targeting haploinsufficiency, we analyzed the effects of global heterozygous *Csnk1a1* inactivation. *Csnk1a1*^{-/+}*EllaCre*⁺ mice, in which heterozygous deletion of *Csnk1a1* is induced in all tissues, were born in normal Mendelian ratios without apparent malformations. Histopathological analysis at 6 and 10 months of age revealed structural integrity of organs, and blood counts were normal and stable over this period of time (Figures S4B–S4D). In aggregate, these data indicate that *Csnk1a1* inhibition is an attractive therapeutic approach for the selective targeting of *Csnk1a1* haploinsufficient cells, such as MDS cells with del(5q).

Identification of Recurrent Somatic *CSNK1A1* Mutations in Patients with del(5q) MDS

In parallel with our functional studies, we performed whole-exome sequencing on MDS samples to identify genetic drivers of del(5q) MDS: genes that are selectively mutated in del(5q) MDS or genes within the del(5q) CDRs that are recurrently somatically mutated in MDS cases without del(5q). We performed whole-exome sequencing on paired samples (MDS-derived bone marrow sample and matched normal CD3⁺ cells) of 21 cases: 19 del(5q) and 2 with normal karyotypes (Table S1). We identified two cases with somatic mutations in *CSNK1A1*, both in untreated cases with del(5q) with WT *TP53* (Table 1). Both mutations caused the same amino acid change, E98K (Figure 6A). The mutations were confirmed to be present and somatic by Sanger sequencing (Figure 6A). Only a fraction (75% in patient 1 and 42% in patient 2) of the nondeleted *CSNK1A1* allele was mutated. By SNP array analysis (Figure S5A), the percentage of the del(5q) MDS clone was 70%–80% in patient 1 and 90%–100% in patient 2. These data indicate that deletion of chromosome 5q occurred first and that the *CSNK1A1* mutation occurred on the remaining allele of chromosome 5q. The mutation was identified in only less than 5% of the matched control samples from T cells. We analyzed an additional set of 22 MDS samples with isolated del(5q) and found one additional mutation, also altering the same codon (E98V). We examined published MDS genome-sequencing data and found one *CSNK1A1* mutation, D140A, in a case with MDS and a normal karyotype (Graubert et al., 2012) and *CSNK1A1* D140Y in a patient with del(5q) MDS (Woll et al., 2014). Additional *CSNK1A1* mutations were identified in the literature in other malignancies (Dulak et al.,

Table 1. Clinical Data of Patients with the Identified Somatic CSNK1A1 Mutations

Data	#1	#2	#3
Age at diagnosis	85	82	65
Gender	M	F	F
FAB	RA	RA	RA
Karyotype	46,XY,del(5)(q13q31) [17]/46,XY[3]	46,XX,del(5)(q13q33)[14]/46,XX[6]	46,XX,del(5)(q13q33)[4]/46,XX[2]
IPSS-R	2, low risk	1, very low risk	1, very low risk
TP53	WT	WT	WT
Hemoglobin (grams per deciliter)	10.6	11.8	9.5
Absolute neutrophil count (10^9 per liter)	4.96	0.951	5.01
Platelets (cells per microliter)	140,000	118,000	72,000

M, male; F, female; RA, refractory anemia; FAB, French-American-British classification; IPSS-R, revised International Prognostic Scoring System.

2013; Sato et al., 2013), two of which are also missense mutations of codon 98 and one of codon 140 (Figure S5B). CSNK1A1 is, therefore, a gene with recurrent somatic mutations within a del(5q) CDR in MDS.

We tested the function of the CSNK1A1 E98V mutation by retroviral expression of the mutant complementary DNA (cDNA) in *Csnk1a1*^{-/-}*Mx1Cre*⁺ hematopoietic cells, reflecting the finding of mutations in del(5q) cells without a WT allele. *ckit*⁺ hematopoietic cells were transduced with retroviruses expressing a WT CSNK1A1 cDNA, the CSNK1A1 E98V mutation, or the CSNK1A1 D136N cDNA with mutational inactivation of the CK1 α kinase activity (Bidère et al., 2009; Davidson et al., 2005; Peters et al., 1999). Four weeks after transplantation of transduced cells into lethally irradiated recipients, we induced excision of both endogenous *Csnk1a1* alleles. Mice transplanted with cells expressing the kinase-dead CSNK1A1 D136N cDNA died rapidly as expected, as the mutant cDNA was unable to rescue the effect of the *Csnk1a1* ablation (Figures S5C–S5E). In contrast, cDNA overexpressing CSNK1A1 and CSNK1A1 E98V cDNA rescued the HSC ablation in *Csnk1a1*^{-/-}*Mx1Cre*⁺ cells (Figures 6B and S5C). After 12 weeks, the bone marrow of the recipient mice was fully reconstituted by cells transduced with either CSNK1A1 cDNA or CSNK1A1 E98V cDNA (Figure 6C). Cells expressing CSNK1A1 or CSNK1A1 E98V reconstituted lineages, as well as stem and progenitor cells (Figures 6C and S5F).

We next examined the cellular consequences of the CSNK1A1 E98V mutation. *Csnk1a1*^{-/-}*Mx1Cre*⁺ cells transduced with CSNK1A1 E98V cDNA, compared to cells expressing the WT cDNA, had increased nuclear β -catenin accumulation by immunofluorescence and higher β -catenin accumulation by intracellular flow cytometry (Figures 6D–6F and S5G). While expression of the kinase-dead CSNK1A1 D136N cDNA caused increased apoptosis and HSC ablation, the CSNK1A1 E98V cDNA did not induce p53 or apoptosis (Figures 6D, 6F, S5G, and S5H). Furthermore, bone marrow cells expressing CSNK1A1 E98V cDNA had an increased frequency of cells in the G1 phase of the cell cycle, with no change in cells in G0 (Figure 6G). In agree-

gate, these findings indicate that the codon 98 mutations are not loss of function and do not cause increased p53 activation but do increase β -catenin activity, providing a potential selective advantage to del(5q) MDS cells.

Having demonstrated that *Csnk1a1* haploinsufficient cells are sensitized to CK1 inhibition, we tested whether CSNK1A1 E98V-expressing cells in a *Csnk1a1* null background are more sensitive to treatment with a CK1 inhibitor than WT or *Csnk1a1* haploinsufficient cells. Green-fluorescent-protein-positive (GFP⁺) CSNK1A1 E98V- and CSNK1A1-expressing LSK cells and *Csnk1a1* haploinsufficient and WT LSK cells were sorted and treated with D4476 (Figure 6H). Treatment of *Csnk1a1*^{-/-}*Mx1Cre*⁺ cells transduced with CSNK1A1 E98V cDNA were significantly more sensitive to the compound than *Csnk1a1* haploinsufficient cells. Similar results were obtained from a coculture competition assay in the presence of D4476 (Figures 6I and S5I).

