



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Estrategias de mejora en la evaluación diagnóstica y pronóstica de los síndromes mielodisplásicos

Leonor Arenillas Rocha



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- Compartiqual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - Compartiqual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0. Spain License.**

**Departamento de Medicina**



**Facultad de Medicina**

**Universidad de Barcelona**

**Estrategias de mejora en la evaluación  
diagnóstica y pronóstica de los síndromes  
mielodisplásicos**

Memoria presentada por

**Leonor Arenillas Rocha**

para optar al Grado de

**Doctora en Medicina**

Tesis realizada bajo la dirección de los doctores **Lourdes Florensa  
Brichs** y **Francesc Solé Ristol** y la tutoría del doctor **Benet  
Nomdedeu Tobella**

**Leonor Arenillas Rocha    Lourdes Florensa Brichs    Francesc Solé Ristol**

**Barcelona, 2017**





La Dra. Lourdes Florensa Brichs, que hasta Noviembre de 2016 ocupó los cargos de jefa de sección del Laboratorio de Citología Hematológica y jefa del grupo de investigación translacional en neoplasias hematológicas (GRETNHE) del Instituto de Investigación Hospital del Mar (IMIM) y el Dr. Francesc Solé Ristol, director científico del Institut Josep Carreras (IJC) Campus ICO-GTIP, director de la Plataforma de Citogenética y Jefe del grupo de investigación en Síndromes Mielodisplásicos del Instituto de Investigación contra la Leucemia Josep Carreras, Badalona (Barcelona).

## CERTIFICAN

Que la tesis doctoral titulada “Estrategias de mejora en la evaluación diagnóstica y pronóstica de los síndromes mielodisplásicos”, presentada por Leonor Arenillas Rocha para acceder al título de Doctora en Medicina se ha llevado a cabo bajo su supervisión y cumple los requisitos formales y científicos para ser defendida ante el tribunal correspondiente.

El trabajo ha sido realizado en el los laboratorios de Citología Hematológica y Citogenética Molecular del Servicio de Patología del Hospital del Mar de Barcelona.

Barcelona, 2017

Dra. Lourdes Florensa Brichs

Dr. Francesc Solé Ristol



*Cuando creíamos que teníamos todas las respuestas, de pronto, cambiaron todas las preguntas*

**Mario Benedetti**



A mis padres  
A Ramón, Ana y Sara



# **AGRADECIMIENTOS**





En breve cerraré una importante etapa académica y casi vital. Es el momento de dar las gracias a todas las personas que me han acompañado en esta aventura, que ha durado un poco más de lo previsto. Han sido muchas más de las que puedo enumerar en estas líneas, espero haber demostrado a todas ellas mi gratitud a lo largo de estos años.

En primer lugar, a mis directores de tesis, la Dra. Lourdes Florensa y el Dr. Francesc Solé. Lourdes, me gustaría darte las gracias por haberme enseñado tantas cosas, por tantas horas sentadas al micro hablando de células (y de lo que no son células), por haber sido tan generosa conmigo, en definitiva, por ser mi maestra y por estar siempre ahí. Tu energía, entusiasmo y ganas de aprender son admirables. Kiko, gracias por confiar en mí y por ofrecerme un proyecto que me hizo recobrar la ilusión por esto de la tesis, que se me había atragantado un poco. Aunque ya no estamos en el mismo centro, estoy segura de que seguiremos trabajando juntos.

A Ana Ferrer, tantos años compañera y ahora además jefa, gracias por tu confianza, tu rigor y por todos estos años de vivencias, seguiremos construyendo cosas juntas.

A Xavi Calvo, mi compañero. Te incorporaste al final de esta etapa, pero qué final. Gracias por tu pasión por lo que hacemos, por tu profundidad de análisis y por tus noches sin dormir para regalarme por las mañanas nuevos enfoques y “happy ideas”.

A Mar Mallo, qué bien he trabajado contigo. Gracias por ayudarme tanto en el Lab. Pude llevar a cabo el trabajo de los SNP gracias a tu generosa ayuda y a las compañeras del SAM, Eulalia y Lara. Gracias Mar por nuestras largas conversaciones. Te echo de menos.

A Encarna Pérez Vila, por ser una gran citología y una excelente compañera, gracias.

A la Dra. Soledad Woessner, gracias por enseñarnos tanto, por su compromiso con la docencia y su dedicación al estudio.

A Marta, Anna y Blanca, compañeras de citogenética, menudo equipazo. Sois geniales, tanto profesional como personalmente. Con vosotras sí que es fácil lo del “diagnóstico integrado”. A Sergi por nuestras conversaciones matutinas.

A Montse, Rosa, Bea, Yolanda, Carme y María, las técnicas del Lab. Es un verdadero lujo trabajar con vosotras. A Juani y Asun.

A los compañeros de biología molecular. Gracias Gemma, Alba y Bea.

A los residentes que he tenido a lo largo de estos años: Marta, Tere (mi Tere), Sílvia (Silvi, cuantos buenos ratos juntas), Juan, Anna, Águeda (solete), Alicia, Meri, Erik (mi amigo Erik), Sara, Laia, Ivonne, a los resis externos... a todos ellos gracias por enseñarme cosas y por ser un estímulo constante para el estudio.

A los compañeros de hematología clínica, especialmente a Carme Pedro y Francesc García.

A los compañeros del servicio de Patología. Al Dr. Sergi Serrano por confiar en mí para formar parte de este gran equipo profesional y humano. A Belen Lloveras, por entender nuestra “rareza” de hematólogos en un mundo de patólogos. A Lluís Colomo, ha sido una suerte volver a coincidir.

A todos mis antiguos compañeros del Hospital Clínic. Gracias a Armando, Jordi y Maruja por acompañarme en mis primeros pasos como especialista, y por las muestras de cariño y confianza. Al Dr. Benet Nomdedeu, tutor de esta tesis, por enseñarme que los SMD podían ser una enfermedad atractiva y por ser un médico con mayúsculas. A mis compañeros residentes. Gracias Anna Gaya y Olga Salamero por seguir compartiendo vivencias. A Alberto Álvarez, tantos años compañero en el Mar, gracias por tu confianza.

A los miembros del Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos (GESMD), especialmente a Guillermo Sanz, Fernando Ramos, Leonor Senent y Elisa Luño. Esta tesis no habría sido posible sin vuestra enorme implicación.

Al Prof. José Vilches-Troya y a la Dra. Mercedes Salido, a los que tuve la suerte de conocer en 1996 cuando entré como alumna interna de biología celular en el departamento de Anatomía Patológica de la Universidad de Cádiz. Del departamento, además de un marido, me llevé vuestras enseñanzas y mis primeras experiencias en la investigación. Al Dr. Antonio Paz, mi adjunto de hematología en la facultad, sin duda las prácticas que hice contigo son las “culpables” de que hoy sea hematóloga.

A los pacientes y sus familias, por su generosidad. Ellos dan sentido a todo el esfuerzo.

A mis amigos, con cariño especial a Olga y Edu, Laura y Pablo, Ainhoa y Oscar, por estar ahí siempre para recargar pilas

A mis padres, por quererme tanto y por esforzarse para darnos a mis hermanas y a mí lo más valioso, el cariño y la formación. A mis suegros, por cuanto me quisieron y porque sé que hoy estarían orgullosísimos de mi carrera y mi familia. A mis hermanas Ana Eva y Paloma, porque aunque viva a 1100 kilómetros nada podrá separarnos. A mis cuñados Dani, Chuchi y Rosi. A mis sobrinos Javi, Jesús, Sonia y Lola. A la tía Pachi por querernos y cuidarnos tanto.

A Ramón, por estar siempre a mi lado, soy tan afortunada. Por creer siempre en mí y en mi carrera. Nada de esto habría sido posible sin tu generosidad y esfuerzo. Ahora te toca a ti.

A mis hijas Ana y Sara, lo más bonito que tengo.

Los resultados de esta tesis han generado 3 artículos:

Senent L\*, **Arenillas L\***, Luño E, Ruiz JC, Sanz G, Florensa L. Reproducibility of the World Health Organization 2008 criteria for myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2013; 98(4): 568-575.

\* Contribución como primeros autores

**Arenillas L**, Calvo X, Luño E, Senent L, Alonso E, Ramos F, Ardanaz MT, Pedro C, Tormo M, Marco V, Montoro J, Díez-Campelo M, Brunet S, Arrizabalaga B, Xicoy B, Andreu R, Bonanad S, Jerez A, Nomdedeu B, Ferrer A, Sanz GF, Florensa L. Considering Bone Marrow Blasts From Nonerythroid Cellularity Improves the Prognostic Evaluation of Myelodysplastic Syndromes. *J Clin Oncol*. 2016 Sep 20;34(27):3284-92.

**Arenillas L**, Mallo M, Ramos F, Guinta K, Barragán E, Lumbreras E, Larráyoiz MJ, De Paz R, Tormo M, Abáigar M, Pedro C, Cervera J, Such E, José Calasanz M, Díez-Campelo M, Sanz GF, Hernández JM, Luño E, Saumell S, Maciejewski J, Florensa L, Solé F. Single nucleotide polymorphism array karyotyping: a diagnostic and prognostic tool in myelodysplastic syndromes with unsuccessful conventional cytogenetic testing. *Genes, Chromosomes Cancer*. 2013;52(12): 1167-1177.



# ÍNDICE



## Índice

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>III</b>
<b>TABLAS Y FIGURAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1. SINDROMES MIELODISPLÁSICOS .....	3
1.1 DEFINICIÓN.....	3
1.2 EPIDEMIOLOGÍA .....	3
1.3 ETIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO .....	3
1.4 PATOGENIA.....	4
1.5 MANIFESTACIONES CLÍNICAS .....	7
2. DIAGNÓSTICO Y CLASIFICACIÓN DE LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS .....	8
2.1 CRITERIOS MÍNIMOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE SMD .....	9
2.2 CLASIFICACIÓN DE LOS SMD.....	10
2.2.1 CLASIFICACIÓN FAB.....	10
2.2.2 CLASIFICACIÓN OMS 2001 .....	11
2.2.3 CLASIFICACIÓN OMS 2008.....	12
2.2.4 REVISIÓN 2016 DE LA CLASIFICACIÓN OMS .....	17
2.3 VALOR DIAGNÓSTICO DE LA CITOLOGÍA DE SANGRE PERIFÉRICA Y MÉDULA ÓSEA.....	18
2.4 VALOR DIAGNÓSTICO DE LA CITOGENÉTICA .....	21
2.4.1 ALTERACIONES CITOGENÉTICAS EN LOS SMD .....	21
2.4.2 TÉCNICAS DE ANÁLISIS GENÉTICO.....	23
2.4.2.1 CITOGENÉTICA CONVENCIONAL.....	23
2.4.2.2 HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE (FISH).....	25
2.4.2.3 MICROARRAYS GENÓMICOS .....	25
2.4.2.4 TÉCNICAS DE SECUENCIACIÓN .....	28
2.5 VALOR DIAGNÓSTICO DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO.....	31
2.6 VALOR DIAGNÓSTICO DEL ESTUDIO HISTOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA MÉDULA ÓSEA .....	32
3. EVALUACIÓN PRONÓSTICA DE LOS SMD .....	33
3.1 FACTORES PRONÓSTICOS .....	33
3.1.1 VALOR PRONÓSTICO DE LA CITOLOGÍA.....	34
3.1.2 VALOR PRONÓSTICO DE LAS ALTERACIONES CITOGENÉTICAS....	35
3.1.3 VALOR PRONÓSTICO DE LAS MUTACIONES .....	37
3.1.4 VALOR PRONÓSTICO DE LAS ALTERACIONES INMUNOFENOTÍPICAS .....	38
3.2 ÍNDICES PRONÓSTICOS.....	38
3.2.1 INTERNATIONAL PROGNOSTIC SCORING SYSTEM (IPSS).....	38
3.2.2 REVISED PROGNOSTIC SCORING SYSTEM (IPSS-R).....	40
3.2.3 WHO PROGNOSTIC SCORING SYSTEM.....	41
3.2.4 MD ANDERSON GLOBAL PROGNOSTIC SCORING SYSTEM (MPSS) Y LOW-RISK PROGNOSTIC SCORING SYSTEM (LR-PSS).....	42



3.2.5 RECOMENDACIÓN DEL GESMD PARA LA ESTRATIFICACIÓN PRONÓSTICA DE LOS SMD.....	43
4. TRATAMIENTO DE LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS.....	43
<b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>47</b>
<b>III. MÉTODOS Y RESULTADOS .....</b>	<b>51</b>
<i>PRIMER TRABAJO</i> .....	55
<i>SEGUNDO TRABAJO</i> .....	59
<i>TERCER TRABAJO</i> .....	85
<b>IV. DISCUSIÓN .....</b>	<b>101</b>
<i>PRIMER TRABAJO</i> .....	103
<i>SEGUNDO TRABAJO</i> .....	107
<i>TERCER TRABAJO</i> .....	111
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>115</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>121</b>
<b>VII. ANEXOS .....</b>	<b>139</b>

## **ABREVIATURAS**



## **ABREVIATURAS**

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AEE: Agentes estimulantes de eritropoyesis

ALIP: *Atypical localization of immature precursors*

ALO-TPH: Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos

AR: Anemia refractaria

AREB: Anemia refractaria con exceso de blastos

AREB-T: Anemia refractaria con exceso de blastos en transformación

ARN: Ácido ribonucleico

ARSA: Anemia refractaria con sideroblastos en anillo

AZA: Azacitidina

BAC: Bacterial artificial chromosome

CGH: Comparative genomic hybridization

CHIP: *Clonal hematopoiesis of indeterminate potential*

CN: *Copy number*

CNA: *Copy number alteration*

CNE: Celularidad no eritroide

CPE: *Concordance probability estimate*

CRDM: Citopenia refractaria con displasia multilínea

CRDM-SA: Citopenia refractaria con displasia multilínea con sideroblastos en anillo

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ELN: *European Leukemia Net*

ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*

FAB: Francés-Americano-Británico

FISH: *Fluorescence in situ hybridization*

G-CSF: Factor estimulante de colonias granulocíticas

GESMD: Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos

HR: *Hazard ratio*

HUMARA: *Human Androgen Receptor Gene Assay*

ICC: *Intraclass correlation coefficient*

ICUS: *Idiopathic cytopenia of undetermined significance*

IDUS: *Idiopathic dysplasia of undetermined significance*

IWG: *International Working Group*

IWGM-MDS: *International Working Group on Morphology of Myelodysplastic Syndrome*

IPSS: *International Prognostic Scoring System*

IPSS-R: *Revised International Prognostic Scoring System*

ISCN: *International System for Human Cytogenetics Nomenclature*

LMA: Leucemia mieloide aguda

LMMC: Leucemia mielomonocítica crónica

LOH: *Loss of heterozygosity*

MO: Médula ósea

MPSS: *MD Anderson Global Prognostic Scoring System*

NCCN: National Comprehensive Cancer Network

NGS: *Next generation sequencing*

NMP: Neoplasia mieloproliferativa

NMP/SMD: Neoplasia mieloproliferativa/mielodisplásica

OMS: Organización mundial de la salud

PAS: *Periodic acid–Schiff*

QT: Quimioterapia

SG: Supervivencia global

SLP: Supervivencia libre de progresión

SMD: Síndrome mielodisplásico

SMD-E: Síndrome mielodisplásico con incremento de serie eritroide

SNP: *Single nucleotide polymorphisms*

SP: Sangre periférica

TC: Totalidad celular

TIS: Tratamiento inmunosupresor

TPH: Trasplante de progenitores hematopoyéticos

UPD: *Uniparental disomy*

WPSS: *WHO classification-based prognostic scoring system*



## **TABLAS Y FIGURAS**





## **TABLAS**

**Tabla 1.** Clasificación FAB de los SMD.

**Tabla 2.** Clasificación OMS 2001 de los SMD.

**Tabla 3.** Clasificación OMS 2008 de los SMD.

**Tabla 4.** Características morfológicas de las neoplasias mieloides que cursan con 50% o más eritroblastos en MO (OMS 2008).

**Tabla 5.** Revisión 2016 de la clasificación OMS.

**Tabla 6.** Rasgos de displasia descritos en la clasificación OMS 2008 y en publicaciones del IWGM-MDS.

**Tabla 7.** Alteraciones citogenéticas asociadas a SMD según la clasificación OMS 2008.

**Tabla 8.** Alteraciones citogenéticas más frecuentes en los distintos subgrupos morfológicos de la clasificación OMS 2008.

**Tabla 9.** Comparación de las técnicas de análisis citogenético.

**Tabla 10.** Valor pronóstico de las alteraciones citogenéticas más frecuentes en SMD.

**Tabla 11.** Sistema de puntuación del IPSS.

**Tabla 12.** Grupos de riesgo del IPSS y mediana de supervivencia global de cada uno de ellos.

**Tabla 13.** Sistema de puntuación del IPSS-R.

**Tabla 14.** Grupos de riesgo del IPSS-R y mediana de supervivencia global de cada uno de ellos.

**Tabla 15.** Sistema de puntuación del WPSS.

**Tabla 16.** Grupos de riesgo del WPSS y mediana de supervivencia global de cada uno de ellos.

## **FIGURAS**

**Figura 1.** Prevalencia de mutaciones somáticas según la edad.

**Figura 2.** Modelo de evolución de hematopoyesis normal a LMA pasando por fases de CHIP y SMD.

**Figura 3.** Diagnóstico diferencial de los SMD con otras causas de citopenias clonales o no clonales.

**Figura 4.** Elementos de serie eritroide, granulocítica y megacariocítica con rasgos displásicos.

**Figura 5.** Incidencia de las alteraciones cromosómicas más frecuentes en los SMD.

**Figura 6.** Consecuencias patogénicas de las pérdidas de heterocigosidad.

**Figura 7.** Distribución de las anomalías recurrentes y las alteraciones citogenéticas en los SMD.

**Figura 8.** Algoritmo de tratamiento para SMD de bajo riesgo según GESMD.

**Figura 9.** Algoritmo de tratamiento para SMD de alto riesgo según GESMD.





# **I. INTRODUCCIÓN**



## **1. SINDROMES MIELODISPLÁSICOS**

### **1.1 Definición**

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) son un conjunto de enfermedades clonales de las células progenitoras hematopoyéticas caracterizados por la presencia de hematopoyesis ineficaz (una médula ósea (MO) normo o hiper celular con citopenias a nivel periférico), rasgos morfológicos de displasia en las distintas series mieloides y un riesgo incrementado de transformación a leucemia mieloblástica aguda (LMA). Se clasifican dentro de las neoplasias mieloides.<sup>1</sup>

### **1.2 Epidemiología**

Los SMD constituyen una de las neoplasias hematológicas más frecuentes, sobre todo en personas de edad avanzada, con una edad media de presentación de 70 años, presentando el 25% de los pacientes diagnosticados una edad superior a 80 años.<sup>2</sup>

Dado que el diagnóstico de los SMD resulta complejo en algunas ocasiones, su incidencia exacta es difícil de determinar. La incidencia estimada en Europa Occidental y Norte América es de 3 a 5 casos por cada 100.000 individuos, que se incrementa a 20-50 casos por 100.000 en personas mayores de 60 años.<sup>3,4,5</sup> Esto significa que en Europa se diagnostican anualmente aproximadamente 25.000 nuevos casos, y dado el progresivo envejecimiento de la población europea, este número se incrementará en los próximos años.<sup>6</sup>

Estos datos epidemiológicos hacen pensar que los SMD seguirán constituyendo una enfermedad con un impacto importante dentro de la práctica clínica diaria de la hematología.

Son aproximadamente dos veces más frecuentes en hombres que en mujeres.<sup>3</sup>

### **1.3 Etiología y factores de riesgo**

Los SMD son enfermedades clonales de las células hematopoyéticas. Aproximadamente del 10 al 20% de los casos ocurren de forma secundaria a agentes citotóxicos (quimioterápicos y/o inmunosupresores) y/o a radioterapia.<sup>1,7-8</sup> El 80%



restante son casos esporádicos o *de novo*. Se han descrito posibles etiologías de estos SMD primarios, como por ejemplo, la exposición a tóxicos medioambientales (benceno, amonio, disolventes, pesticidas, tabaco, alcohol...).<sup>9-10</sup>

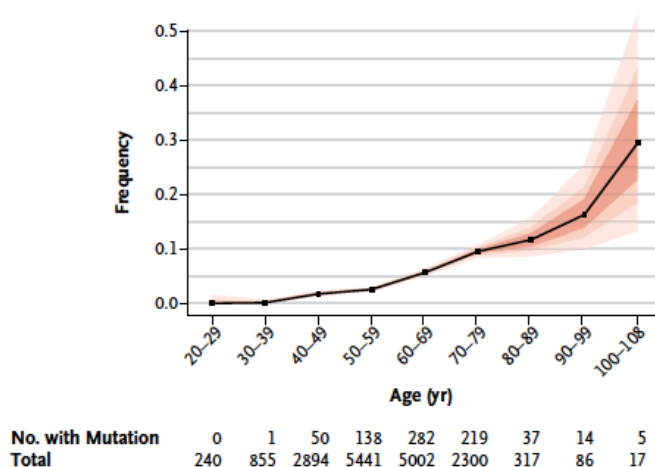
Existen anomalías hereditarias, como mutaciones en línea germinal del gen *GATA2*, que predisponen al desarrollo de síndromes mielodisplásicos.<sup>11-12</sup> También se detecta un riesgo incrementado de desarrollo de síndromes mielodisplásicos en enfermedades hematológicas congénitas como son la anemia de Fanconi, la disqueratosis congénita, el síndrome de Shachmann-Diamond o el síndrome de Diamond-Blackfan.<sup>13</sup>

#### **1.4 Patogenia**

Se ha aceptado durante años que el origen de los SMD está en una *stem cell* o célula madre hematopoyética. Esta afirmación estaba basada en estudios de clonalidad mediante patrones de inactivación del cromosoma X y en estudios en los que se identificaron las mismas anomalías cromosómicas en células de diferentes linajes.<sup>14</sup> Una demostración formal de esto fue llevada a cabo por Woll y colaboradores<sup>15</sup> cuyos resultados proporcionan una fuerte evidencia de que los SMD se generan por la aparición de mutaciones en células con el fenotipo de las células madres hematopoyéticas normales (Lin-, CD34+, CD38-, CD90- (también conocidas como THY1+), CD45RA-, también conocidas como PTPRC-)). Estas células madres hematopoyéticas alteradas presentarían una ventaja proliferativa respecto a sus contrapartidas normales y como consecuencia de esto, las células hijas resultantes ocuparían la médula ósea.<sup>16</sup> Esto constituiría una hematopoyesis clonal pero, a diferencia de lo que ocurre en la LMA, estas células clonales retendrían la capacidad de madurar.<sup>17</sup> Estas células presentarían además un incremento de la apoptosis, lo que explicaría la presencia de citopenias a nivel periférico.<sup>18</sup> Aunque se ha asumido que el evento genético inicial de los SMD ocurre sobre una célula madre comprometida hacia línea mieloide, hoy se sabe que los pacientes con hematopoyesis clonal tienen un riesgo incrementado de desarrollar tanto patología mieloide como linfoide. Esto podría tener dos posibles explicaciones, o bien, existe un solapamiento de las mutaciones presentes en las diferentes enfermedades, o bien, estas mutaciones ocurren sobre un precursor común más inmaduro.<sup>19</sup> Los pacientes con SMD que finalmente desarrollan

una leucemia mieloide adquieren además nuevas mutaciones que confieren capacidad de auto-renovación, tanto en el compartimento más inmaduro (*stem cell* leucémica) como en progenitores mieloides más maduros.<sup>15</sup>

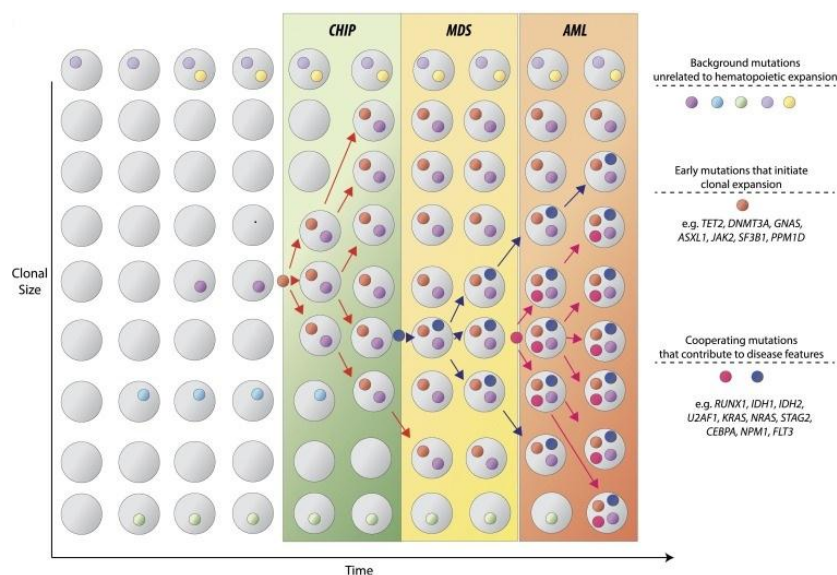
Tanto en los SMD como en otras neoplasias mieloides se ha hipotetizado sobre la existencia de un posible estado “pre-maligno”. Mediante estudios de inactivación del cromosoma X, se observó que casi el 40% de las mujeres sanas (sin hemopatía conocida) de más de 60 años estudiadas presentaban mutaciones en *TET2*, lo que sugería la presencia de una hematopoyesis clonal iniciada por una mutación somática.<sup>20</sup> Más recientemente, estudios de secuenciación del exoma en muestras de sangre periférica (SP) de más de 30.000 personas sin historia conocida de hemopatía maligna demostraron la presencia de mutaciones somáticas recurrentes en genes asociados a patología mieloide en casi el 10% de las personas mayores de 65 años y en más del 20% de mayores de 90 años (Figura 1)<sup>19,21,22</sup>. Este fenómeno ha sido denominado hematopoyesis clonal de significado incierto (CHIP, del inglés *clonal hematopoiesis of indeterminate potential*).<sup>23</sup> Los genes en los que se encontró más frecuentemente mutaciones fueron *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, *TP53*, *JAK2* y *SF3B1*, todos ellos descritos en SMD. En estos estudios, la presencia de CHIP fue un importante predictor del desarrollo de una posterior neoplasia hematológica (hazard ratio (HR) = 11.1), con un riesgo anual de 0.5-1% y una disminución en supervivencia global (SG) (HR para muerte por cualquier causa=1.4), comparado con el grupo control.<sup>19</sup> Pese a estos datos, el riesgo absoluto de desarrollar una neoplasia hematológica en personas con CHIP es bajo, lo que probablemente refleja que para desarrollar la enfermedad es necesario adquirir mutaciones adicionales. En los modelos de evolución clonal, la transición de CHIP a SMD ha sido descrita como un proceso complejo en el que probablemente intervienen: alteraciones epigenéticas en la *stem cell* hematopoyética<sup>24</sup>, anomalías en el microambiente medular<sup>25</sup> y la adquisición escalonada de mutaciones adicionales.<sup>26-27</sup>



**Figura 1.** Prevalencia de mutaciones somáticas según la edad. (Adaptado de Jaiswal *et al*, 2014).<sup>19</sup>

Estudios de jerarquía de mutaciones en pacientes con SMD han mostrado que las mutaciones que ocurren en genes de la maquinaria de *splicing* y de la maquinaria epigenética parecen eventos iniciales en la evolución de los SMD, mientras que las mutaciones en factores de transcripción (*RUNX1*, *GATA2* y *CUX1*) pueden ser eventos tanto iniciales como tardíos.<sup>28</sup> Qué mutación y cuando aparece podría explicar en parte el fenotipo de la enfermedad, como es el caso de la asociación de la mutación de *SF3B1* y los SMD con sideroblastos en anillo.<sup>29-31</sup>

Si bien se ha descrito que los CHIP pueden preceder al SMD, la evolución a LMA podría considerarse el estadio final de la evolución de la enfermedad (Figura 2)<sup>23</sup>. Esta transición suele conllevar la adquisición de alteraciones genéticas asociadas a LMA, como mutaciones en genes que codifican para moléculas de las vías de transducción de señales, como *FLT3* y *N-RAS*,<sup>32</sup> o mutaciones inactivadoras de genes que codifican para factores de transcripción como CEBPA. En comparación con las LMA *de novo*, las LMA secundarias a SMD presentan una mayor frecuencia de mutaciones en *SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *ASXL1*, *EZH2*, *BCOR* y *STAG2*.<sup>33</sup>



**Figura 2.** Modelo de evolución de hematopoyesis normal a LMA pasando por fases de CHIP y SMD. (Adaptado de Steensma *et al*, 2015).

Pese a todos estos avances en el conocimiento de la patogenia molecular de los SMD, existen numerosos aspectos desconocidos. La ausencia de mutaciones somáticas no excluye el diagnóstico de SMD y, por otro lado, el hallazgo de mutaciones no es sinónimo de neoplasia.

Tal y como ocurre con las mutaciones, las alteraciones cromosómicas pueden actuar como eventos iniciadores o conductores (*driver*) en el desarrollo de SMD o LMA. En múltiples estudios se ha intentado definir cuáles son los genes patogénicos involucrados en las deleciones más frecuentes.<sup>34</sup>

### 1.5 Manifestaciones clínicas

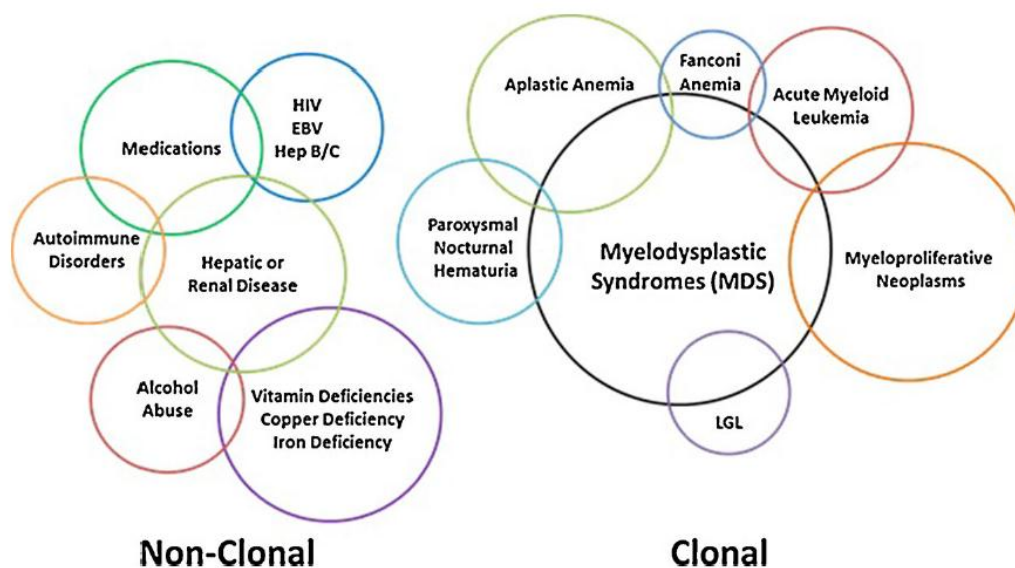
Aunque algunos pacientes pueden estar asintomáticos y ser diagnosticados a raíz del hallazgo incidental de una alteración en el hemograma, la mayoría de los pacientes presentan síntomas derivados de la presencia de citopenias. La intensidad de los síntomas dependerá del grado de las citopenias. La anemia suele ser la citopenia más frecuente. En ocasiones aparecen sangrados asociados a la trombocitopenia y otras veces fiebre o infecciones recurrentes asociadas a la neutropenia. Las visceromegalias son poco frecuentes.<sup>1</sup>

## 2. DIAGNÓSTICO Y CLASIFICACIÓN DE LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS

El diagnóstico de los SMD requiere la presencia de citopenia/s persistente/s en presencia de al menos una de las siguientes:

- 1) displasia en una o más líneas celulares y/o aumento de mieloblastos
- 2) anomalías citogenéticas clonales.

Los SMD son cuadros clínicamente heterogéneos agrupados por una serie de características comunes: citopenia/s, hematopoyesis ineficaz, rasgos morfológicos de displasia y un riesgo variable de transformación a LAM. La presencia de displasia y/o citopenias no son exclusivas de SMD y cuando están presentes es imprescindible descartar otras múltiples causas, clonales o no clonales (Figura 3).<sup>35</sup> Por estas razones su diagnóstico es complejo y requiere la integración de los aspectos clínicos y los resultados de varias técnicas. Para llevarlo a cabo es necesario conocer los datos clínicos (anamnesis y exploración física), de laboratorio (hemograma completo), morfológicos (estudio de SP y MO), así como, citogenéticos.<sup>36-38</sup>



**Figura 3.** Diagnóstico diferencial de los SMD con otras causas de citopenias clonales o no clonales. (Adaptado de Béjar *et al*, 2015).<sup>35</sup>

En el estudio de una citopenia, encontrar signos de displasia junto a una alteración citogenética clonal permite el diagnóstico concluyente de SMD.<sup>1,7,39</sup> Pero en muchas ocasiones el cariotipo es normal y el diagnóstico se basa exclusivamente en la

evaluación morfológica. En estas circunstancias, especialmente en los casos en los que las dismorfias son poco evidentes o no existe un exceso de blastos, el estudio inmunofenotípico mediante citometría de flujo, la evaluación histológica de la médula ósea y/o el estudio molecular, pueden ayudar al diagnóstico de la enfermedad.