DISCUSSION

Our studies converged on a critical role for CK1 α in the pathogenesis of del(5q) MDS. Activation of β -catenin downstream of *Csnk1a1* haploinsufficiency in a murine model, and downstream of CSNK1A1 mutations in MDS patient samples, provides a potential mechanism of clonal selection. In contrast, homozygous inactivation of *Csnk1a1* is not tolerated due to activation of p53. The sensitivity of hematopoietic cells to *Csnk1a1* gene dosage provides a therapeutic window for targeting CK1 α in haploinsufficient cells.

In a previous study, we found *Csnk1a1* to be a therapeutic target in acute myeloid leukemia (AML) and that D4476 selectively kills leukemic stem cells relative to normal HSPCs (Järås et al., 2014). Both the knockdown of *Csnk1a1* using small hairpin RNA and the genetically engineered mouse model show that reduction of *Csnk1a1* expression by more than 50% has a negative effect on HSC expansion and survival. Haploinsufficiency, in contrast, increases the number and function of HSCs.

β -catenin is a major driver of stem cell self-renewal and neoplasia in multiple cellular lineages (Baba et al., 2005; Elyada et al., 2011; Willert et al., 2003; Yeung et al., 2010). HSCs have a graded response to β -catenin, with modest levels leading to increased stem cell self-renewal (Baba et al., 2005) and more marked induction leading to stem cell exhaustion (Albuquerque et al., 2002; Kirstetter et al., 2006; Lane et al., 2010; Luis et al., 2011). Forced expression of β -catenin, in combination with HOXA9 and MEIS1, induces leukemia in progenitor cells (Wang et al., 2010b), and β -catenin is essential for leukemia cells driven by the MLL-AF9 oncogene (Miller et al., 2013). Histopathological studies have found nuclear, nonphosphorylated β -catenin expression in bone marrow specimen from de novo AML and MDS patients to be a predictor for clinical outcome, and these studies suggested an association between nuclear β -catenin expression and del(5q) MDS, although the number of samples studied was too small to be conclusive (Xu et al., 2008). CK1 α is a member of the β -catenin destruction complex and is, therefore, a known central regulator of β -catenin activity (Cheong and Virshup, 2011). In our studies, *Csnk1a1* haploinsufficiency conferred to increased intrinsic self-renewal of HSC, with associated nuclear β -catenin accumulation, cyclin D1 induction, and exit from quiescence in LT-HSCs.

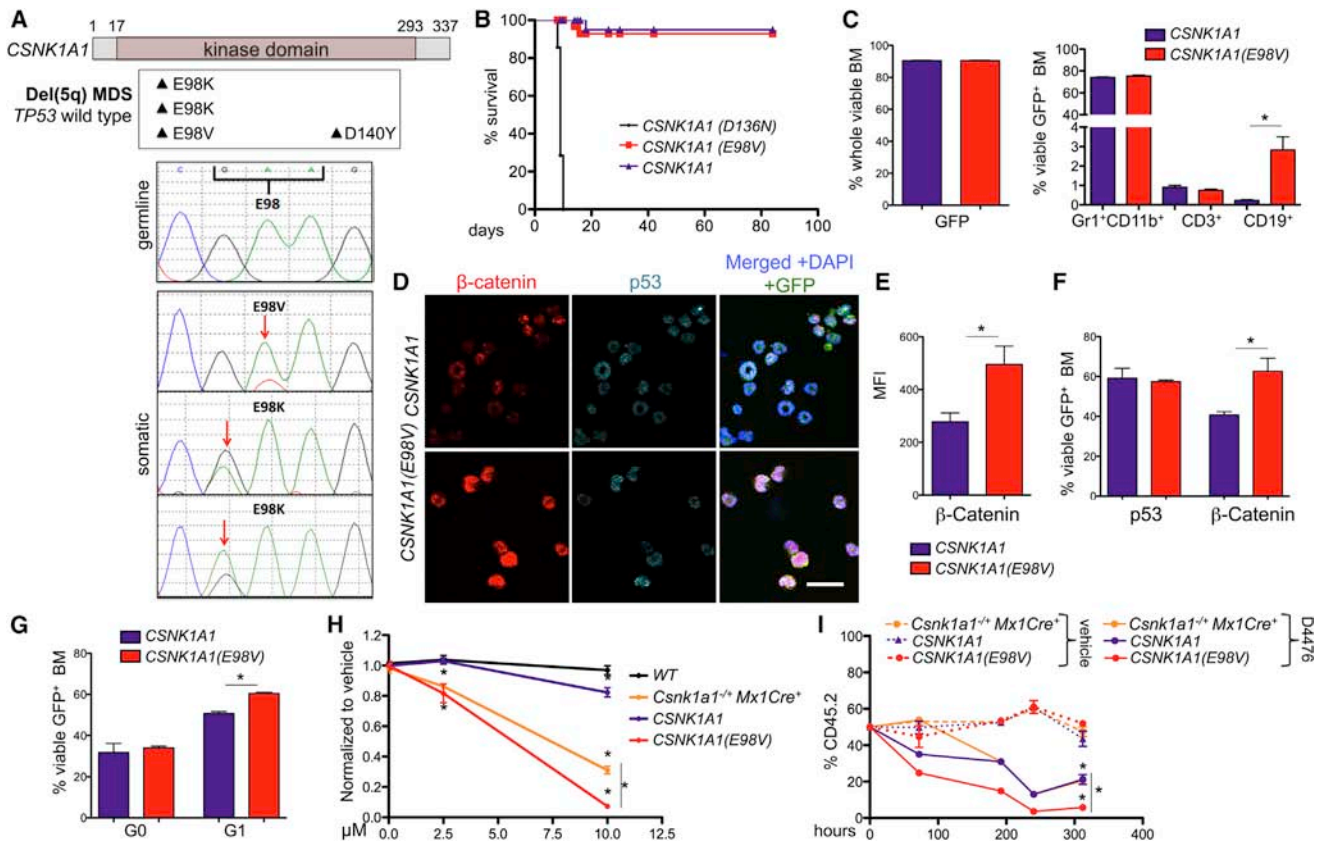


Figure 6. Identification and Functional Characterization of *CSNK1A1* Mutations in del(5q) MDS Patients

(A) Summary of *CSNK1A1* mutations identified in del(5q)MDS patients (upper panel) and Sanger sequencing results around codon 98 of the normal control (germline) and tumors (somatic) (lower panel).
 (B) Kaplan-Meier survival analysis of chimeric mice transplanted with *Csnk1a1*^{-/-}*Mx1Cre*⁺ HSPCs expressing *Csnk1a1* cDNA, *Csnk1a1* D136 cDNA, or *Csnk1a1* E98V cDNA. Time point 0 is the first day of poly(I:C) induction (n = 5).
 (C) GFP expression in whole bone marrow (BM; left) and distribution of the different lineages (Gr1⁺CD11b⁺ neutrophils, CD3⁺ T cells, CD19⁺ B cells) in GFP⁺ bone marrow cells (right) (mean ± SD, n = 3; *p < 0.05).
 (D) Coimmunofluorescent staining of β-catenin and p53 in cytospin preparations of red-blood-cell-lysed whole bone marrow cells (red, β-catenin; turquoise, p53; green, GFP MIG vector; blue: DAPI). Scale bar, 20 μm.
 (E) Quantification of β-catenin intensity using the mean fluorescence intensity (MFI) (mean ± SD, n = 3; *p < 0.05).
 (F) Intracellular flow cytometry measurement of β-catenin and p53 in permeabilized whole bone marrow cells. (mean ± SD, n = 3; *p < 0.05).
 (G) Cell cycle was analyzed by combined Ki67 and Hoechst 33342 staining in permeabilized whole bone marrow cells (mean ± SD, n = 3; *p < 0.05).
 (H) GFP⁺ LSK cells from mice transplanted with either *CSNK1A1* or *CSNK1A1* E98V-expressing *Csnk1a1*^{-/-}*Mx1Cre*⁺ cells as well as *Csnk1a1* haploinsufficient LSK and WT LSK cells were sort purified and exposed to vehicle, 2.5 or 10 μM D4476 for 72 hr and viability of cells was analyzed after 72 hr with the CellTiter-Glo assay (mean ± SD, n = 5; *p < 0.05).
 (I) LSK cells (all CD45.2), isolated as in (H), were treated in competition to CD45.1 WT cells in one culture well to analyze selective ablation of cells under the same culture condition (mean ± SD, n = 5; *p < 0.05).
 See also Figure S5 and Table S1.

Increased LT-HSC proliferation and expansion was a cell-intrinsic effect in our study. Inactivation of *Csnk1a1* in stromal cells in our model caused stromal β-catenin levels to increase, with consequent effects on hematopoiesis, including pancytopenia and HSPC depletion. This observation is consistent with recent studies demonstrating that β-catenin accumulation in the stroma negatively regulates HSC maintenance and might also contribute to leukaemogenesis (Kode et al., 2014; Lane et al., 2010).

APC, another member of the β-catenin destruction complex, is also deleted in the vast majority of del(5q) MDS cases. Hematopoietic cells with *Apc* haploinsufficiency have been shown to

have enhanced repopulation potential, indicating a cell-intrinsic gain of function in the LT-HSC population. However, in contrast to *Csnk1a1* haploinsufficiency, *Apc* haploinsufficient bone marrow was unable to repopulate secondary recipients due to loss of the quiescent HSC population (Lane et al., 2010; Wang et al., 2010a). Different levels of Wnt activation may explain these findings. Similarly, deletions of *Csnk1a1* and of *Apc* in the gut have significantly different effects. While *Csnk1a1* deletion led to robust activation of Wnt target genes and proliferation without invasion, *Apc* deletion induced immediate dysplastic transformation and rapid death (Elyada et al., 2011). CK1α has many phosphorylation targets that could alter stem cell function

(Bidère et al., 2009; Elyada et al., 2011; Wu et al., 2012). As has been postulated previously, it is possible that CK1 α inactivation restrains hyperactive Wnt signaling through mechanisms yet to be defined.

Our sequencing studies revealed recurrent mutations in a gene located in an MDS CDR on chromosome 5q. SNP array studies have not identified any genes on 5q that undergo homozygous deletion in del(5q) MDS (Gondek et al., 2008; Graubert et al., 2009; Heinrichs et al., 2009). Indeed, our studies would indicate that homozygous inactivation of *CSNK1A1* would be highly deleterious to a hematopoietic cell. Although *CSNK1A1* mutations in MDS are rare, they provide powerful evidence that these lesions are genetic drivers of clonal dominance. In functional studies, expression of the identified *CSNK1A1* E98V allele, in the setting of inactivation of both WT alleles to mimic the genetic context of the mutations observed in patients, caused an induction of nuclear β -catenin and a significant HSC cell cycle progression compared to expression of the WT *CSNK1A1*. Future experiments using a conditional knockin mouse strain will be helpful to study the long-term hematopoietic effects of the mutant allele expressed at physiological levels.

Our results indicate that *CSNK1A1* is a CYCLOPS (copy number alteration yielding cancer liabilities owing to partial loss) gene (Nijhawan et al., 2012). Heterozygous inactivation of *Csnk1a1* sensitized cells to CK1 inhibition with D4476. The ablation of hematopoiesis in *Csnk1a1* null cells and the normal-to-enhanced hematopoiesis in *Csnk1a1* haploinsufficient cells provide a mechanistic basis for this therapeutic window. We demonstrated that systemic *Csnk1a1* haploinsufficiency in our murine model does not have significant effects on other organs, indicating that partial pharmacologic inhibition of CK1 would likely be well tolerated. While D4476 does not have pharmacokinetic properties for in vivo use and lacks specificity for CK1 α , a more selective compound has the potential for therapeutic utility in the treatment of patients with myeloid malignancies associated with del(5q).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Generation of a *Csnk1a1* Conditional Knockout Mouse

Mouse embryonic stem cells with *Csnk1a1* exon 3 targeted in a C57BL/6N genetic background were generated by the KOMP consortium (project ID: CSD45494). The neomycin/lacZ cassette was flipped out in vitro by transfection of a plasmid expressing the flippase recombinase (FRT). Successful FRT recombination was validated by PCR (forward primer: 5'-TCGCACCTTGAGC TATTGGGGAGT-3'; reverse primer: 5'-AGGCATGGTAGCTCACACTGA-3'). Following confirmation of germline transmission, mice were crossed with the *Mx1-Cre* mouse strain (Jackson Laboratory, stock number 002527). To excise *Csnk1a1* exon 3, *Csnk1a1* conditional mice were given three rounds of 200 μ g of poly(I:C) (GE Healthcare Life Sciences) using intraperitoneal injections. Successful excision of *Csnk1a1* exon 3 was validated using forward primer (mentioned earlier) and reverse 5'AGCTGGGCTACCAAGAGGCAA-3' primer. All experiments and procedures were conducted in the Children's Hospital Boston animal facility and were approved by the Children's Hospital Institutional Animal Care and Use Committee.