## **2.1 Criterios mínimos para el diagnóstico de SMD**

En el año 2007 un comité de expertos de diferentes grupos científicos con experiencia en el diagnóstico y manejo de los SMD (NCCN (National Comprehensive Cancer Network), IWG (International Working Group) y ELN (European Leukemia Net) definieron unos criterios mínimos para el diagnóstico de SMD.<sup>40</sup>

**Prerrequisitos** (se deben cumplir ambos):

- 1) Presencia de una o más citopenia/s persistente/s al menos 6 meses (hemoglobina <11/dL, neutrófilos <1.500/ $\mu$ L y/o plaquetas <100.000/ $\mu$ L).
- 2) Exclusión de otras enfermedades hematológicas y no hematológicas como causa de citopenia y/o displasia.

**Criterios decisivos** (se debe cumplir al menos 1):

- 1) Displasia en al menos el 10% de las células de 1 ó más de las líneas mieloides en MO.
- 2) Presencia de 5-19% de blastos en MO.
- 3) Alteraciones cromosómicas típicas de SMD identificadas mediante citogenética convencional o FISH (5q-, -7, +8, 20q-, otras).

**Co-criterios** (cuando se cumplen los prerrequisitos pero no los criterios decisivos, y el paciente presenta un cuadro clínico muy sugestivo de SMD, como por ejemplo, requerimiento transfusional):

- 1) Fenotipo atípico en MO por citometría de flujo que indica población monoclonal.
- 2) Datos moleculares de clonalidad: HUMARA, perfil génico, mutaciones puntuales (RAS).
3. Disminución de la formación de colonias en MO y/o SP.

Cuando el paciente presenta una citopenia persistente pero no cumple los criterios mínimos para establecer el diagnóstico de SMD se denomina citopenia refractaria de significado incierto o ICUS (del inglés, *Idiopathic cytopenia of undetermined significance*).<sup>40</sup> Se conoce como displasia idiopática de significado incierto o IDUS (del inglés, *Idiopathic dysplasia of undetermined significance*) aquella situación en la que existe una displasia persistente como signo de hematopoyesis clonal pero sin citopenias.<sup>41</sup> Ambas condiciones podrían preceder a un SMD.<sup>42</sup>

## 2.2 Clasificación de los SMD

### 2.2.1 Clasificación FAB

En el año 1982 un grupo cooperativo Franco-Americano-Británico (FAB) llevó a cabo la primera clasificación de los SMD (Tabla 1).<sup>43</sup> En ella se definieron cinco categorías de SMD en función de las siguientes variables: cifra de monocitos en SP, porcentaje de blastos en SP y MO, presencia de bastones de Auer y el porcentaje de sideroblastos en anillo (sideroblastos con 5 o más gránulos de hemosiderina en localización perinuclear y que ocupa al menos 1/3 del contorno del núcleo<sup>44</sup>). Esta clasificación fue la más utilizada durante casi 20 años, ya que presentaba utilidad diagnóstica y pronóstica.

**Tabla 1.** Clasificación FAB de los SMD.<sup>43</sup>

	Blastos SP (%)	Blastos MO (%)	Monocitos SP ( $\times 10^9/L$ )	Sideroblastos en anillo MO (%)
AR	<1	<5 Sin bastones de Auer	< $1 \times 10^9/L$	$\leq 15$
ARSA	<1	<5 Sin bastones de Auer	< $1 \times 10^9/L$	>15
AREB	<5	5-19 Sin bastones de Auer	< $1 \times 10^9/L$	Indiferente
AREB-T	>5	20-29 ó Con bastones de Auer	< $1 \times 10^9/L$	Indiferente
LMMC MD/MP	<5	0-20	> $1 \times 10^9/L$	Indiferente

**Abreviaturas.** AR: anemia refractaria; ARSA: anemia refractaria con sideroblastos en anillo; AREB: anemia refractaria con exceso de blastos; AREB-T: anemia refractaria con exceso de blastos en transformación; LMMC: leucemia mielomonocítica crónica; MD: variante mielodisplásica,  $<13 \times 10^9$  leucocitos/L; MP: variante mieloproliferativa,  $\geq 13 \times 10^9$  leucocitos/L; SP: sangre periférica; MO: médula ósea.

### 2.2.2 Clasificación OMS 2001

En el año 2001, la OMS elaboró una nueva clasificación en la que incorporó nuevos conocimientos morfológicos y citogenéticos con objeto de mejorar la relevancia clínica y pronóstica de las distintas categorías. Así, teniendo en cuenta el número de citopenias, el número de líneas mieloides con displasia significativa, el porcentaje de blastos en SP y MO, la presencia o no de bastones de Auer, el porcentaje de sideroblastos en anillo y la presencia o no de delección (5q) aislada, definió 8 categorías (Tabla 2).<sup>39</sup>

**Tabla 2.** Clasificación OMS 2001 de los SMD.<sup>39</sup>

	Citopenias	Blastos SP (%)	Blastos MO (%)	Sideroblastos en anillo MO (%)	Displasia
<i>AR</i>	Anemia	<1	<5	<15	Eritroide
<i>ARSA</i>	Anemia	0	<5	≥15	Eritroide
<i>CRDM</i>	2 ó 3	<1	<5	<15	≥2 líneas
<i>CRDM-SA</i>	2 ó 3	<1	<5	≥15	≥2 líneas
<i>AREB-1</i>	1 o varias	<5	5-9	Indiferente	Indiferente
<i>AREB-2</i>	1 o varias	5-19	10-19	Indiferente	Indiferente Bastones de Auer*
<i>SMD del(5q)</i>	Anemia Plaquetas N o ↑	<5	<5	Indiferente	Megacariocitos con núcleo hipolobulado
<i>SMD inclasificable</i>	2 ó 3	≤1	<5	Indiferente	1 línea

\*La presencia de bastones de Auer es diagnóstica de AREB-2, independientemente del resto de las características.  
**Abreviaturas.** AR: anemia refractaria; ARSA: anemia refractaria con sideroblastos en anillo; CRDM: citopenia refractaria con displasia multilínea; CRDM-SA: citopenia refractaria con displasia multilínea con sideroblastos en anillo; AREB: anemia refractaria con exceso de blastos; N: cifra normal; SP: sangre periférica; MO: médula ósea.

Los principales cambios respecto a la clasificación FAB son:

- Elimina el subtipo de anemia refractaria con exceso de blastos en transformación (AREB-T). Los casos que presentan 20% o más blastos son diagnosticados de LMA.
- Los casos que presentan t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13.1;q22), t(16;16)(p13.1;p22) ó t(15;17)(q22;q12), son diagnosticados de LMA independientemente de la cifra de blastos.
- En los casos de anemia refractaria y anemia refractaria sideroblástica la displasia debe estar limitada a la serie eritroide.



- Se define un nuevo grupo de “citopenia refractaria con displasia multilínea”, ya que la presencia de displasia multilínea en los SMD sin exceso de blastos ha demostrado tener un impacto pronóstico desfavorable.<sup>45-47</sup> Se considera que una línea presenta displasia significativa cuando el 10% o más de sus elementos en MO presentan dismorfias.

- La anemia refractaria con exceso de blastos (AREB) se divide en 2 grupos, AREB-1 y AREB-2.

- La LMMC deja de formar parte de los SMD y pasa al grupo de neoplasias mieloproliferativas/mielodisplásicas (NMP/SMD).

- Define el “síndrome 5q” como una entidad concreta dentro de los SMD.

- La presencia de bastones de Auer es diagnóstica de AREB-2, independientemente del resto de las características. En la clasificación FAB era diagnóstico de AREB-T.

Esta clasificación que tuvo una gran aceptación, fue validada de forma prospectiva por el grupo de Düsseldorf en el año 2006.<sup>48</sup>

### **2.2.3 Clasificación OMS 2008**

En el año 2008, se publicó una nueva clasificación OMS<sup>1</sup> (Tabla 3), en la que se introducen los siguientes cambios:

- Los pacientes con citopenia/s persistente/s sugestiva/s de SMD pero sin rasgos morfológicos concluyentes de SMD pueden ser diagnosticados de SMD si presentan alteraciones citogenéticas características de SMD (se enumerarán posteriormente).

- El término anemia refractaria es sustituido por el término más genérico de citopenia refractaria con displasia unilínea. Dentro de esta categoría se encuentran la anemia refractaria, la neutropenia refractaria y la trombocitopenia refractaria.

- En la citopenia refractaria con displasia multilínea se elimina la distinción entre <15% ó ≥15% sideroblastos en anillo.

- Los pacientes que tienen 2-4% de blastos en SP y menos de 5% de blastos en MO son diagnosticados de AREB-1 si cumplen criterios de SMD.

- El término “síndrome 5q” se restringe a pacientes con unas características clínicas concretas. Para la categoría se crea el término más genérico “SMD con delección 5q aislada”.

- Se define la entidad provisional citopenia refractaria de la infancia.

**Tabla 3.** Clasificación OMS 2008 de los SMD.<sup>1</sup>

	Citopenias	Blastos SP (%)	Blastos MO (%)	Sideroblastos en anillo MO (%)	Displasia
<i>CRDU</i>	1 ó 2	<1	<5	<15	1 línea
<i>ARSA</i>	Anemia	0	<5	≥15	Sólo eritroide
<i>CRDM</i>	Citopenia/s	<1	<5	Indiferente	≥2 líneas
<i>AREB-1</i>	Citopenia/s	<5	5-9	Indiferente	Indiferente
<i>AREB-2</i>	Citopenia/s	5-19	10-19	Indiferente	Indiferente Bastones de Auer*
<i>SMD del(5q)</i>	Anemia Plaquetas N o ↑	<1	<5	Indiferente	Megacariocitos con núcleo hipolobulado
<i>SMD inclasificable</i>	Citopenias	≤1%	<5		<10% en ≥1 línea mieloide Alteraciones CG

\*La presencia de bastones de Auer es diagnóstica de AREB-2, independientemente del resto de las características.

Abreviaturas. CRDU; citopenia refractaria con displasia unilínea; ARSA: anemia refractaria con sideroblastos en anillo; CRDM: citopenia refractaria con displasia multilínea; AREB: anemia refractaria con exceso de blastos; SP: sangre periférica; MO: médula ósea.

A continuación se describen de forma somera cada uno de los subtipos de SMD según la clasificación OMS 2008.

### **Citopenia refractaria con displasia unilínea (CRDU)**

Este grupo supone entre un 10 y un 20% de los SMD. Incluye los pacientes con una citopenia o bicitopenia, displasia en sólo una de las líneas mieloides, menos de 1% de blastos en SP, menos de 5% de blastos en MO y menos de 15% de sideroblastos en anillo. Este grupo contiene fundamentalmente anemias refractarias (anemia con diseritropoyesis), y con menos frecuencia, neutropenias refractarias (neutropenia con disgranulopoyesis) y trombocitopenias refractarias (trombocitopenia con dismegacariopoyesis). En algunas ocasiones la línea displásica y la citopenia no coinciden.

### **Anemia refractaria con sideroblastos en anillo (ARSA)**

Representa el 3-11% de los SMD. Se define como la presencia de anemia, displasia en la serie eritroide y 15% o más sideroblastos en anillo (eritroblasto con 5 o más gránulos de hemosiderina en localización perinuclear y que ocupa al menos 1/3 del contorno

del núcleo<sup>53</sup>). Para su diagnóstico es necesario descartar otras causas de sideroblastos en anillo (alcohol, benceno, plomo, sobrecarga de zinc, deficiencia de cobre, isoniácida, anemia sideroblástica congénita). Estos pacientes suelen presentar anemia normocítica o macrocítica. En los casos en los que la cifra de plaquetas sea igual o superior a  $450 \times 10^9/L$  el diagnóstico será de anemia refractaria con sideroblastos en anillo y trombocitosis marcada, diagnóstico no incluido en los SMD sino en las NMP/SMD.<sup>1</sup> En el aspirado medular teñido con May-Grünwald-Giemsa se suele observar una MO con celularidad incrementada, numerosos mastocitos de morfología normal, un incremento de la serie eritroide y rasgos de diseritropoyesis, principalmente eritroblastos en los que coexiste distribución anómala de la hemoglobina y punteado basófilo.<sup>49,50</sup> Con la tinción de Perls, además de los sideroblastos en anillo se suele observar un incremento de macrófagos con sobrecarga férrica. La mutación del gen *SF3B1* está presente en aproximadamente el 80% de los SMD con sideroblastos en anillo.<sup>29-31</sup>

#### **Citopenia refractaria con displasia multilínea (CRDM)**

Supone aproximadamente el 30% de los SMD. Para su diagnóstico se requiere la presencia de displasia significativa (presente en  $\geq 10\%$  de los elementos) en al menos dos de las tres series mieloides, menos de un 1% de blastos en SP y menos de 5% de blastos en MO. A diferencia de la clasificación OMS 2001, no se hace distinción de subgrupos en función del número de sideroblastos en anillo.

#### **Anemia refractaria con exceso de blastos (AREB)**

Aproximadamente un 40% de los SMD corresponden a esta categoría. Se distinguen 2 subgrupos, AREB-1 (2-4% blastos en SP y 5-9% de blastos en MO) y AREB-2 (5-19% blastos en SP y 10-19% de blastos en MO). Cualquier SMD que presente bastones de Auer se clasifica como AREB-2.

#### **Síndrome mielodisplásico con delección 5q aislada**

Se incluyen en esta categoría aquellos SMD que presentan pérdida del brazo largo del cromosoma 5 como alteración citogenética única (o asociada a pérdida del cromosoma Y), con menos de 1% de blastos en SP y menos de 5% de blastos en MO. Generalmente cursa con anemia y plaquetas normales o elevadas, y a nivel citológico suele cursar con

una disminución del porcentaje de serie eritroide y la presencia de megacariocitos con núcleo monolobulado. La displasia de las otras series suele ser poco evidente. El término “síndrome mielodisplásico”, inicialmente descrito por Van den Berghe *et al* en 1974, queda limitado a los casos con anemia macrocítica, plaquetas normales o elevadas e hipoplasia eritroide.<sup>51</sup> La región comúnmente delecionada en esta entidad tiene aproximadamente 40 genes.<sup>52</sup> Mediante la técnica de ARN de interferencia se ha observado como la inhibición del gen *RPS14* provoca un fenotipo medular similar al que provoca la del(5q).<sup>53</sup> La deleción de 5q podría provocar una menor expresión de *RPS14* por haploinsuficiencia, y esto a su vez un incremento de la expresión total de p53 en los precursores eritroides.<sup>54</sup> El bloqueo de dos microRNA, miR-145 y miR-146a también se ha correlacionado con un fenotipo de mielodisplasia asociada a trombocitosis en modelos murinos.<sup>55</sup> Por último, se ha sugerido que el mecanismo de expansión clonal de esta entidad podría deberse a la expansión de  $\beta$ -catenina por haploinsuficiencia del gen *CSNK1A1*.<sup>56</sup>

### **Síndromes mielodisplásicos inclasificables**

Este grupo lo conforman:

- Pacientes con características de CRDU o CRDM pero con un 1% de blastos en SP.
- Casos con displasia unilínea pero con pancitopenia.
- Pacientes con citopenia persistente,  $\leq 1\%$  blastos en SP,  $< 5\%$  blastos en MO, displasia en alguna de las líneas mieloides pero en porcentaje menor al 10% y alguna de las alteraciones citogenéticas características de SMD (se trataran con posterioridad).

### **Formas especiales de SMD**

Si bien no constituyen subgrupos individualizados en la clasificación OMS, los SMD asociados a fibrosis (SMD-F) y los SMD hipoplásicos, presentan ciertas características distintivas.

SMD hipoplásico. Aproximadamente el 10% de los SMD cursa con hipocelularidad en el momento del diagnóstico. Esto conlleva dificultad en el diagnóstico diferencial, sobre todo con la aplasia medular. Es obligatorio descartar asimismo la presencia de toxicidad medular por fármacos y/o enfermedades autoinmunes.