Flow Cytometry

Bone marrow cells were isolated by flushing and crushing pelvis and hind leg bones with PBS (GIBCO) + 2% fetal bovine serum (FBS) + penicillin/streptomycin (GIBCO). Whole bone marrow was lysed on ice with red blood cell lysis solution (Invitrogen/Life Technologies), and washed in PBS (GIBCO) + 2% FBS. Single-cell suspensions of spleen were prepared by pressing tissue

through a cell strainer followed by red blood cell lysis. Cells were labeled with monoclonal antibodies in 2% FBS/PBS for 30 min on ice (see [Supplemental Experimental Procedures](#) for the information on antibodies used) and analyzed using an LSR II flow cytometer (BD Biosciences). Apoptosis (Annexin V APC Apoptosis Detection Kit, eBioscience) and cell cycle (Ki67 cell cycle and proliferation kit, BD Biosciences) assays were performed according to the manufacturer's instructions.

Bone Marrow Transplantation Assays

In transplantation assays of *Csnk1a1* cells into CD45.1 WT mice, 5×10^6 freshly isolated whole bone marrow cells were harvested before poly(I:C) treatment and injected into the tail vein of lethally irradiated (1,050 rads) CD45.1-positive B6.SJL (Jackson Laboratory) recipient mice without support cells. In competitive bone marrow transplantation studies, 2×10^6 freshly isolated bone marrow cells were harvested and transplanted via tail vein into lethally irradiated CD45.1⁺ recipient mice together with 2×10^6 freshly isolated CD45.1⁺ bone marrow competitor cells in an equal ratio. Four weeks after transplantation, blood samples were taken and donor cell chimerism was determined by flow cytometric analysis. Shortly thereafter, mice were given three rounds of poly(I:C) treatment, and donor blood cell chimerism was determined every 4 weeks.

Western Blots

Western blots were performed according to standard protocols. In brief, cell lysis was performed in RIPA buffer with protease/phosphatase inhibitors. After protein quantification, lysates were resuspended in Laemmli sample buffer and loaded to gradient gels (Criterion Tris-HCl Gel, 8%–16%). Proteins were transferred onto Immobilon polyvinylidene difluoride membranes. As primary antibodies, β -catenin (rabbit polyclonal, 9562, 1:500, Cell Signaling), p53 (mouse monoclonal, DO-1, 1:500, Santa Cruz Biotechnology), p21 (rabbit polyclonal, 1:200, C-19, Santa Cruz Biotechnology), cyclin D1 (rabbit monoclonal, 1:200, SP4, Thermo Fisher Scientific), and GAPDH (rabbit polyclonal, 1:4000, Bethyl Laboratories) were applied.

Histopathology

For histological and immunohistochemical analyses, murine organs were fixed in 3.7% formaldehyde overnight, dehydrated, and prepared for paraffin embedding. Hematoxylin and eosin (H&E) staining was performed according to routine protocols. For immunohistochemical stainings, the avidin-biotin complex was applied. Peripheral blood smears were stained with May-Grünwald-Giemsa (Sigma-Aldrich). Images were obtained on a Nikon Eclipse E400 microscope equipped with a SPOT RT color digital camera (model 2.1.1, Diagnostic Instruments).

Viral Vector Cloning

MIG-CSNK1A1, MIG-CSNK1A1(E98V), and MIG-CSNK1A1(D136N) were flanked by Not1 and Xho1 sites for convenient cloning into the MIG vector backbone.

Patient Samples and Sequencing

Patients included in the whole-exome sequencing were diagnosed between 2008 and 2013 at different Spanish hospitals affiliated with the MDS Spanish Group (Grupo Español de SMD, GESMD). Patients were diagnosed with MDS according to the French-American-British and 2008 World Health Organization classifications. Samples were deidentified at the time of inclusion. This study was approved by institutional review boards (Clinical Research Ethics Committee Institut Català de la Salut/Germans Trias i Pujol Hospital and Clinical and Ethics Committee Parc de Salut MAR) and performed in accordance with the Declaration of Helsinki. All patients gave their informed written consent. Whole-exome sequencing was performed using paired-end reads generated from DNA libraries prepared from MDS samples (whole bone marrow) with matched normal samples (CD3⁺ lymphocytes isolated from peripheral blood). Whole-exome hybrid capture was carried out on 3 μ g of genomic DNA using the SureSelect Human Exome Kit version 3 (Agilent Technologies). The captured exome library was sequenced with 100 base-pair (bp) paired-end reads on an Illumina HiSeq2000 platform (Illumina). Whole-exome sequencing data were analyzed using an in-house bioinformatics pipeline as previously reported elsewhere (BWA; GATK's; VarScan2; SAMTools; SnpEff; (Koboldt et al.,

2012; McKenna et al., 2010). Somatic mutations identified as alterations present in tumor but not in the matched CD3⁺ sample were validated by Sanger sequencing. Sanger sequencing was performed on genomic DNA isolated from whole bone marrow cells and CD3⁺ cells using the GentraPuregene Cell kit (QIAGEN). Exon 3 from *CSNK1A1* gene was amplified by PCR using the following primers: forward primer: 5'-TCCTTTTGTTCGTTAGGTGGT-3' and reverse primer 5'-AAGGTTAAATAGTGATGCACAGGA-3'; amplification size, 251 bp). SNP arrays were performed with the Genome-Wide Human SNP Array 6.0 from Affymetrix. Assays were performed according to Affymetrix protocols.