SMD con mielofibrosis. En aproximadamente el 15% de los pacientes con SMD se ha observado fibrosis reticulínica significativa. Esta circunstancia suele asociarse a un alto requerimiento transfusional, trombocitopenia, displasia multilínea, exceso de blastos y alteraciones citogenéticas de mal pronóstico.<sup>57-59</sup>

En ambas formas especiales de SMD estaría indicada la realización de biopsia de médula ósea.<sup>1,36,60-62</sup>

En la elaboración de la clasificación OMS 2008 se produjo una falta de consenso entre los miembros del comité de expertos sobre cómo establecer el porcentaje de blastos en MO de aquellos pacientes con **SMD que presentan un incremento de la de serie eritroide** ( $\geq 50\%$  eritroblastos en MO), en base a la totalidad celular (TC) o en base al compartimento celular no eritroide (CNE). La recomendación final fue que en aquellos casos con  $\geq 50\%$  eritroblastos se debía hacer un recuento de blastos de la celularidad no eritroide. Si en este recuento en CNE el número de blastos era  $\geq 20\%$  se debía establecer el diagnóstico de LA eritroide/mieloide o eritroleucemia, y si era  $< 20\%$  se debía diagnosticar de SMD. En esta última circunstancia, recomendaban considerar la cifra de blastos resultante del recuento de la TC para establecer el subtipo de SMD.<sup>1</sup> En la Tabla 4 se resumen las características morfológicas de las neoplasias mieloides que cursan con  $\geq 50\%$  eritroblastos en MO, según la clasificación OMS 2008.<sup>1</sup>

**Tabla 4.** Características morfológicas de las neoplasias mieloides que cursan con 50% o más eritroblastos en MO (OMS 2008).<sup>1</sup>

% Eritroblastos en MO	Hallazgos en SP/MO	Otros hallazgos	Diagnóstico
$\geq 50\%$	SP: $\geq 20$ blastos ó MO: $\geq 20$ blastos de TC	Criterios de LMA con cambios relacionados con mielodisplasia*	<i>LMA con cambios relacionados con mielodisplasia</i>
$\geq 80\%$ precursores eritroides inmaduros	Escasos	Escaso componente granulocítico	<i>Leucemia eritroide pura</i>
$\geq 50\%$	SP: $< 20$ blastos MO: $< 20$ blastos de TC	MO: $\geq 20\%$ blastos de CNE	<i>Eritroleucemia</i>
$\geq 50\%$	SP: $< 20$ blastos MO: $< 20$ blastos de TC	MO: $< 20\%$ blastos de CNE	<i>SMD (para subclasificarlos usar el porcentaje de blastos de la TC)</i>

\* Criterios de LMA con cambios relacionados con mielodisplasia: historia previa de SMD o NMP/MD, o alteraciones citogenéticas relacionadas con mielodisplasia o displasia multilínea (presencia de rasgos displásicos en  $\geq 50\%$  de los elementos de al menos 2 de las 3 series mieloides). Todo ello en ausencia de antecedente de tratamiento quimioterápico o radioterápico y en ausencia de alteraciones citogenéticas recurrentes.<sup>1</sup>

**Abreviaturas.** MO: médula ósea; SP: sangre periférica; TC: totalidad celular; LMA: leucemia mieloblástica aguda. CNE: celularidad no eritroide.

### 2.2.4 Revisión 2016 de la clasificación OMS

En 2016, Arber y colaboradores publicaron un artículo en el que se recogen las modificaciones fundamentales incluidas en la revisión de la clasificación OMS (Tabla 5)<sup>7</sup> y que enumeramos a continuación:

- Se sustituye el término “citopenia refractaria” por “síndrome mielodisplásico”, con ello se obvia el problema de nomenclatura que surge en la infrecuente situación en la que la citopenia no coincide con la línea displásica.
- Se especifica que para diagnosticar un SMD inclasificable, definido por la presencia de 1% de blastos en SP y <5% de blastos en MO, el blasto en periferia debe haber sido observado en al menos 2 controles.
- Se elimina el recuento de blastos de la celularidad no eritroide en todas las circunstancias. Con esto, los casos previamente diagnosticados de LAM mieloeritroide o eritroleucemia ( $\geq 50\%$  eritroblastos,  $< 20\%$  blastos de la celularidad total,  $\geq 20\%$  blastos de la celularidad no eritroide) quedan clasificados como SMD, mayoritariamente SMD con exceso de blastos. Para ello se argumenta que las eritroleucemias presentan características clínico-biológicas y curso clínico más parecido a los SMD que a las LAM.<sup>63-67</sup>
- Se especifica que aunque en IPSS-R se han descrito nuevos umbrales en las citopenias con valor pronóstico, la OMS sigue utilizando los niveles del IPSS (hemoglobina  $< 10\text{g/dL}$ , neutrófilos  $< 1.8 \times 10^9/\text{L}$  y plaquetas  $< 100 \times 10^9/\text{L}$ ). El diagnóstico de SMD puede realizarse con cifras superiores a estas sin existen evidentes signos de displasia, pero siempre tiene que existir al menos una citopenia.
- Debido a que se ha observado que la presencia de una alteración única añadida a la deleción 5q no empeora el pronóstico de la ésta última,<sup>68</sup> se incluyen en la categoría de “SMD con deleción 5q aislada” aquellos pacientes que presentan deleción 5q y otra alteración citogenética, siempre que no se trate de monosomía 7 o deleción 7q.
- Los pacientes con  $\geq 15\%$  de sideroblastos en anillo, sin exceso de blastos ni del(5q) se consideran “SMD con sideroblastos en anillo”, y se establecen dos subtipos, con displasia unilínea o con displasia multilínea. En aquellos casos en

los que la mutación de *SF3B1* está presente, encontrar  $\geq 5\%$  de sideroblastos en anillo es suficiente para hacer el diagnóstico.

**Tabla 5.** Revisión 2016 de la clasificación OMS.<sup>7</sup>

	Líneas displásicas	Citopenias	% SA	Blastos SP	Blastos MO	CG
<b>SMD con DU</b>	1	1 ó 2	<15 o <5*	<1	<5	Cualquiera <sup>§</sup>
<b>SMD con DM</b>	>1	1-3	<15 o <5*	<1	<5	Cualquiera <sup>§</sup>
<b>SMD con SA:</b>						
- DU	1	1 ó 2	$\geq 15$ o $\geq 5^*$	<1	<5	Cualquiera <sup>§</sup>
- DM	>1	1-3	$\geq 15$ o $\geq 5^*$	<1	<5	Cualquiera <sup>§</sup>
<b>SMD con del(5q) aislada</b>	1-3	1 ó 2	Indiferente	<1	<5	del(5q) ó del(5q)+1 (salvo -7 ó del(7q))
<b>SMD con EB</b>						
- SMD-EB1	0-3	1-3	Indiferente	2-4	5-9	Cualquiera <sup>§</sup>
- SMD-EB2	0-3	1-3	Indiferente	5-19	10-19 ó Auer	Cualquiera <sup>§</sup>
<b>SMD inclasificable</b>						
- 1% blastos SP	1-3	1-3	Indiferente	1	<5	Cualquiera <sup>§</sup>
- Pancitopenia + DU	1	3	Indiferente	<1	No	Cualquiera <sup>§</sup>
- Alt CG sin displasia	0	1-3	<15 <sup>#</sup>	<1	Auer	CG de SMD

\*Si está presente la mutación de *SF3B1*. <sup>§</sup>No criterios SMD del(5q) aislada. <sup>#</sup>Si  $\geq 15\%$  de SA, se considera displasia eritroide significativa → SMD con SA y displasia unilínea.

**Abreviaturas.** DU: displasia unilínea; DM: displasia multilínea; SA: sideroblastos en anillo; EB: exceso de blastos; SP: sangre periférica; CG; citogenética; MO: médula ósea.

En esta revisión de la clasificación OMS ha sido referenciado el primer trabajo de la presente tesis.

### 2.3 Valor diagnóstico de la citología de sangre periférica y médula ósea

Pese a constituir la base del diagnóstico de los SMD, los rasgos morfológicos de displasia no son específicos, por lo que no constituyen una evidencia inequívoca de la presencia de un trastorno cloral. Ante la sospecha de un SMD resulta imprescindible descartar otras causas de displasia.

Un requisito indispensable para llevar a cabo una correcta evaluación citológica es disponer de un material en óptimas condiciones técnicas. Se recomienda valorar extensiones de sangre periférica y de médula ósea obtenida mediante punción aspirativa teñidas con una tinción panóptica, a ser posible sin anticoagulante (o que haya pasado menos de 2 horas en EDTA). En ambas muestras se llevará a cabo un

recuento porcentual de blastos. La valoración cuantitativa de los signos de displasia se llevará a cabo en las extensiones de médula ósea. Además, es necesario valorar una extensión de médula ósea teñida con Perls para evaluar los depósitos de hierro del sistema mononuclear-fagocítico y realizar un recuento porcentual de sideroblastos.<sup>1</sup> Al igual que ocurre con otras técnicas especializadas, la evaluación citomorfológica requiere profesionales experimentados.<sup>69</sup>

Para realizar el diagnóstico de SMD según la clasificación OMS 2008 se requiere la presencia de citopenias, displasia en una o varias de las 3 líneas mieloides (eritroide, megacariocítica y granulocítica) y menos de 20% de blastos. Se considera que una línea presenta displasia significativa cuando el 10% o más de sus elementos en médula ósea presentan dismorfias. Para la evaluación de los rasgos de displasia se recomienda la valoración de 30 megacariocitos, 200 neutrófilos y sus precursores, y 200 precursores de serie eritroide. Para establecer el porcentaje de blastos se recomienda realizar un recuento diferencial en 200 leucocitos en sangre periférica y en 500 células en médula ósea.<sup>1</sup>

En la Tabla 6 se enumeran los rasgos de displasia descritos en la clasificación OMS 2008.<sup>1</sup>

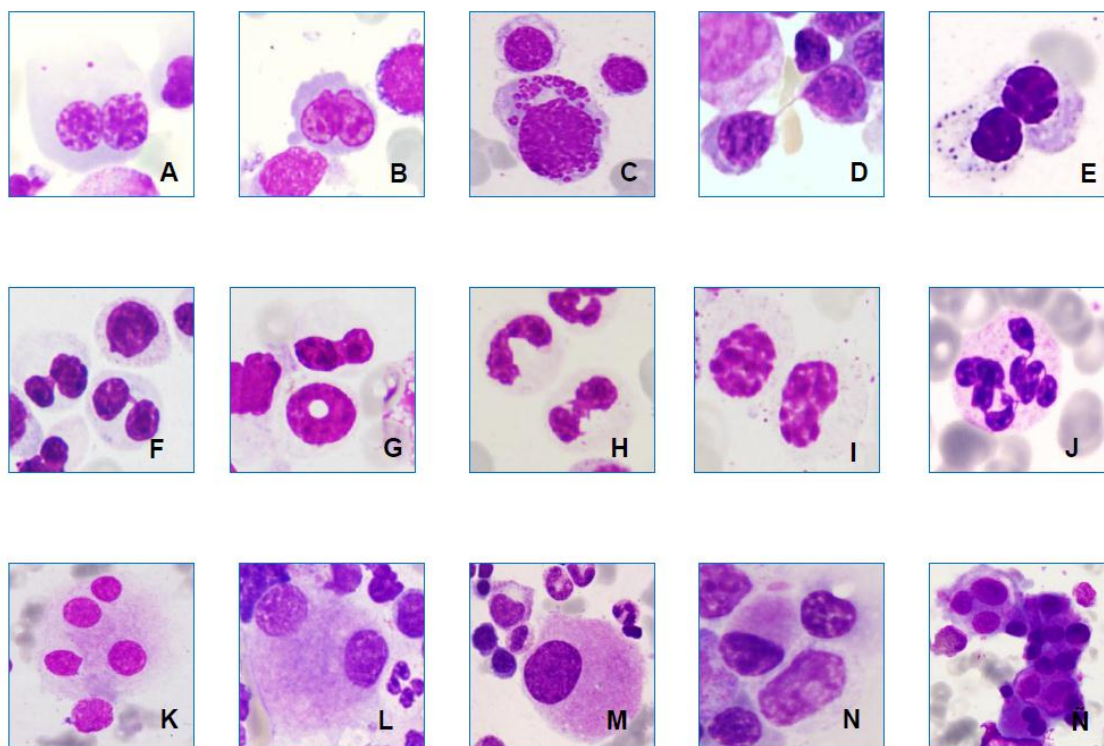
**Tabla 6.** Rasgos de displasia descritos en la clasificación OMS 2008 y en publicaciones del IWGM-MDS.<sup>1,44,70-72</sup>

<b>Diseritropoyesis</b>	<b>Disgranulopoyesis</b>	<b>Dismegacariopoyesis</b>
Puentes internucleares	Microcitosis o megaloblastosis	Micromegacariocitos*
Irregularidades del contorno nuclear	Hipolobulación nuclear (pseudo <i>Pelger-Huët</i> )	Megacariocitos de núcleo hipo o monolobulado
Cariorrexis	Hipersegmentación irregular	Multinucleación (binucleados o con núcleos sueltos)
Multinuclearidad	Hipogranulación o desgranulación	Dilataciones citoplasmáticas <sup>#</sup>
Hiperlobulación nuclear	Granulación pseudo Chediak-Higashi	
Cambios megaloblásticos		
Sideroblastos en anillo	Bastones de Auer	
Vacuolización	Macropolicitos <sup>#</sup>	
PAS positividad		

\* Definición: megacariocito del tamaño aproximado de un promielocito o más pequeño, con núcleo no lobulado o bilobulado. <sup>#</sup> Dismorfias no incluidas en la clasificación OMS pero descritas en publicaciones del IWGM-MDS.



En la Figura 4 se recogen ejemplos de elementos con rasgos displásicos en la serie eritroide, granulocítica y megacariocítica.



**Figura 5.** Elementos de serie eritroide, granulocítica y megacariocítica con rasgos displásicos. A: eritroblasto binucleado; B eritroblasto con irregularidad del contorno nuclear y degeneración megaloblástica de la cromatina; C: cariorrexis; D: eritroblastos con puente internuclear; E: elemento con punteado basófilo y distribución anómala de la hemoglobina; F: neutrófilos hipogranulados e hiposegmentados tipo Pelger-Huët; G: neutrófilo con “núcleo en donut”; H: neutrófilos desgranulados, con apéndices y bolsillos nucleares; I: neutrófilos con hipercondensación cromatínica tipo *clumping*; J: neutrófilo hipersegmentado (pleocariocito); K: megacariocitos con núcleos sueltos; L: megacariocito binucleado; M: megacariocito de núcleo monolobulado; N: micromegacariocito; Ñ: agrupación de micromegacariocitos.