ACCESSION NUMBERS

The Gene Expression Omnibus accession number for SNP arrays is GSE59244.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures, five figures, and one table and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2014.08.001>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

R.K.S, D.H., M.J., and B.L.E. designed experiments. R.K.S, D.H., A.M.L, L.P.C., M.E.M., A.M., and R.K. performed experiments and analyzed data. V.A., M.M., R.B., and F.S. collected patient samples and clinical information, performed whole-exome sequencing and validation by Sanger sequencing, and analyzed these data. R.K.S and B.L.E. wrote the manuscript. All authors provided critical review of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge the Harvard Stem Cell Institute/Children's Hospital Boston (Mahnaz Paktinat and Ronald Mathieu) and the Dana Farber Cancer Institute Flow Cytometry Core Facility (Suzan Lazo-Kallanian). We thank Damien Wilpitz, Brenton G. Mar, Jan Krönke, Steven Lane, Dagmar Walter, and Michael Milsom for their scientific insights. This work was supported by the NIH (R01HL082945), the Claudia Adams Barr Program, a Gabrielle's Angel Award, and a Leukemia and Lymphoma Society Scholar Award to B.L.E. R.K.S. was supported by the German Research Foundation (DFG1188/3-1) and the Edward P. Evans Foundation. D.H. was supported by the German Cancer Aid. Whole-exome sequencing was supported in part by Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain (PI 11/02010), by Red de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC, FEDER; RD12/0036/0044), 2014 SGR 225 GRE (Generalitat de Catalunya) and Celgene Spain. We sincerely acknowledge Lourdes Florensa, Leonor Arenillas, María Consuelo del Cañizo, María Díez-Campelo, Lurdes Zamora, and Laura Palomo for their scientific contributions and assistance with patient selection, and Centro Nacional de Analisis Genomicos for whole-exome sequencing studies.

Received: April 1, 2014

Revised: June 9, 2014

Accepted: August 1, 2014

Published: September 18, 2014

REFERENCES

Albuquerque, C., Breukel, C., van der Lijft, R., Fidalgo, P., Lage, P., Slors, F.J., Leitão, C.N., Fodde, R., and Smits, R. (2002). The 'just-right' signaling model: APC somatic mutations are selected based on a specific level of activation of the beta-catenin signaling cascade. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 1549–1560.

Baba, Y., Garrett, K.P., and Kincade, P.W. (2005). Constitutively active beta-catenin confers multilineage differentiation potential on lymphoid and myeloid progenitors. *Immunity* *23*, 599–609.

Bidère, N., Ngo, V.N., Lee, J., Collins, C., Zheng, L., Wan, F., Davis, R.E., Lenz, G., Anderson, D.E., Arnoult, D., et al. (2009). Casein kinase 1alpha governs an-

tigen-receptor-induced NF-kappaB activation and human lymphoma cell survival. *Nature* *458*, 92–96.

Boulwood, J., Pellagatti, A., Cattani, H., Lawrie, C.H., Giagounidis, A., Malcovati, L., Della Porta, M.G., Jädersten, M., Killick, S., Fidler, C., et al. (2007). Gene expression profiling of CD34⁺ cells in patients with the 5q- syndrome. *Br. J. Haematol.* *139*, 578–589.

Boulwood, J., Pellagatti, A., McKenzie, A.N., and Wainscoat, J.S. (2010). Advances in the 5q- syndrome. *Blood* *116*, 5803–5811.

Chen, T.H., Kambal, A., Krysiak, K., Walshauer, M.A., Raju, G., Tibbitts, J.F., and Walter, M.J. (2011). Knockdown of Hspa9, a del(5q31.2) gene, results in a decrease in hematopoietic progenitors in mice. *Blood* *117*, 1530–1539.

Cheong, J.K., and Virshup, D.M. (2011). Casein kinase 1: Complexity in the family. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *43*, 465–469.

Davidson, G., Wu, W., Shen, J., Bilic, J., Fenger, U., Stannek, P., Glinka, A., and Niehrs, C. (2005). Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature* *438*, 867–872.

Dulak, A.M., Stojanov, P., Peng, S., Lawrence, M.S., Fox, C., Stewart, C., Bandla, S., Imamura, Y., Schumacher, S.E., Sheffer, E., et al. (2013). Exome and whole-genome sequencing of esophageal adenocarcinoma identifies recurrent driver events and mutational complexity. *Nat. Genet.* *45*, 478–486.

Dutt, S., Narla, A., Lin, K., Mullally, A., Abayasekara, N., Megerdichian, C., Wilson, F.H., Currie, T., Khanna-Gupta, A., Berliner, N., et al. (2011). Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. *Blood* *117*, 2567–2576.

Ebert, B.L. (2011). Molecular dissection of the 5q deletion in myelodysplastic syndrome. *Semin. Oncol.* *38*, 621–626.

Ebert, B.L., Pretz, J., Bosco, J., Chang, C.Y., Tamayo, P., Gallili, N., Raza, A., Root, D.E., Attar, E., Ellis, S.R., and Golub, T.R. (2008). Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature* *451*, 335–339.

Elyada, E., Pribluda, A., Goldstein, R.E., Morgenstern, Y., Brachya, G., Cojocar, G., Snir-Alkalay, I., Burstain, I., Haffner-Krausz, R., Jung, S., et al. (2011). CK1 α ablation highlights a critical role for p53 in invasiveness control. *Nature* *470*, 409–413.

Gondek, L.P., Tiu, R., O'Keefe, C.L., Sekeres, M.A., Theil, K.S., and Maciejewski, J.P. (2008). Chromosomal lesions and uniparental disomy detected by SNP arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-derived AML. *Blood* *111*, 1534–1542.

Graubert, T.A., Payton, M.A., Shao, J., Walgren, R.A., Monahan, R.S., Frater, J.L., Walshauer, M.A., Martin, M.G., Kasai, Y., and Walter, M.J. (2009). Integrated genomic analysis implicates haploinsufficiency of multiple chromosome 5q31.2 genes in de novo myelodysplastic syndromes pathogenesis. *PLoS ONE* *4*, e4583.

Graubert, T.A., Shen, D., Ding, L., Okeyo-Owuor, T., Lunn, C.L., Shao, J., Krysiak, K., Harris, C.C., Koboldt, D.C., Larson, D.E., et al. (2012). Recurrent mutations in the U2AF1 splicing factor in myelodysplastic syndromes. *Nat. Genet.* *44*, 53–57.

Haase, D., Germing, U., Schanz, J., Pfeilstöcker, M., Nösslinger, T., Hildebrandt, B., Kundgen, A., Lübbert, M., Kunzmann, R., Giagounidis, A.A., et al. (2007). New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* *110*, 4385–4395.

Hasserjian, R.P., LeBeau, M.M., List, A.F., Bennett, J.M., and Thiele, J. (2008). Myelodysplastic syndrome with isolated del(5q). In WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth edition, S.H. Swerdlow, E. Campo, N.L. Harris, E.S. Jaffe, S.A. Pileri, H. Stein, J. Thiele, and J.W. Vardiman, eds. (Geneva, Switzerland: WHO Press), p. 102.

Heinrichs, S., Kulkarni, R.V., Bueso-Ramos, C.E., Levine, R.L., Loh, M.L., Li, C., Neuberg, D., Kornblau, S.M., Issa, J.P., Gilliland, D.G., et al. (2009). Accurate detection of uniparental disomy and microdeletions by SNP array analysis in myelodysplastic syndromes with normal cytogenetics. *Leukemia* *23*, 1605–1613.

Järås, M., Miller, P.G., Chu, L.P., Puram, R.V., Fink, E.C., Schneider, R.K., Al-Shahrour, F., Peña, P., Breyfogle, L.J., Hartwell, K.A., et al. (2014). *Csnk1a1*

- inhibition has p53-dependent therapeutic efficacy in acute myeloid leukemia. *J. Exp. Med.* **211**, 605–612.
- Jerez, A., Gondek, L.P., Jankowska, A.M., Makishima, H., Przychodzen, B., Tiu, R.V., O'Keefe, C.L., Mohamedali, A.M., Batista, D., Sekeres, M.A., et al. (2012). Topography, clinical, and genomic correlates of 5q myeloid malignancies revisited. *J. Clin. Oncol.* **30**, 1343–1349.
- Joslin, J.M., Fernald, A.A., Tennant, T.R., Davis, E.M., Kogan, S.C., Anastasi, J., Crispino, J.D., and Le Beau, M.M. (2007). Haploinsufficiency of EGR1, a candidate gene in the del(5q), leads to the development of myeloid disorders. *Blood* **110**, 719–726.
- Kirstetter, P., Anderson, K., Porse, B.T., Jacobsen, S.E., and Nerlov, C. (2006). Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. *Nat. Immunol.* **7**, 1048–1056.
- Koboldt, D.C., Zhang, Q., Larson, D.E., Shen, D., McLellan, M.D., Lin, L., Miller, C.A., Mardis, E.R., Ding, L., and Wilson, R.K. (2012). VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res.* **22**, 568–576.
- Kode, A., Manavalan, J.S., Mosialou, I., Bhagat, G., Rathinam, C.V., Luo, N., Khiabani, H., Lee, A., Murty, V.V., Friedman, R., et al. (2014). Leukaemogenesis induced by an activating β -catenin mutation in osteoblasts. *Nature* **506**, 240–244.
- Kumar, M.S., Narla, A., Nonami, A., Mullally, A., Dimitrova, N., Ball, B., McAuley, J.R., Poveromo, L., Kutok, J.L., Galili, N., et al. (2011). Coordinate loss of a microRNA and protein-coding gene cooperate in the pathogenesis of 5q- syndrome. *Blood* **118**, 4666–4673.
- Lane, S.W., Sykes, S.M., Al-Shahrour, F., Shterental, S., Paktinat, M., Lo Celso, C., Jesneck, J.L., Ebert, B.L., Williams, D.A., and Gilliland, D.G. (2010). The Apc(min) mouse has altered hematopoietic stem cell function and provides a model for MPD/MDS. *Blood* **115**, 3489–3497.
- Luis, T.C., Naber, B.A., Roozen, P.P., Brugman, M.H., de Haas, E.F., Ghazvini, M., Fibbe, W.E., van Dongen, J.J., Fodde, R., and Staal, F.J. (2011). Canonical wnt signaling regulates hematopoiesis in a dosage-dependent fashion. *Cell Stem Cell* **9**, 345–356.
- Luis, T.C., Ichii, M., Brugman, M.H., Kincade, P., and Staal, F.J. (2012). Wnt signaling strength regulates normal hematopoiesis and its deregulation is involved in leukemia development. *Leukemia* **26**, 414–421.
- Mallo, M., Del Rey, M., Ibáñez, M., Calasanz, M.J., Arenillas, L., Larráyoz, M.J., Pedro, C., Jerez, A., Maciejewski, J., Costa, D., et al. (2013). Response to lenalidomide in myelodysplastic syndromes with del(5q): influence of cytogenetics and mutations. *Br. J. Haematol.* **162**, 74–86.
- McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernysky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S., Daly, M., and DePristo, M.A. (2010). The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* **20**, 1297–1303.
- Miller, P.G., Al-Shahrour, F., Hartwell, K.A., Chu, L.P., Järås, M., Puram, R.V., Puissant, A., Callahan, K.P., Ashton, J., McConkey, M.E., et al. (2013). In Vivo RNAi screening identifies a leukemia-specific dependence on integrin beta 3 signaling. *Cancer Cell* **24**, 45–58.
- Min, I.M., Pietramaggiore, G., Kim, F.S., Passegué, E., Stevenson, K.E., and Wagers, A.J. (2008). The transcription factor EGR1 controls both the proliferation and localization of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* **2**, 380–391.
- Nijhawan, D., Zack, T.I., Ren, Y., Strickland, M.R., Lamothe, R., Schumacher, S.E., Tsherniak, A., Besche, H.C., Rosenbluh, J., Shehata, S., et al. (2012). Cancer vulnerabilities unveiled by genomic loss. *Cell* **150**, 842–854.
- Peters, J.M., McKay, R.M., McKay, J.P., and Graff, J.M. (1999). Casein kinase I transduces Wnt signals. *Nature* **401**, 345–350.
- Rena, G., Bain, J., Elliott, M., and Cohen, P. (2004). D4476, a cell-permeant inhibitor of CK1, suppresses the site-specific phosphorylation and nuclear exclusion of FOXO1a. *EMBO Rep.* **5**, 60–65.
- Sato, Y., Yoshizato, T., Shiraishi, Y., Maekawa, S., Okuno, Y., Kamura, T., Shimamura, T., Sato-Otsubo, A., Nagae, G., Suzuki, H., et al. (2013). Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. *Nat. Genet.* **45**, 860–867.
- Scheller, M., Huelsken, J., Rosenbauer, F., Taketo, M.M., Birchmeier, W., Tenen, D.G., and Leutz, A. (2006). Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive beta-catenin activation. *Nat. Immunol.* **7**, 1037–1047.
- Sinnberg, T., Menzel, M., Kaesler, S., Biedermann, T., Sauer, B., Nahsen, S., Schwarz, M., Garbe, C., and Schitteck, B. (2010). Suppression of casein kinase 1alpha in melanoma cells induces a switch in beta-catenin signaling to promote metastasis. *Cancer Res.* **70**, 6999–7009.
- Starczynowski, D.T., Kuchenbauer, F., Argiropoulos, B., Sung, S., Morin, R., Muranyi, A., Hirst, M., Hogge, D., Marra, M., Wells, R.A., et al. (2010). Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q- syndrome phenotype. *Nat. Med.* **16**, 49–58.
- Stoddart, A., Fernald, A.A., Wang, J., Davis, E.M., Karrison, T., Anastasi, J., and Le Beau, M.M. (2014). Haploinsufficiency of del(5q) genes, Egr1 and Apc, cooperate with Tp53 loss to induce acute myeloid leukemia in mice. *Blood* **123**, 1069–1078.
- Trowbridge, J.J., Xenocostas, A., Moon, R.T., and Bhatia, M. (2006). Glycogen synthase kinase-3 is an in vivo regulator of hematopoietic stem cell repopulation. *Nat. Med.* **12**, 89–98.
- Walkley, C.R., Olsen, G.H., Dworkin, S., Fabb, S.A., Swann, J., McArthur, G.A., Westmoreland, S.V., Chambon, P., Scadden, D.T., and Purton, L.E. (2007). A microenvironment-induced myeloproliferative syndrome caused by retinoic acid receptor gamma deficiency. *Cell* **129**, 1097–1110.
- Wang, J., Fernald, A.A., Anastasi, J., Le Beau, M.M., and Qian, Z. (2010a). Haploinsufficiency of Apc leads to ineffective hematopoiesis. *Blood* **115**, 3481–3488.
- Wang, Y., Krivtsov, A.V., Sinha, A.U., North, T.E., Goessling, W., Feng, Z., Zon, L.I., and Armstrong, S.A. (2010b). The Wnt/beta-catenin pathway is required for the development of leukemia stem cells in AML. *Science* **327**, 1650–1653.
- Willert, K., Brown, J.D., Danenberg, E., Duncan, A.W., Weissman, I.L., Reya, T., Yates, J.R., 3rd, and Nusse, R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* **423**, 448–452.
- Woll, P.S., Kjällquist, U., Chowdhury, O., Doolittle, H., Wedge, D.C., Thongjuea, S., Erlandsson, R., Ngara, M., Anderson, K., Deng, Q., et al. (2014). Myelodysplastic syndromes are propagated by rare and distinct human cancer stem cells in vivo. *Cancer Cell* **25**, 794–808.
- Wu, S., Chen, L., Becker, A., Schonbrunn, E., and Chen, J. (2012). Casein kinase 1 α regulates an MDMX intramolecular interaction to stimulate p53 binding. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 4821–4832.
- Xu, J., Suzuki, M., Niwa, Y., Hiraga, J., Nagasaka, T., Ito, M., Nakamura, S., Tomita, A., Abe, A., Kiyoi, H., et al. (2008). Clinical significance of nuclear non-phosphorylated beta-catenin in acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome. *Br. J. Haematol.* **140**, 394–401.
- Yeung, J., Esposito, M.T., Gandillet, A., Zeisig, B.B., Griessinger, E., Bonnet, D., and So, C.W. (2010). β -Catenin mediates the establishment and drug resistance of MLL leukemic stem cells. *Cancer Cell* **18**, 606–618.
- Zhu, H., Guo, Z.K., Jiang, X.X., Li, H., Wang, X.Y., Yao, H.Y., Zhang, Y., and Mao, N. (2010). A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone. *Nat. Protoc.* **5**, 550–560.