Debido a que algunos de estos parámetros morfológicos son poco objetivos y poco específicos, puede existir dificultad para realizar el diagnóstico. En un intento de mejorar la identificación de los signos de displasia el IWGM-MDS (del inglés *International Working Group on Morphology Of Myelodysplastic Syndromes*) ha publicado varios trabajos en los que se revisa: 1) definición de mieloblastos y sideroblastos en anillo;<sup>44</sup> 2) evaluación morfológica de los monocitos y sus

precursores;<sup>70</sup> 3) definición de disgranulopoyesis;<sup>71</sup> 4) evaluación de la dismegacariopoyesis.<sup>72</sup>

Otro de los problemas a la hora de aplicar la clasificación OMS es que el criterio del 10% para considerar una línea como displásica está muy próximo a los valores de displasia observados en personas sanas y considerados fisiológicos. Algunos autores sugieren elevar este umbral o establecer umbrales diferentes para cada una de las líneas mieloides.<sup>73</sup>

En 2014, se publicó un estudio en el que se definió un *score* morfológico con una alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de SMD derivado del análisis retrospectivo de 1076 pacientes con citopenias.<sup>74</sup>

## 2.4 Valor diagnóstico de la citogenética

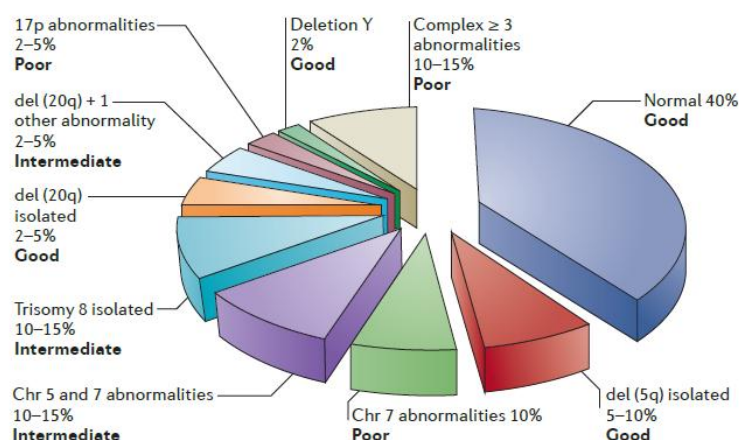
### 2.4.1 Alteraciones citogenéticas en los SMD

Alrededor de un 30-50% de los pacientes con SMD *de novo* presentan un cariotipo alterado.<sup>75-78</sup> Este porcentaje se incrementa en los SMD secundarios a tratamiento (*therapy related myeloid neoplasms*, en la literatura), en los que se observan alteraciones citogenéticas hasta en un 80% de los casos.<sup>79,80</sup>

Los SMD con cariotipo alterado generalmente presentan pérdidas (deleciones o monosomías) y/o ganancias (trisomías) de material genético.<sup>75-78</sup> Son muy poco frecuentes las translocaciones equilibradas.<sup>76,77,81</sup>

Las alteraciones citogenéticas más frecuentes son: deleción de una parte del brazo largo del cromosoma 5 (del(5q) o 5q-, ≈30%), monosomía total o parcial del cromosoma 7 (-7/del(7q) o 7q-, ≈20%), trisomía del cromosoma 8 (≈15%), pérdida de una parte del brazo largo del cromosoma 20 (del(20q) o 20q-, ≈10%) y pérdida del cromosoma sexual masculino (-Y, ≈6%). En aproximadamente un 15% de los pacientes se detecta un cariotipo complejo, es decir 3 ó más alteraciones.<sup>76, 77</sup>

En la Figura 5 se representa la incidencia de las alteraciones cromosómicas más frecuentes en los SMD.<sup>16</sup>



**Figura 5.** Incidencia de las alteraciones cromosómicas más frecuentes en los SMD. (Adaptado de Raza and Galili, 2012).<sup>16</sup>

En la Tabla 7 se enumeran las alteraciones cromosómicas recurrentes asociadas a SMD según la clasificación OMS. Estas alteraciones son diagnósticas de SMD en caso de citopenias aunque no existan datos morfológicos concluyentes de SMD, salvo en los casos con trisomía 8, del(20q) y  $-Y$ .<sup>1</sup> En la clasificación OMS 2016, la delección 9q desaparece de este listado por su frecuente asociación con la presencia de la mutación de *NPM1*, y por lo tanto, con un curso clínico más característico de LMA.<sup>7</sup>

**Tabla 7.** Alteraciones citogenéticas asociadas a SMD según la clasificación OMS 2008.

Alteraciones balanceadas		Alteraciones no balanceadas	
Alteración	Frecuencia	Alteración	Frecuencia
+8	10%*	t(11;16)(q23;p13.3)	3% <sup>#</sup>
-7 ó del(7q)	10%	t(3;21)(q26.2;q22.1)	2% <sup>#</sup>
-5 ó del(5q)	10%	t(1;3)(p36.3;q21.2)	1%
del(20q)	5-8%*	t(2;11)(p21;q23)	1%
-Y	5%*	inv(3)(q21;q26.2)	1%
i(17)(q10) o t(17p)	3-5%	t(6;9)(p23;q34)	1%
-13 ó del(13q)	3%		
del(11q)	3%		
del(12p) ó t(12p)	3%		
del(9q)	1-2%		
idic(X)(q13)	1-2%		

\*La presencia de estas alteraciones citogenéticas de forma aislada, sin criterios morfológicos concluyentes de mielodisplasia, no es suficiente para establecer el diagnóstico de SMD.

<sup>#</sup>Porcentajes referidos a SMD secundario a tratamiento previo.

En la Tabla 8 se enumeran las alteraciones citogenéticas más frecuentes en cada uno de los subgrupos morfológicos de la clasificación OMS 2008.<sup>1,82</sup>

**Tabla 8.** Alteraciones citogenéticas más frecuentes en los distintos subgrupos morfológicos de la clasificación OMS 2008.

Subtipo OMS	% aproximado de cariotipo alterado	Alteraciones cromosómicas (ordenadas por frecuencia)
CRDU	25-30%	-7/de(7q), del(5q), cariotipo complejo
ARSA	10%	+8
CRDM	50%	7/de(7q), cariotipo complejo. del(5q),+8
AREB-1	50%	del(5q), cariotipo complejo, 7/de(7q), +8, del(20q)
AREB-2	55%	Cariotipo complejo, +8, del(5q), -7/del(7q), del(20q)
SMD con del(5q)	100%	del(5q)

**Abreviaturas.** CRDU; citopenia refractaria con displasia unilínea; ARSA: anemia refractaria con sideroblastos en anillo; CRDM: citopenia refractaria con displasia multilinea; AREB: anemia refractaria con exceso de blastos; SP: sangre periférica; MO: médula ósea.

Algunas de estas alteraciones citogenéticas se han relacionado con alteraciones morfológicas específicas: del(5q) y megacariocitos con núcleo monolobulado o hipolobulado, del(17p) con neutrófilos hiposegmentados tipo *Pelger-Huet* y neutrófilos pequeños y vacuolados, y por último, alteraciones en el cromosoma 3 (inv(3)(q21;q26.2) o t(3;3) (q21;q26.2) con aumento de megacariocitos de tamaño pequeño que forman agrupaciones.<sup>1</sup>

## 2.4.2 Técnicas de análisis genético

### 2.4.2.1 Citogenética convencional

La técnica de citogenética convencional permite obtener una información global del genoma mediante el estudio del tamaño y la forma de los cromosomas. Un cromosoma es la estructura de máxima compactación de la cromatina, formada por ADN y proteínas, que se forma durante la fase de división celular o mitosis. Por este motivo, para el estudio de citogenética es necesario realizar un cultivo celular para obtener cromosomas en metafase.

En los SMD el tejido de elección para el estudio de anomalías cromosómicas es la MO obtenida mediante punción-aspiración. En aquellos casos en los que no pueda obtenerse una muestra de médula ósea, el empleo de muestras de sangre periférica (especialmente, si la proporción de blastos se sitúa entre el 10-20%) puede ser

informativo. Sin embargo, la ausencia de anomalías cromosómicas en la muestra de sangre no descarta la presencia de alteraciones en las células de la MO.

La muestra de MO debe obtenerse con las máximas condiciones de esterilidad y ha de conservarse en tubos con heparina sódica como anticoagulante (aproximadamente 20 unidades/mL total de muestra). Según la experiencia de cada centro se puede además añadir medio de cultivo suplementado o no con antibióticos.

Cuando deba descartarse que la alteración cromosómica hallada en MO pueda tener un carácter constitucional, como en los casos con presencia de trisomía 8, se requerirá asimismo un estudio de sangre periférica estimulada con fitohemaglutinina o una biopsia de piel.<sup>83</sup>

Para el estudio de los SMD se recomienda un cultivo celular corto (generalmente 24-48 horas). A ser posible, la concentración óptima debe ser de 2 millones de células/mL de cultivo. Una vez finalizado el tiempo de cultivo se procede a la detención en metafase, choque osmótico, fijación y bandeo (según los estándares de cada laboratorio).

Se han descrito varias técnicas de tinción que permiten obtener un perfil de bandas específicas para identificar cada cromosoma. La más utilizada es la técnica de bandas G, que usa el Giemsa como colorante. Éste tiene una afinidad diferente por las diferentes regiones cromosómicas en función de su contenido en: Adenina - Timina (bandas oscuras, pobres en genes) o Citosina - Guanina (bandas claras, ricas en genes). El análisis del cariotipo permite la identificación de 22 pares de cromosomas autosómicos y una pareja de cromosomas sexuales (X e Y), que van a conformar el cariotipo. Se deberán evaluar al menos 20 metafases, aunque el análisis de una cifra inferior de metafases se considera informativo si se detecta una anomalía de carácter clonal.<sup>36</sup> La nomenclatura utilizada para describir el cariotipo, ya sea normal o patológico, es un sistema estandarizado e internacionalmente consensuado que se denomina ISCN (*International System for Human Cytogenetics Nomenclature*). Esta nomenclatura se revisa y actualiza periódicamente.<sup>84</sup> Se considera que una alteración es clonal si aparece en dos células en casos de ganancias o alteraciones estructurales, o en tres células en caso de pérdidas.

En algunos pacientes con SMD, entre el 6 y el 20% según las series,<sup>85,86</sup> el estudio citogenético convencional resulta no valorable por la obtención de un número insuficiente de metafases analizables. Las causas por las que el cultivo citogenético

falla pueden deberse tanto a características intrínsecas de la enfermedad como a problemas técnicos (muestra insuficiente, cultivo en centro de referencia muchas horas después de la extracción de la muestra, etc). En estos pacientes resulta de utilidad la aplicación de otras técnicas genéticas.

#### **2.4.2.2 Hibridación *In Situ* Fluorescente (FISH)**

La técnica de Hibridación in situ fluorescente (FISH, del inglés *fluorescence in situ hybridization*) permite detectar y localizar secuencias específicas de ADN que no pueden ser detectadas por técnicas de bandeo cromosómico.<sup>87</sup> Puede realizarse sobre preparaciones cromosómicas, extensiones celulares y cortes de tejido. Basada en la propiedad del ADN para desnaturalizarse y renaturalizarse, consiste en la hibridación de una secuencia conocida de ADN (sonda) sobre su secuencia complementaria en la muestra problema, tanto en metafase como en interfase. Las sondas deben estar marcadas previamente con moléculas fluorescentes, de forma directa o indirecta. El análisis de esta técnica se realiza en el microscopio de fluorescencia. Esta técnica permite la detección de alteraciones numéricas y estructurales de los cromosomas, así como definir cromosomas marcadores.

La técnica de FISH se implementó en los años 80 y supuso un gran avance en el estudio citogenético constitucional y en el estudio de alteraciones citogenéticas adquiridas, tanto en tumores sólidos como en neoplasias hematológicas.

En el caso de los SMD, las Guías Españolas de diagnóstico y tratamiento de los SMD recomiendan la aplicación de FISH en pacientes en los que no se disponga de cariotipo o en pacientes con cariotipo normal pero en los que no se han podido analizar un mínimo de 20 metafases. En esos casos las sondas a estudiar son las de 5q y 7q, ya que tienen implicaciones pronósticas y terapéuticas. Otras sondas que podrían resultar de utilidad son la centromérica del cromosoma 8, 17p13, 20q y cromosoma Y. En los SMD, el estudio mediante FISH no debe sustituir al estudio citogenético convencional.<sup>36</sup>

#### **2.4.2.3 Microarrays genómicos**

Un *microarray* es una colección de bioelementos ordenados ortogonalmente en filas y columnas sobre un soporte sólido. Esta matriz permite la realización de múltiples determinaciones en un mismo procedimiento. Según el bioelemento presente en el

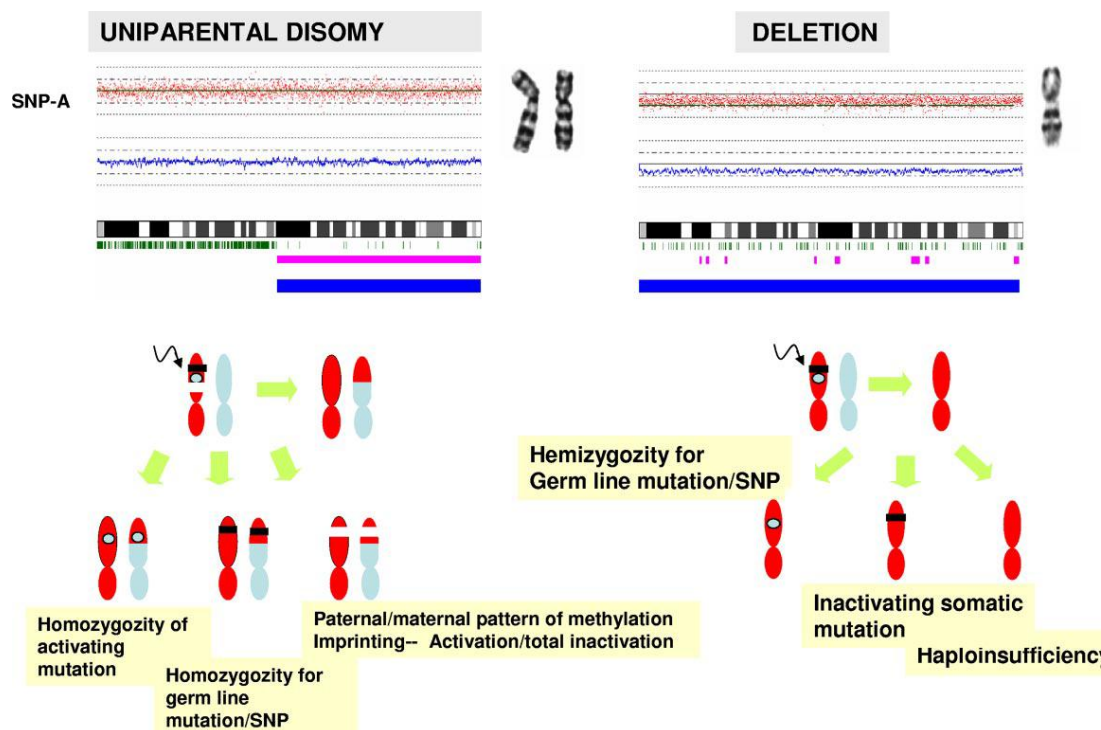
soporte se pueden distinguir diferentes tipos de *microarray*, entre los que destacan los genómicos (ADN), de expresión (ADN copia), de tejido (cilindros de tejido parafinado), de células o de proteínas.

Los *microarrays* genómicos permiten la detección de alteraciones en el número de copias del ADN (CNA). Se distinguen dos tipos de *microarrays* genómicos: *microarrays* de hibridación genómica comparada (CGH, del inglés *Comparative Genomic Hybridization*) y *microarrays* de polimorfismos de nucleótido único (SNP, del inglés *single nucleotide polymorphisms*).

Los *microarrays* de CGH surgieron en los años 90 como una evolución de la técnica de hibridación genómica comparada.<sup>88</sup> La técnica de hibridación genómica comparada se basa en la hibridación competitiva de ADN tumoral y ADN normal, cada uno de ellos marcado con fluorocromos diferentes. Esta hibridación se lleva a cabo en una extensión de metafases normales sobre un portaobjetos y consigue una resolución de sólo 5-10 Mb. En los *microarrays* de CGH la hibridación se lleva a cabo sobre un soporte sólido con miles o millones de sondas que cubren todo el genoma o una región concreta del mismo, permitiendo un estudio completo a una mayor resolución: 200-300 Kb para *microarrays* de BAC y 50-80 pb para *microarrays* de oligonucleótidos.<sup>89,90</sup>

Los *microarrays* de SNP fueron descritos en el año 2000, y contienen variantes de SNP además de oligonucleótidos.<sup>91</sup> A diferencia de los *microarrays* de CGH, la hibridación es no competitiva, es decir, la muestra tumoral se hibrida sobre un *microarray* y los resultados obtenidos se comparan con una muestra control del mismo paciente hibridada en un *microarray* independiente o con bases de datos de población normal. La principal ventaja de este tipo de *microarrays* es que además de permitir la detección de ganancias o pérdidas de ADN permite conocer el origen parental de cada copia cromosómica. De esta manera se pueden identificar alteraciones alélicas que no impliquen un cambio en el número de copias como son las disomías uniparentales (UPD, del inglés *uniparental disomy*), donde las dos copias de una determinada región cromosómica pertenecen al mismo progenitor (pérdida de una parte de un cromosoma y reemplazamiento del mismo por una copia exacta del cromosoma presente). La consecuencia patogénica de la UPD es la pérdida de heterocigosidad de dicha región (LOH, del inglés *loss of heterozygosity*). Si en esa región existe una mutación se encontrará en estado homocigoto lo cual puede favorecer el desarrollo

tumoral.<sup>92</sup> En la Figura 6 se esquematizan las consecuencias patológicas de la pérdida de heterocigosidad.<sup>93</sup>



**Figura 6.** Pérdidas de heterocigosidad por deleción o por disomía uniparental, y sus consecuencias patológicas. El esquema muestra dos tipos de pérdida de heterocigosidad (LOH) con el cromosoma 7 como ejemplo, una monosomía a la derecha y una disomía uniparental (UPD) a la izquierda. En la parte inferior, se muestran los posibles mecanismos patológicos de las LOH. La UPD puede resultar en la duplicación de una mutación somática activadora, conferir homocigosidad de un polimorfismo en la línea germinal que en condiciones normales está en forma heterocigótica, o bien, duplicación del patrón de metilación materna o paterna con activación o inactivación total del alelo duplicado. En la deleción, se puede producir hemicigosis de un polimorfismo de línea germinal, que el alelo restante albergue una mutación somática inactivadora o pérdida de función, haploinsufficiencia (Adaptado de Maciejewski and Mufti, 2008).<sup>94</sup>

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

- Genome-Wide Human SNP Array 6.0®: contiene 906.600 sondas para SNP y 946.000 para la detección del número de copia.
- Cytoscan HD®: contiene 750.000 sondas para SNP y 1.950.000 para la detección del número de copia.

En la Tabla 9 se muestra una comparación de las ventajas y desventajas de las diferentes técnicas de detección de alteraciones citogenéticas usadas en el estudio de



los síndromes mielodisplásicos.<sup>95</sup>

**Tabla 9.** Comparación de las técnicas de análisis citogenético (Adaptado de *Maciejewski et al, 2009*).<sup>95</sup>

Técnica	Citogenética convencional	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente	Microarrays genómicos de CGH	Microarrays genómicos de SNPs
<i>Resolución</i>	Baja	Baja	Alta	Alta
<i>Sensibilidad</i>	10%	Alta	20-30%	20-30%
<i>Necesidad obtención de células en división</i>	Sí	No	No	No
<i>Distinción entre clones individuales</i>	Sí	No	No	No
<i>Visión global del genoma</i>	Sí	No	Si	Si
<i>Detección de alteraciones equilibradas</i>	Sí	Si	No	No
<i>Detección de LOH</i>	No	No	No	Si

**Abreviaturas:** CGH: hibridación genómica comparada, (del inglés *Comparative Genomic Hybridization*; SNP: polimorfismo de nucleótido único, (del inglés *single nucleotide polymorphisms*); LOH: pérdida de heterocigosidad, (del inglés *loss of heterozygosity*).

#### 2.4.2.4 Técnicas de secuenciación

En la última década las técnicas de secuenciación del ADN han supuesto un gran avance en el conocimiento de la patogenia los SMD ya que, cómo se ha comentado previamente, se asume que éstos surgen de la adquisición secuencial de mutaciones somáticas. Con la progresiva optimización de estas técnicas, tanto desde el punto de vista económico como en el tiempo de procesamiento y análisis, el estudio de perfiles de mutaciones se va introduciendo en el ámbito clínico, y cada vez son más los centros que incluyen técnicas de biología molecular como parte de los estudios a realizar en pacientes con SMD.<sup>36</sup>

La aplicación de las técnicas de secuenciación masiva ha permitido la identificación de una serie de genes recurrentemente mutados en neoplasias mieloides<sup>31,96-98</sup>. Posteriormente se han aplicado paneles dirigidos a un número concreto de genes en los que se ha encontrado que el 90% de los pacientes con SMD presentan al menos una mutación.<sup>97,99,100</sup> Aunque el número de genes implicados en la patogenia de los SMD es amplio, se pueden agrupar en categorías en función del proceso celular en el que intervienen: factores de la maquinaria de *splicing* o de ensamblaje del ARN,

reguladores epigenéticos, cohesiones, factores de transcripción, reguladores del daño al ADN y moléculas implicadas en la transducción de señales.

### **Factores de *splicing***

Se conoce como *splicing* celular al proceso de maduración del ARN mediante el cual se eliminan los intrones y se ligan los exones. Hasta el 60% de los SMD presenta mutaciones en alguno de los componentes de la maquinaria de *splicing*, los más frecuentes *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2* y *PRPF8*.<sup>29-31</sup> Generalmente son mutaciones mutuamente excluyentes que surgen de la sustitución de un único aminoácido en una región *hotspot*. La mutación del gen *SF3B1* es la primera y más frecuente de las mutaciones descritas en estos factores, y está presente en aproximadamente el 80% de los SMD con sideroblastos en anillo.<sup>29-31</sup>

### **Reguladores epigenéticos (metilación del ADN y modificación de histonas)**

Se han descrito mutaciones en genes encargados de la metilación del ADN, como son *DNMT3A*, que codifica para una ADN metiltransferasa,<sup>101</sup> y *TET2*, que codifica para un enzima que hidroxila citosinas metiladas para iniciar el proceso de demetilación del ADN.<sup>98</sup> La actividad de *TET2* también puede verse afectada por mutaciones en *IDH1* e *IDH2*.<sup>102</sup> Asimismo se han detectado mutaciones que implican pérdida de función en genes de los complejos de modificación de histonas, como son *ASXL1* y *EZH2*.<sup>100</sup>

### **Cohesinas**

Las cohesinas son un complejo de proteínas (SMC1A, SMC3, RAD21, STAG1 y STAG2) involucrado en la separación de las cromátides en la mitosis celular. En los SMD se han descrito mutaciones mutuamente excluyentes en los genes que codifican para estas proteínas.<sup>103-104</sup>

### **Factores de transcripción**

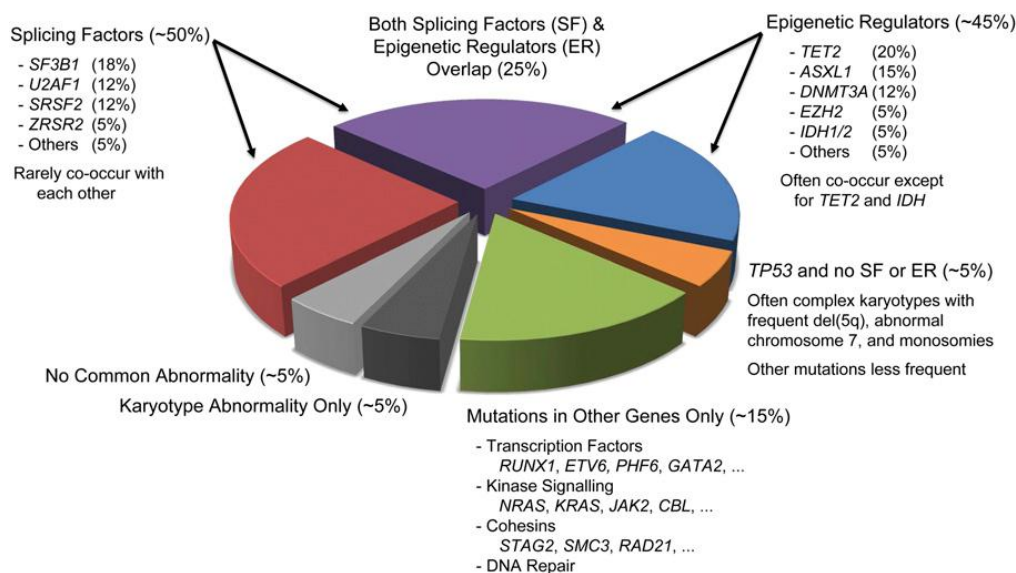
La diferenciación de las células hematopoyéticas implica la activación programas de expresión génica específicos de línea mediante factores de transcripción como *GATA2*, *RUNX1* y *CUX1*. En los SMD se han descrito mutaciones somáticas en estos genes y, en

familias con síndromes de insuficiencia medular, mutaciones de los mismos en línea germinal.<sup>97-100</sup>

### TP53

El gen supresor de tumores *TP53* presenta un papel fundamental en la coordinación de la respuesta frente al estrés celular y al daño del ADN ya que tiene funciones en el control del ciclo celular y la apoptosis. Las mutaciones en *TP53* son frecuentes en los SMD secundarios a tratamiento quimioterápico, observada en hasta un 40% de éstos según las series.<sup>105</sup> Estas mutaciones generalmente se asocian a deleciones de 17p, cariotipo complejo, trombocitopenia, y se han asociado a mal pronóstico.<sup>99</sup>

En la Figura 7 se resume la distribución de las anomalías recurrentes y las alteraciones citogenéticas en los SMD.<sup>106</sup>



**Figura 7.** Distribución de las anomalías recurrentes y las alteraciones citogenéticas en los SMD. (Adaptado de Béjar, 2014).<sup>106</sup>

Pese a estos avances en el conocimiento molecular de los SMD, la incorporación de esta información a los criterios diagnósticos de SMD es aun limitada. Una de las causas de esto es que las mutaciones recurrentes asociadas a SMD no son específicas de esta enfermedad y se han observado en otras neoplasias que plantean el diagnóstico diferencial con los SMD, como son las LAM, las NMP y las NMP/SMD. Además, algunas de estas mutaciones se han observado en personas sin hemopatía conocida.<sup>19,107</sup> En

estudios que intentan correlacionar genotipo y fenotipo se ha observado que la presencia de mutaciones en genes implicados en la metilación del ADN, las cohesinas, la vía de *RAS* o en componentes de la maquinaria de *splicing* distintos de *SF3B1*, se asocia a displasia multilínea.<sup>108</sup> La clasificación OMS 2016 sólo incluye por el momento la mutación del gen *SF3B1* para definir un grupo de pacientes con sideroblastos en anillo y buen pronóstico.<sup>7</sup>

## 2.5 Valor diagnóstico de la citometría de flujo.

Los pacientes con SMD presentan alteraciones fenotípicas en los distintos compartimentos celulares tanto en sangre periférica como en médula ósea. Aunque ninguna de estas aberraciones fenotípicas es patognomónica de SMD, su estudio mediante citometría de flujo constituye una herramienta de apoyo en el diagnóstico de esta enfermedad<sup>101,109</sup>, y ha sido incluida como técnica complementaria en las recientes clasificaciones y guías clínicas de diagnóstico y tratamiento de los SMD.<sup>1,7,36,39,61,62</sup>

En los últimos años diversos grupos han trabajado en la estandarización metodológica de la técnica: obtención y conservación de la muestra, protocolos de marcaje celular, condiciones de los equipos, clones de anticuerpos y fluorocromos conjugados y su organización en paneles, análisis e interpretación de los datos).<sup>110-113</sup>

Las alteraciones fenotípicas más frecuentemente observadas en los SMD son: 1) alteración en los parámetros físicos (*side scatter*, *SSC* y *forward scatter*, *FSC*) de algunas poblaciones celulares (p.ej: pérdida de complejidad de la serie granulocítica), 2) bloqueos madurativos que se pueden detectar como un incremento de células inmaduras (p.ej: incremento de celularidad CD34+); 3) asincronismos madurativos, es decir, expresión temprana de antígenos propios de estadios más avanzados de maduración, o a la inversa; 4) alteración de los patrones madurativos (p.ej: CD11b/CD13 y o CD11b/CD16 en neutrófilos); 5) alteración en la expresión (infra o sobreexpresión) de determinados antígenos (p.ej: pérdida de expresión de HLA-DR en línea monocítica); y 6) expresión aberrante de antígenos asociados habitualmente a otra línea celular (p.ej: expresión del marcador linfoide CD7 en mieloblastos).<sup>110,113,114</sup>

Se han desarrollado sistemas de puntuación o *scores* en los que se combinan parámetros fenotípicos y que muestran una alta sensibilidad, aunque una menor

especificidad, para la detección del probable origen clonal de citopenias en pacientes que no presentan marcadores morfológicos o citogenéticos concluyentes.<sup>114,115</sup> Varios estudios han avalado la utilidad de la citometría de flujo como herramienta para diferenciar SMD de citopenias de significado incierto, así como para distinguir entre casos con displasia uni- o multilínea.<sup>114,116</sup>

La evaluación cuantitativa de los blastos de médula ósea mediante citometría de flujo presenta ciertas limitaciones que dificultan su exactitud y reproducibilidad (problemas relacionados con el procesamiento de la muestra, obtención de muestras hemodiluidas, en ocasiones los blastos son difíciles de separar de otras poblaciones celulares mediante SSC/FSC, no siempre expresan el antígeno CD34, etc.).<sup>117</sup> Por esta razón, en las guías actuales de diagnóstico y clasificación de los SMD se hace hincapié en que la cifra de blastos por citometría de flujo no debe sustituir al recuento mediante citología óptica.<sup>1,7,36,39,61,62</sup>

## **2.6 Valor diagnóstico del estudio histológico e inmunohistoquímico de la médula ósea**

La biopsia de médula ósea (BMO) es una técnica complementaria al aspirado medular en el diagnóstico de los SMD. Su realización es imprescindible cuando se sospecha la presencia de mielofibrosis o un SMD hipoplásico (aspirado seco o con grumo medular con escasa celularidad).<sup>1,36</sup> La BMO permite valorar la celularidad de la MO, habitualmente elevada en los SMD. Es una técnica con muy escaso rendimiento para la evaluación de los signos de displasia, probablemente su utilidad en este aspecto está limitada a la serie megacariocítica.<sup>1</sup> En la BMO de los SMD con exceso de blastos se ha descrito además de un incremento de los mismos en forma de agregados (3-5) o clusters (>5), una localización anómala a nivel centromedular, alejados de los espacios vasculares y las trabéculas, que son su localización normal. Son los llamados ALIP, del inglés *atypical localization of immature precursors*.<sup>118,119</sup> La tinción inmunohistoquímica con anti-CD34 puede ser útil para realizar una estimación del número de blastos, sin embargo, este recuento no debe sustituir nunca al realizado mediante citología.<sup>1,36</sup> En las citopenias de significado incierto (ICUS) está indicada la realización de BMO como parte del diagnóstico diferencial.<sup>40</sup>

### 3. EVALUACIÓN PRONÓSTICA DE LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS

#### 3.1 Factores pronósticos

Bajo el nombre de SMD se incluyen entidades con una evolución clínica muy variable, desde procesos indolentes con supervivencias esperadas de más de 10 años a cuadros más agresivos con una esperanza de vida de pocos meses. Por lo tanto es vital una adecuada evaluación pronóstica de los pacientes con SMD con objeto de proporcionarles tratamientos adaptados a su riesgo.

En los últimos años se han llevado a cabo múltiples estudios que han permitido la identificación de factores pronósticos. A continuación se enumeran una serie de factores asociados a mal pronóstico en los SMD en el momento del diagnóstico:

- edad avanzada, relacionada con la SG pero no con un mayor riesgo de transformación a LMA,<sup>120,121</sup>
- sexo femenino,<sup>120,121</sup>
- presencia de comorbilidades, también con un impacto en la SG pero no en el riesgo de LMA,<sup>122-125</sup>
- exposición previa a quimioterapia y/o radioterapia,<sup>126-128</sup>
- niveles séricos elevados de LDH<sup>129</sup>, Beta-2-microglobulina<sup>130</sup>, y eritropoyetina,<sup>131</sup>
- niveles séricos elevados de ferritina (>1000 ng/ML), lo cual parece tener un impacto tanto en SG como en riesgo de evolución a LMA,<sup>132</sup>
- número e intensidad de las citopenias,<sup>120,121,133-137</sup>
- incremento de blastos en SP y MO,<sup>1,7,39,43</sup>
- presencia de bastones de Auer,<sup>1,7,39,43</sup>
- displasia multilínea,<sup>1,39,48</sup>
- presencia de neutrófilos hiposegmentados tipo *Pelger* y/o Micromegacariocitos,<sup>138</sup>
- fibrosis medular grado moderado/grave. Está aproximadamente en el 15% de los SMD, sobre todo en subtipos con exceso de blastos,<sup>57-59</sup>
- localización atípica de precursores inmaduros (ALIP),<sup>118,119,139</sup>
- cariotipo complejo, alteraciones en cromosoma 7,<sup>76,77,120,140-142</sup>

- mutaciones de *p53*, *RAS*, etc.