6.2 OTRAS PUBLICACIONES ELABORADAS DURANTE LA REALIZACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL:

1_ Palomo L, Xicoy B, Garcia O, Mallo M, **Ademà V**, Cabezón M, Arnan M, Pomares H, Larrayoz MJ, Calasanz MJ, Maciejewski JP, Huang D, Shih LY, Ogawa S, Cervera J, Such E, Coll R, Grau J, Solé F, Zamora L. *Impact of SNP array karyotyping on the diagnosis and the outcome of chronic myelomonocytic leukemia with low risk cytogenetic features or no metaphases*. Am J Hematol. 2015 Oct 28.

2_ Sanchez Castro, Judit; Marco Betes, Victor; Gomez Arbones, Xavier; Garcia-Cerecedo, Tomas; Lopez, Ricard; Talavera, Elisabeth; Fernandez, Sara; **Adema, Vera**; Marugan, Isabel; Luño, Elisa; Sanzo, Carmen; Vallespi, Teresa; Arenillas, Leonor; Marco, Josefa; Batlle, Ana; Buño, Ismael; Martin, Maria Luisa; Blanquez, Beatriz; Collado, Rosa; Vargas, Maria Teresa; González, Teresa; Sanz, Guillermo; Solé, Francesc. *Fluorescence in situ hybridization (FISH) of TP53 for the detection of chromosome 17 abnormalities in myelodysplastic syndromes*. Accepted at Leukemia and Lymphoma, March 2015

3_ **Adema V**, Larráyoiz MJ, Calasanz MJ, Palomo L, Patiño-García A, Agirre X, Hernández-Rivas JM, Lumbreras E, Buño I, Martínez-Laperche C, Mallo M, García O, Álvarez S, Blázquez B, Cervera J, Luño E, Valiente A, Vallespi MT, Arenillas L, Collado R, Pérez-Oteyza J, Solé F. *Correlation of myelodysplastic syndromes with *i(17)(q10)* and TP53 and SETBP1 mutations*. Br J Haematol. 2015 Oct;171(1):137-41.

4_ **Ademà V**, Torres E, Solé F, Serrano S, Bellosillo B. *Paraffin treasures: do they last forever?* Biopreserv Biobank. 2014 Aug;12(4):281-3.

5. **Adema V**, Bejar R. *What lies beyond del(5q) in myelodysplastic syndrome?* Haematologica. 2013 Dec;98(12):1819-21. doi: 10.3324/haematol.2013.094912.

6_ Salido M, Martínez-Avilés L, **Ademà V**, Ferrer A, Espinet B, Garcia M,

Salar A, Besses C, Florensa L, Serrano S, Bellosillo B, Solé F. *Absence of mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in splenic B-cell marginal zone lymphoma*. *Leuk Res*. 2011 Mar;35(3):e23-4. doi: 10.1016/j.leukres.2010.10.014. Epub 2010 Nov 18.