### 3.1.1 Valor pronóstico de la citología

Los subtipos morfológicos de la clasificación OMS 2008 tienen un impacto pronóstico en cuanto a supervivencia global y a riesgo de transformación a LMA.<sup>1</sup> Según dicha clasificación los SMD pueden agruparse en 3 grupos de riesgo. El grupo de riesgo bajo incluiría las CRDU y las ARSA. El grupo de riesgo intermedio estaría constituido por las CRDM y los AREB-1. Los pacientes con AREB-2 constituirían el grupo de alto riesgo. Esto fue validado por una cohorte independiente.<sup>143</sup>

La presencia de displasia multilínea (displasia en al menos 2 de las tres series mieloides) en SMD sin exceso de blastos se ha correlacionado con un peor pronóstico en los SMD sin exceso de blastos.<sup>1, 39,48,144</sup>

El hallazgo de neutrófilos hiposegmentados tipo *Pelger* ( $\geq 10\%$ ) y micromegacariocitos ( $\geq 10\%$ ) se ha relacionado con una menor supervivencia. *Matsuda et al* publicaron un estudio en el que la presencia de disgranulopoyesis superior al 10% y/o la dismegacariopoyesis superior al 40% eran factores pronósticos independientes para supervivencia global y supervivencia libre de transformación a leucemia aguda.<sup>138</sup>

La presencia de sideroblastos en anillo asociada a la mutación de *SF3B1* se ha relacionado con un pronóstico favorable.<sup>29-31</sup>

El porcentaje de blastos en sangre periférica y médula ósea tienen un papel fundamental en el diagnóstico y clasificación de los síndromes mielodisplásicos.<sup>1,7,39</sup>

Asimismo, la cifra de blastos en médula ósea constituye un factor pronóstico independiente en esta patología y es una de las variables que forma parte de los índices pronósticos más utilizados.<sup>120,121</sup> La técnica *gold-standard* para establecer el porcentaje de blastos en médula ósea sigue siendo la citología. Aunque en algún estudio se ha observado una buena correlación entre el porcentaje de blastos por morfología y el porcentaje de células CD34+ por citometría de flujo, esta última debe ser únicamente orientativa.<sup>1,7, 117</sup>

### **3.1.2 Valor pronóstico de las alteraciones citogenéticas**

Las alteraciones citogenéticas tienen un valor pronóstico independiente en SMD demostrado en numerosos trabajos.<sup>76,77,120,140-142</sup> Establecer el peso pronóstico real de cada una de ellas es difícil por 2 razones fundamentales: 1) algunas son poco frecuentes con lo cual es difícil disponer de un elevado número de pacientes que la presenten para poder establecer su impacto; 2) las alteraciones pueden aparecer de forma aislada o asociadas, incluso en cariotipos complejos. En la Tabla 10 se recogen las alteraciones citogenéticas más frecuentemente observadas en SMD mediante la técnica de citogenética convencional y el valor pronóstico que se les ha otorgado en los diferentes estudios.<sup>82,121,145</sup>



**Tabla 10.** Valor pronóstico de las alteraciones citogenéticas más frecuentes (Adaptado de *Haase et al*, 2008).<sup>82</sup>

Autor, año	Número de pacientes	% casos alterados	Categoría pronóstica		
			Bueno	Intermedio	Malo
<i>Knapp et al., 1985</i> <sup>140</sup>	174	38	Normal		Complejo
<i>Nowell et al., 1986-1989</i> <sup>146,147</sup>	144	44	5q-, 20q-	+8	-7/7q-
<i>Billström et al., 1988</i> <sup>148</sup>	169	44	Normal, 5q-	+8	-7/7q-
<i>Pierre et al., 1989</i> <sup>149</sup>	247	43	Normal		Complejo
<i>Morel et al., 1993</i> <sup>141</sup>	408	37	Normal, 5q-, -Y, -7/7q-, 20q-	+8	Complejo
<i>Toyama et al., 1993</i> <sup>142</sup>	401	50	+8	-7/7q-	Complejo
<i>White et al., 1994</i> <sup>150</sup>	198	38	Normal, 5q-	12p-, +21	Complejo, +8, 20q-
<i>Greenberg et al., 1997</i> <sup>120</sup>	816	40	Normal, 5q-, 20q-, -Y	El resto	Complejo, alteraciones del cromosoma 7
<i>Solé et al., 2005</i> <sup>76</sup>	968	51	Normal, 5q-, 20q-, -Y, 11q-, 12p-	t(3q), +8, +9, t11q, 17p-	Complejo, -7/7q-, i(17q)
<i>Haase et al., 2007</i> <sup>77</sup>	2072	51	Normal, +1/+1q, t(1q), 5q-, t(7q), 9q-, 12p-, alteración del 15, t(17q), 20q-, -21, + 21, -X, -Y	t(3q), -7/7q-, +8, 11q-, t(11q23), +19, complejo (=3)	Complejo (>3), t(5q)
<i>Bernasconi et al., 2007</i> <sup>151</sup>	491	60	Normal, 5q-, 20q-, -Y, 11q-, 12p-	-7/7q-, el resto	Complejo, alteraciones de 3q
<i>Pozdayakova et al., 2008</i> <sup>152</sup>	1029	45	Normal, 5q-, 20q-, -Y	+8, el resto	Complejo, -7/7q-
<i>Schanz et al., 2012</i> <sup>145</sup>	2801	45	Normal, 5q-, 20q-, -Y, 12p-, 11q-, doble con 5q-	7q-, +8, i(17q), +19, el resto, otras dobles	Complejo, inv(3)/t(3q)/3q-, -7, doble con -7/7q-
<i>Greenberg et al., 2012</i> <sup>121</sup>	7012	37	<u>Muy bueno:</u> -Y, 11q- <u>Bueno:</u> Normal, 5q-, 12p-, 20q-, doble con 5q-	7q-, +8, +19, i(17q), resto, otras dobles	<u>Malo:</u> -7, inv(3)/t(3q)/3q, doble con -7/7q, complejo (=3 alteraciones) <u>Muy malo:</u> complejo (>3 alteraciones)

Varios estudios han mostrado que las alteraciones detectadas mediante FISH tienen un valor diagnóstico y pronóstico similar a las observadas mediante citogenética convencional. Sin embargo, la información que aporta está limitada a las sondas utilizadas por lo que no debe sustituir al estudio del cariotipo.<sup>153,154</sup>

Diversos grupos han explorado el valor pronóstico de las alteraciones citogenéticas detectadas mediante CGH o SNP *arrays*.<sup>155,156,157</sup> En dichos estudios los *arrays* genómicos permitieron la detección de más alteraciones citogenéticas que la citogenética convencional, especialmente en los SMD de bajo riesgo.<sup>155</sup> En los análisis de supervivencia, aunque limitados debido a que las series son pequeñas y con un seguimiento corto, mostraron que los pacientes con lesiones detectadas únicamente mediante SNP-A presentaban una peor supervivencia que los pacientes con cariotipo normal mediante citogenética convencional.<sup>156</sup> Dadas las ventajas y desventajas inherentes a cada técnica, se llevó a cabo un estudio multicéntrico para evaluar la aplicabilidad y la utilidad de la combinación de citogenética convencional y SNP-A en una cohorte de 430 pacientes con SMD (n= 250), NMP/SMD (n = 95) y LMA (n = 85).<sup>157</sup> La combinación de ambas técnicas permitió la detección de un mayor número de anomalías en todos los subgrupos de pacientes. Se observó una peor SG y una menor supervivencia libre de progresión (SLP) en los pacientes en los que se detectaron alteraciones en comparación con los que no las tenían. En los pacientes con IPSS de bajo riesgo la presencia de alteraciones mediante SNP-A conllevaba una peor SG. También se observó que a mayor número de alteraciones peor SG, SLP y supervivencia libre de evento (SLE). En el análisis multivariante tanto el hallazgo de nuevas alteraciones mediante SNP-A, como el número de las mismas, mantuvieron su valor pronóstico independiente para SG y SLE.<sup>157</sup>

### **3.1.3 Valor pronóstico de las mutaciones**

Se han publicado varios estudios en los que se ha evaluado el impacto pronóstico de las mutaciones asociadas a SMD en series amplias de pacientes.<sup>97,99,100</sup> Las conclusiones fundamentales que se extraen de ellos:

- A mayor número de mutaciones, el pronóstico de los pacientes empeora.<sup>97,99</sup>

- Algunas mutaciones se correlacionan con el pronóstico favorable (*SF3B1*) o adverso (*TP53*, *EZH2*, *ETV6*, *RUNX1*, *ASXL1* y *SRSF2*).

- La presencia de la mutación de *TP53* se ha relacionado con una peor respuesta al tratamiento con lenalidomida en pacientes con SMD y del(5q).<sup>158,159</sup>

La incorporación de la información pronóstica de las mutaciones a los índices pronósticos clásicos no parece añadir por el momento una gran mejora de los mismos debido a la probable interrelación de dichas mutaciones y factores como la cifra de blastos y el cariotipo.<sup>160</sup>

### **3.1.4 Valor pronóstico de las alteraciones inmunofenotípicas**

En los últimos años, la citometría de flujo ha demostrado tener un papel útil en la estratificación pronóstica de los pacientes con SMD.<sup>115,161,162</sup>

Varios estudios han correlacionado la presencia de un mayor número de alteraciones fenotípicas con los SMD de alto riesgo respecto a los de bajo riesgo.<sup>163</sup> Asimismo, algunas aberraciones fenotípicas concretas han mostrado un valor pronóstico independiente, como son una disminución en el porcentaje de precursores linfocitos B, la disminución de granularidad de la línea neutrófila, disminución de la expresión de CD45 en mieloblastos, alteración en la expresión de CD36 en precursores eritroides, entre otras.<sup>164</sup>

## **3.2 Índices pronósticos**

### **3.2.1 International Prognostic Scoring System (IPSS)**

Es el índice pronóstico más ampliamente utilizado desde su publicación en 1997.<sup>120</sup>

Fue generado tras la evaluación de las características clínico-biológicas de 816 pacientes con SMD primario tratados únicamente con medidas de soporte. El modelo final incluyó sólo 3 variables: proporción de blastos en MO, cariotipo y número de citopenias en SP (Tabla 11).

**Tabla 11.** Sistema de puntuación del IPSS.<sup>120</sup>

Variable Pronóstica	0	0.5	1	1.5	2
<i>Blastos MO (%)</i>	<5	5-10	-	11-20	21-30
<i>Cariotipo*</i>	Bueno	Intermedio	Malo	-	-
<i>Nº citopenias</i>	0-1	2-3	-	-	-

\*Cariotipo. Bueno: normal, -Y, del(5q), del(20q) como alteraciones únicas; Malo: complejo (≥3 alteraciones), alteraciones del cromosoma 7; Intermedio: otras anomalías únicas o dobles.

De acuerdo a este *score* los pacientes con SMD pueden agruparse en cuatro categorías de riesgo (Bajo, Intermedio-1, Intermedio-2 y Alto) con diferencias significativas en SG y riesgo de transformación a LMA (Tabla 12).

**Tabla 12.** Grupos de riesgo del IPSS y mediana de supervivencia global de cada uno de ellos.<sup>120</sup>

Grupo de Riesgo	Puntuación	Mediana SG (años)
<i>Bajo</i>	0	5.7
<i>Intermedio-1</i>	0.5-1	3.5
<i>Intermedio-2</i>	1.5-2	1.1
<i>Alto</i>	≥2.5	0.4

Abreviaturas. SG: supervivencia global.

La ventaja de este sistema radica en su simplicidad y aplicabilidad con los parámetros habitualmente utilizados en el manejo de los SMD. Durante años ha sido el esquema pronóstico más usado para definir las poblaciones de pacientes candidatos a ensayos clínicos y ha sido incorporado en las guías clínicas más difundidas en esta enfermedad.<sup>36,61,62</sup>

Sus potenciales desventajas son:

- 1) No tiene en cuenta la severidad de las citopenias ni de la displasia.
- 2) Asigna más peso pronóstico a los blastos que a la citogenética.<sup>78,165</sup>
- 3) Parece infraestimar el riesgo de algunos pacientes catalogados en los grupos de riesgo bajo o intermedio-1.<sup>27,166</sup>
- 4) Fue diseñado y validado sólo para pacientes en el momento del diagnóstico.

Posteriormente se han llevado a cabo estudios que han demostrado su utilidad en otros momentos de la evolución de la enfermedad, como previo al trasplante alogénico y en pacientes tratados.<sup>167</sup>

- 5) No fue diseñado para pacientes con SMD secundario.
- 6) Presenta una probable sobrestimación del riesgo de los pacientes ya que la supervivencia fue calculada en muchos pacientes desde que fueron remitidos a centros terciarios y no desde su diagnóstico.

### 3.2.2 Revised Prognostic Scoring System (IPSS-R)

Con el objetivo de solventar alguna de las desventajas del IPSS, en el año 2012 se publicó una revisión del mismo, el denominado *Revised Prognostic Scoring System* (IPSS-R) basado en el estudio de 7012 pacientes con SMD *de novo* (Tabla 13).<sup>121</sup>

**Tabla 13.** Sistema de puntuación del IPSS-R.<sup>121</sup>

Variable pronóstica	0	0.5	1	1.5	2	3	4
<i>Grupo riesgo CG*</i>	Muy buena	-	Buena	-	Intermedio	Malo	Muy malo
<i>% blastos MO</i>	≤2		>2-<5		5-10	>10	
<i>Hemoglobina</i>	≥10		8-<10	<8			
<i>Plaquetas</i>	≥100	50-<100	<50				
<i>Neutrófilos</i>	≥0.8	<0.8					

\*Grupo de riesgo citogenético. Muy bueno: -Y, del(11q) como alteraciones únicas; Bueno: normal, del(5q), del(12p), del (20q) como alteraciones únicas o dobles con del(5q); Intermedio: del(7q), +8, +19, i(17q) como alteraciones únicas y cualquier otra anomalía única o doble independiente; Malo: -7, inv(3)/(3q)/del(3q), dobles con -7/del(7q), complejo con 3anomalías; Muy malo: complejo con más de 3 alteraciones.

El IPSS-R divide a los pacientes en 5 categorías de riesgo: muy bajo, bajo, intermedio, alto y muy alto (Tabla 14).

**Tabla 14.** Grupos de riesgo del IPSS-R y mediana de supervivencia global de cada uno de ellos.<sup>121</sup>

Grupo de Riesgo	Puntuación	Mediana SG (años)
<i>Muy bajo</i>	≤1.5	8.8
<i>Bajo</i>	>1.5-3	5.3
<i>Intermedio</i>	>3-4.5	3.0
<i>Alto</i>	>4.5-6	1.6
<i>Muy alto</i>	>6	0.8

Los cambios fundamentales con respecto al IPSS son:

- 1) Divide las categorías citogenéticas de riesgo en 5 frente a los 3 del IPSS.<sup>145</sup>

2) Resta peso pronóstico al porcentaje de blastos en MO y redefine los subgrupos de los mismos.

3) Considera cada citopenia de forma individual.

En estudios posteriores ha sido validado para su aplicación en distintos momentos del curso clínico de la enfermedad,<sup>168,169</sup> así como en SMD secundarios a tratamientos.<sup>128,170</sup>

Pese a su amplia aceptación, plantea el problema clínico de cómo considerar los pacientes clasificados en la categoría de riesgo intermedio. Estos pacientes han mostrado en varios estudios una SG en torno a 30 meses, más cercana a la de los pacientes de alto riesgo que a la de los de bajo riesgo.<sup>171,172</sup> En este sentido, el GESMD considera a los pacientes de este grupo como pacientes de alto riesgo si cumplen uno o más de los siguientes: alteraciones CG de alto o muy alto riesgo, plaquetas  $<30 \times 10^9/L$ , neutrófilos  $<0.5 \times 10^9/L$  o mielofibrosis grado 2-3.<sup>36</sup> Otros autores recomiendan una división práctica de los pacientes en bajo riesgo si puntúan 3.5 o menos en el IPSS-R o alto riesgo si puntúan más de 3.5.<sup>173</sup>

El IPSS-R parece una mejor herramienta que el IPSS para predecir el pronóstico en la era de los tratamientos modificadores de la evolución de la enfermedad.<sup>171</sup>

### 3.2.3 WHO Prognostic Scoring System

El WPSS (*WHO prognostic scoring system*) es un sistema pronóstico basado en la clasificación OMS de los SMD, los grupos de riesgo citogenético similares al IPSS y la dependencia transfusional, este último factor sustituido en una revisión posterior por la severidad de la anemia (Tabla 15).<sup>132,134,172</sup>

**Tabla 15.** Sistema de puntuación del WPSS.<sup>132</sup>

Variable Pronóstica	0	1	2	3
<i>Clasificación OMS 2001</i>	AR, ARSA, Síndrome 5q-	CRDM, CRDM-SA	AREB-1	AREB-2
<i>Cariotipo*</i>	Bueno	Intermedio	Alto	-
<i>Requerimiento transfusional</i>	No	Regular	-	-

\*Cariotipo. Bueno: normal, -Y, del(5q), del(20q) como alteraciones únicas; Malo: complejo ( $\geq 3$  alteraciones), alteraciones del cromosoma 7; Intermedio: otras anomalías únicas o dobles.

Abreviaturas. AR: anemia refractaria; ARSA: anemia refractaria con sideroblastos en anillo; CRDM: citopenia refractaria con displasia multilínea; CRDM-SA: citopenia refractaria con displasia multilínea y sideroblastos en anillo; AREB: anemia refractaria con exceso de blastos.