6.3 PRESENTACIÓN EN CONGRESOS DEL TRABAJO REALIZADO DURANTE LA TESIS DOCTORAL:

1_ **Adema V**, Palomo L, Diez-Campelo M, Mallo M, Arenillas L, Luño E, Perez A, Gomez-Marzo P, Yost SE, Zamora L, Xicoy B, Pedro C, del Cañizo C, Sanzo C, Lopez R, Lemes A, Raya JM, Ríos E, Arnan M, de Paz R, Sánchez-García J, Florensa L, Gut I, Bayes M, Bejar R, Solé F. *Whole-exome sequencing in Myelodysplastic Syndromes with 5q deletion*.

Tipo de presentación: Póster

Congreso: 56th ASH Annual Meeting and Exposition. December 6-9, 2014

2_ **Adema V**, Larráyoiz MJ, Calasanz MJ, Palomo L, Patiño-García A, Agirre X, Hernández-Rivas JM, Lumbreras E, Buño I, Martínez-Laperche C, Mallo M, García O, Gomez-Marzo P, Álvarez S, Blazquez B, Cervera J, Luño E, Valiente A, Vallespí MT, Vicente A, Arenillas L, Collado R, Pérez-Oteyza J, Solé F. *Myelodysplastic syndromes with *i(17)(q10)* and prognostic implications of mutations of TP53 and SETBP1*.

Tipo de presentación: Póster

Congreso: 56th ASH Annual Meeting and Exposition. December 6-9, 2014

3_ **Vera Adema**, María José Larráyoiz, María José Calasanz, Laura Palomo, Jesús María Hernandez, Eva Lumbreras, Ismael Buño, Carolina Martínez-Laperche, Olga García, Sara Alvarez, Beatriz Blazquez, José Cervera, Elisa Luño, Alberto Valiente, María Teresa Vallespí, Ana Vicente, Leonor Arenillas, Rosa Collado, Jaime Perez-Oteyza, Francesc Solé. *Implicación de TP53 y SETBP1 en los síndromes mielodisplásicos con *i(17)(q10)**.

Tipo de presentación: Ponencia

Congreso: V Simposio del Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica (GCECGH)". Oviedo, 8-9 Mayo 2014

4_ **Adema V**, Mallo M, Arenillas L, Diez-Campelo M, Luño E, Palomo L, Perez-Ladaga A, Yost S, Cheng CP, Harismendy O, Zamora L, Xicoy B, Pedro C, del Cañizo C, Sanzo C, Lopez R, Lemes A, Raya JM, Ríos E, Arnán M, de Paz R, Sanchez Garcia J, Florensa L, Bejar R, Sole F. *Whole-Exome Sequencing in Myelodysplastic Syndrome with 5q- and normal karyotype*. 55th ASH Annual Meeting and Exposition. December 7-10, 2013. [Poster]

Tipo de presentación: Póster

Congreso: 55th ASH Annual Meeting and Exposition. December 7-10, 2013

5_ **V Adema**, JM Hernandez, M Abaigar, E Lumbreras, E Such, A Calull, E Dominguez, M Mallo, L Arenillas, J Cervera, I Marugan, M Tormo, F Garcia, T Gonzalez, E Luño, C Sanzo, ML Martin, M Fernandez Guisjarro, D Costa, B Blazquez, B Barrena, F Marco, A Batlle, I Buno, C Martinez, V Noriega, R Collado, D Ivars, F Carbonell, I Vallcorba, J Melero, E Delgado, MT Vargas, J Grau, M Salido, B Espinet, C Melero, L Florensa, C Pedro, F Sole. *Aplicación del FISH de 7q en SMD con ausencia de -7/7q- por citogenética convencional*. Haematologica 96, extra 2: PO-308, p. 132.

Tipo de presentación: Póster

Congreso: "LIII Reunión Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia XXVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia" Zaragoza, 27-29 de Octubre de 2011

6_ **V. Ademà**, A. Ferrer, M. Salido, B. Espinet, E. Puigdecanet, L. Nonell, A. Salar, J.M. Raya, L. Morabito, E. Luño, C. Sanzo, F.J. Ortuño, M.M. Osma, E. Tuset, A. Lemes, L. Mayor, C. Pérez-Barrachina, P. Mayayo, E. Salido, C. Melero, R. Navarro, B. Bellosillo, L. Florensa, S. Serrano, F. Solé. *Aplicación de la técnica de SNP arrays (SNP 6.0, Affymetrix) para la caracterización citogenética del linfoma de la zona marginal esplénico (LZME) y la tricoleucemia*. Haematologica 95, extra 2: PO307, p.127.

Tipo de presentación: Póster

Congreso: “LII Reunión Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia XXVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia”, Las Palmas de Gran Canaria, 28-30 de Octubre de 2010.

6.4 COLABORACIÓN EN LA REALIZACIÓN DEL CAPÍTULO DE UN LIBRO

Ademà V, Mallo M, Puiggròs A, Salido M, Espinet B, Solé F. Capítulo 11: *Métodos citogenéticos en hematopatología*. En Manual de Técnicas de Laboratorio en Hematología. Elsevier España. ISBN 978-84-458-2147-3. Ed. JL. Vives. 2014.

“Fes una foto del terrat, que des d’aquí puc veure Mart. La roba estesa, el meu agost, un camp d’espigues i cargols. Esperarem que passi el fred i sota l’arbre parlarem de tot. Un bioritme elemental, un mar d’antenes i animals. Els astronautes volen baix, els núvols passen com qui no diu res. Amb les butxaques a les mans, caminarem els passos d’altres peus. Esmorzarem pa amb oli i sal, ho vestirem amb unes copes de vi. Deixant de banda la ciutat, la tarda és llarga, i portser més, molt més, la nit. Un altre lloc, un altre temps, on parlarem amb altres déus. El meu secret subtítulat, camins d’arròs, camins de blat. Esperarem que baixi el sol, i sota l’arbre parlarem del temps. Un bioritme elemental, un tros de vida artificial. Els astronautes volen baix, els núvols passen com qui no diu res. Amb les butxaques a les mans, caminarem els passos d’altres peus. Esmorzarem pa amb oli i sal, ho vestirem amb unes copes de vi. Deixant de banda la ciutat, la tarda és llarga, i portser més, molt més, la nit.”

Pa amb oli i sal. El Turista. Blaumut, 2012