Categoriza los pacientes en 5 grupos de riesgo (muy bajo, bajo, intermedio, alto y muy alto) con diferencias en SG (Tabla 16), resulta fácil de aplicar y ha sido incluido en distintas guías clínicas de los SMD.<sup>36,61,62</sup> Ha sido validado como un índice dinámico, pudiendo ser aplicado en diferentes momentos de la enfermedad.<sup>174,175</sup>

**Tabla 16.** Grupos de riesgo del WPSS y mediana de supervivencia global de cada uno de ellos.<sup>132</sup>

Grupo de Riesgo	Puntuación	Mediana SG (meses)
<i>Muy bajo</i>	0	103
<i>Bajo</i>	1	72
<i>Intermedio</i>	2	40
<i>Alto</i>	3-4	21
<i>Muy alto</i>	5-6	12

### 3.2.4 MD Anderson Global Prognostic Scoring System (MPSS) y Low-Risk Prognostic Scoring System (LR-PSS)

En 2008 el grupo del MD Anderson publicó un índice pronóstico, el *MD Anderson Global Prognostic Scoring System* (MPSS), basado en el estudio de 1915 pacientes.<sup>176</sup>

En él se incluyeron pacientes tratados, con SMD-t, LMMC proliferativa y neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas. Teniendo en cuenta 8 parámetros (ECOG, edad, hemoglobina, leucocitos, plaquetas, porcentaje de blastos en MO, cariotipo, dependencia transfusional) los pacientes son catalogados en cuatro categorías de riesgo (bajo, intermedio-1, intermedio-2 y alto). Aunque ha sido validado de forma externa,<sup>177</sup> no ha tenido una gran aceptación por varias razones:

- al manejar tantos parámetros no resulta un sistema ágil en la práctica clínica diaria,
- no tiene en cuenta la complejidad genética de esta enfermedad, ya que simplifica la clasificación citogenética del score,
- incluir la edad y las comorbilidades en un *score* plantea dudas por la posible sobreestimación del riesgo (p. ej: indicación de un alo-TPH en un paciente catalogado de alto riesgo por sumar puntos por edad avanzada y la presencia de comorbilidades).

El grupo del MD Anderson publicó también el *Low Risk Prognostic Scoring System* (LR-PSS), un índice pronóstico creado con objeto de identificar aquellos pacientes

catalogados en categorías de bajo riesgo o intermedio-1 según IPSS pero con un comportamiento clínico desfavorable y que podrían beneficiarse de administrar tratamientos específicos de forma más precoz.<sup>178</sup> También ha sido validado por una cohorte externa.<sup>27</sup>

### 3.2.5 Recomendación del GESMD para la estratificación pronóstica de los SMD

Las guías del GESMD establecen las siguientes recomendaciones para la estratificación pronóstica de los SMD<sup>36</sup>:

1. Emplear en los SMD los índices pronósticos IPSS, WPSS e IPSS-R para establecer el pronóstico y seleccionar el tratamiento en el paciente individual pero adaptándolo a los conocimientos científicos actuales.

2. Se recomienda diferenciar los siguientes dos grupos de riesgo en pacientes con SMD:

a) Pacientes de alto riesgo (mediana de SG estimada inferior a 30 meses):

- IPSS de riesgo intermedio-2 y alto y/o WPSS y/o IPSS-R de riesgo alto y muy alto

- IPSS intermedio-1 y/o WPSS y/o IPSS-R de riesgo intermedio con 1 o más de las siguientes características:

- Anomalía citogenética de riesgo alto o muy alto del IPSS-R.

- Plaquetas  $< 30 \times 10^9/L$ .

- PMN  $< 0,5 \times 10^9/L$ .

- Mielofibrosis (grados 2-3 del consenso europeo).

b) Pacientes de bajo riesgo (mediana de SG estimada superior a 30 meses):

- Pacientes no incluidos en la definición anterior de alto riesgo.

## 4. TRATAMIENTO DE LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS

La elección del tratamiento de los SMD es difícil debido a su heterogeneidad clínica y a la escasez de tratamientos modificadores de la evolución de la enfermedad. Hasta el momento actual, el único tratamiento con potencial curativo en los SMD es el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos, pero debido a su elevada morbimortalidad es un procedimiento limitado a un escaso número de pacientes.<sup>179,180</sup>



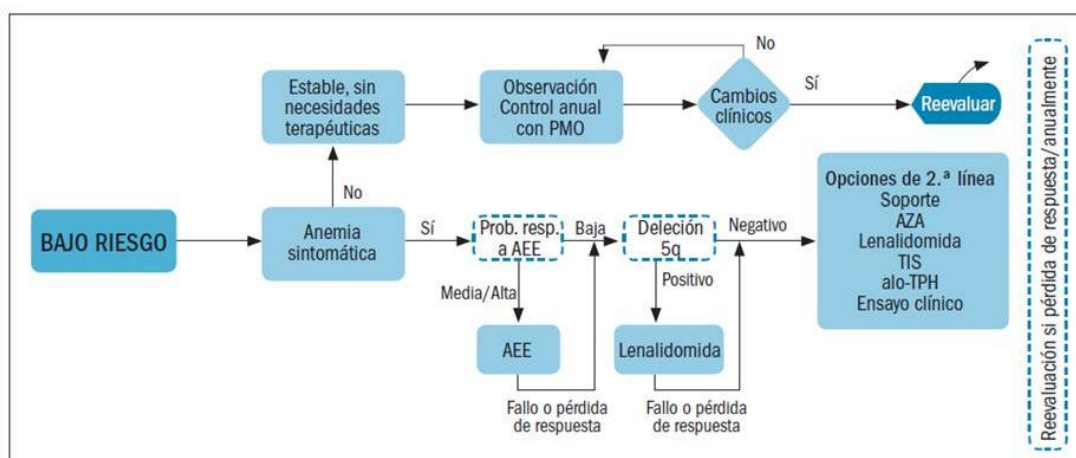
En la práctica clínica la elección del tratamiento suele estar condicionada por dos aspectos:

- la categoría de riesgo de la enfermedad según los diferentes índices pronósticos,
- la edad y las comorbilidades de los pacientes, que permitirá la identificación de pacientes no candidatos a terapias intensivas.

El objetivo del tratamiento de los pacientes de bajo riesgo es mejorar la calidad de vida y disminuir la dependencia transfusional, y en los pacientes de alto riesgo, prolongar su supervivencia y retrasar la transformación a LMA.<sup>36,61,62</sup>

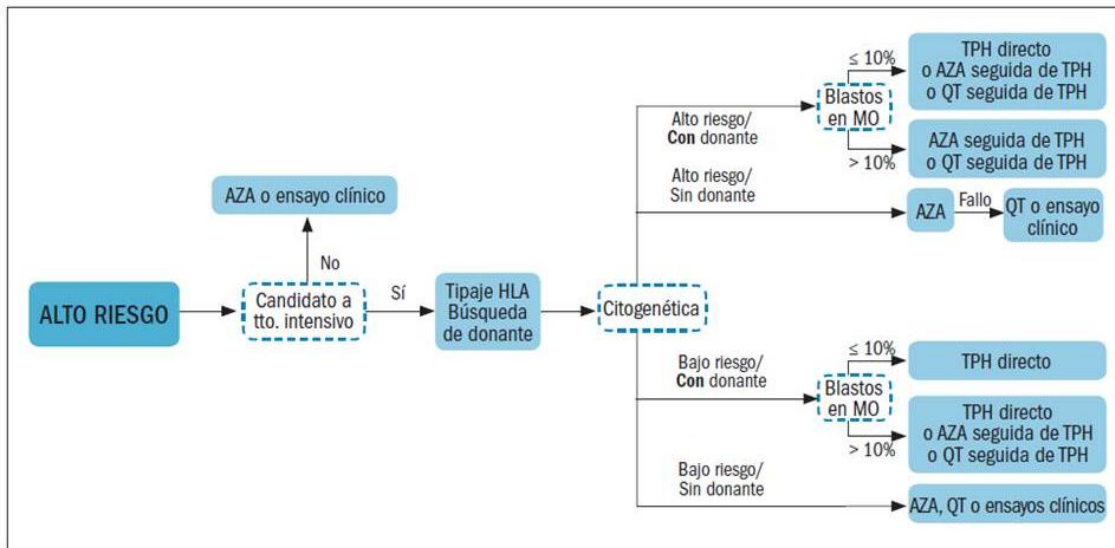
En líneas generales los tratamientos pueden clasificarse en: tratamiento de soporte (transfusiones, terapia antimicrobiana, factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF), tratamientos quelantes del hierro), tratamiento no intensivo (agentes estimulantes de eritropoyesis (AEE), fármacos demetilantes (azacitidina y decitabina), lenalidomida, tratamiento inmunosupresor) y tratamiento intensivo (quimioterapia tipo LMA y trasplante alogénico).

La Figura 8 recoge el algoritmo terapéutico para los pacientes de bajo riesgo según el GESMD.



**Figura 8.** Algoritmo de tratamiento para SMD de bajo riesgo según GESMD. Abreviaturas. AEE: agentes estimulantes de eritropoyesis; alo-TPH: trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos; AZA: azacitidina; PMO: punción de médula ósea; Prob. resp: probabilidad de respuesta; TIS: tratamiento inmunosupresor.

La Figura 9 recoge el algoritmo terapéutico para los pacientes de alto riesgo según el GESMD.



**Figura 9.** Algoritmo de tratamiento para SMD de alto riesgo según GESMD. Abreviaturas. AZA: azacitidina; HLA: antígeno leucocitario humano; MO: médula ósea; QT: quimioterapia de tipo LMA; TIS: tratamiento inmunosupresor; TPH: trasplante de progenitores hematopoyéticos.



## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



Los síndromes mielodisplásicos constituyen un conjunto heterogéneo de enfermedades agrupadas por varios rasgos comunes como son la hematopoyesis ineficaz y la displasia morfológica. La heterogeneidad en su presentación y evolución clínica hace indispensable un diagnóstico preciso y una correcta evaluación pronóstica. En un intento de mejorar la valoración diagnóstica y pronóstica de los síndromes mielodisplásicos, hemos elaborados las siguientes hipótesis y objetivos de trabajo.

- 1) La reproducibilidad de la clasificación OMS 2008 no ha sido estudiada. Dado que dicha clasificación está basada en la evaluación morfológica de la displasia y que algunos de estos parámetros morfológicos son poco objetivos y poco específicos, puede existir dificultad y cierto grado de subjetividad en su aplicación.

Objetivos:

- evaluar la variabilidad inter-observador en el diagnóstico de los SMD mediante la aplicación de los criterios de la clasificación OMS 2008.
- definir potenciales dificultades morfológicas.

- 2) Los SMD con incremento de la serie eritroide ( $\geq 50\%$  eritroblastos en la celularidad medular) no constituyen un subgrupo individualizado en la clasificación de la OMS. Estos SMD plantean el diagnóstico diferencial con la leucemia aguda mieloeritroide o eritroleucemia. En la elaboración de la clasificación OMS 2008 se produjo una falta de consenso en el comité de expertos a la hora de emitir una recomendación sobre cómo establecer el porcentaje de blastos en MO de aquellos pacientes con SMD e incremento de la serie eritroide, en base a la totalidad celular o en base al compartimento celular no eritroide.

Objetivos:

- analizar las características morfológicas, genéticas y clínicas de los SMD con incremento de la serie eritroide incluidos en el registro del GESMD.

- estudiar la forma más óptima de establecer el porcentaje de blastos de los pacientes con SMD e incremento de la serie eritroide, en base a la celularidad total o en base a la celularidad no eritroide.
- 3) El estudio citogenético convencional presenta un importante valor diagnóstico y pronóstico en los SMD. Sin embargo, hasta en un 30% de los pacientes resulta no informativo debido a la obtención de un número insuficiente de metafases analizables. La técnica de *Single Nucleotide Polymorphism Arrays* (SNP-A), que sólo necesita extracción de ADN para su aplicación, podría resolver la falta de información genética en aquellos SMD en los que no se obtienen metafases en el estudio citogenético convencional.

Objetivos:

- aplicar la técnica de *Single nucleotide polymorphism arrays* (SNP-A) en pacientes con SMD en los que el cultivo citogenético convencional fue no informativo.
- evaluar si esta técnica constituye una herramienta útil para mejorar la evaluación diagnóstica y pronóstica de este subgrupo de pacientes.

### **III. MÉTODOS Y RESULTADOS**





Los resultados y métodos se presentan mediante la inclusión de los tres artículos publicados:

### **Primer trabajo 1**

Senent L\*, **Arenillas L\***, Luño E, Ruiz JC, Sanz G, Florensa L. Reproducibility of the World Health Organization 2008 criteria for myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2013; 98(4): 568-575. IF: 5.868

\* Contribución como primeros autores

### **Segundo trabajo**

**Arenillas L**, Calvo X, Luño E, Senent L, Alonso E, Ramos F, Ardanaz MT, Pedro C, Tormo M, Marco V, Montoro J, Díez-Campelo M, Brunet S, Arrizabalaga B, Xicoy B, Andreu R, Bonanad S, Jerez A, Nomdedeu B, Ferrer A, Sanz GF, Florensa L. Considering Bone Marrow Blasts From Nonerythroid Cellularity Improves the Prognostic Evaluation of Myelodysplastic Syndromes. *J Clin Oncol*. 2016 Sep 20;34(27):3284-92. IF: 24.008

### **Tercer trabajo 3**

**Arenillas L**, Mallo M, Ramos F, Guinta K, Barragán E, Lumbreras E, Larráyoz MJ, De Paz R, Tormo M, Abáigar M, Pedro C, Cervera J, Such E, José Calasanz M, Díez-Campelo M, Sanz GF, Hernández JM, Luño E, Saumell S, Maciejewski J, Florensa L, Solé F. Single nucleotide polymorphism array karyotyping: a diagnostic and prognostic tool in myelodysplastic syndromes with unsuccessful conventional cytogenetic testing. *Genes, Chromosomes Cancer*. 2013;52(12): 1167-1177. IF: 3.836



## PRIMER TRABAJO

### ***Reproducibility of the World Health Organization 2008 criteria for myelodysplastic syndromes.***

La reproducibilidad de la clasificación OMS 2008 de los SMD no ha sido estudiada.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la concordancia interobservador de la clasificación OMS 2008.

#### Pacientes

Se evaluaron de forma retrospectiva extensiones de sangre periférica y de médula ósea obtenidas mediante punción aspirativa de 50 pacientes diagnosticados de SMD de acuerdo a la clasificación OMS 2008. Los casos pertenecían a dos centros con experiencia en el diagnóstico de SMD, Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia y Hospital del Mar de Barcelona.

#### Estudios morfológicos

La evaluación morfológica fue realizada de forma independiente por cuatro hematólogos con experiencia en diagnóstico citológico.

Los observadores disponían de los datos del hemograma en el momento de la evaluación citológica pero no los datos citogenéticos ni de evolución clínica.

Se siguieron de forma estricta las recomendaciones OMS 2008 para la evaluación morfológica.

Toda la información morfológica se recogió en un formulario elaborado con este propósito y adoptado por el GESMD como la hoja de recogida de datos morfológicos. Se adjunta en el apartado de Anexos.

#### Análisis estadístico

El acuerdo entre observadores para las variables cuantitativas continuas se evaluó mediante el coeficiente de correlación intraclase (ICC, del inglés *intraclass correlation coefficient*).<sup>181</sup> Algunas de las variables cuantitativas fueron además categorizadas y

evaluadas como cualitativas. Para evaluar el grado de acuerdo en las variables cualitativas y las cuantitativas categorizadas se utilizó el índice kappa para múltiples evaluadores ( $\kappa$ ). Un ICC y un  $\kappa$  con un valor de 1 se interpretan como el máximo grado de acuerdo entre observadores, mientras que un valor de 0 indica un acuerdo equivalente al azar. La escala utilizada para ambos índices es la siguiente: < 0.20 acuerdo pobre; 0.21 – 0.40: acuerdo débil; 0.41 – 0.60: acuerdo moderado; 0.61 – 0.80: acuerdo bueno; 0.81 – 1.00: acuerdo muy bueno.

## Resultados

### *Valoración del porcentaje de blastos en MO*

- Se observó un muy buen acuerdo en cuanto la cifra de blastos de MO considerada como una variable continua.
- Cuando la cifra de blastos en MO se categorizó con los umbrales establecidos por la OMS 2008 (<5%, 5-9% y  $\geq$ 10%) el grado de acuerdo fue moderado. El rango en el que se observó un menor grado de acuerdo fue 5-9%.
- Cuando se consideraron las categorías de blastos del IPSS-R ( $\leq$ 2%, >2-<5%, 5-10%, >10%) el grado de acuerdo fue moderado de forma global, pero débil para los casos con menos de 2% de blastos.

### *Valoración del porcentaje de blastos en SP.*

- Los observadores presentaron una buena concordancia a la hora de establecer el porcentaje de blastos en SP de forma global, sin embargo fue débil para evaluar los umbrales que utiliza la OMS como criterio para diferenciar entre categorías (ausente,  $\leq$ 1%, >1%).

### *Valoración del porcentaje de sideroblastos en anillo.*

- El acuerdo entre evaluadores en cuanto al porcentaje de sideroblastos en anillo en MO, tanto como variable continua como usando el punto de corte del 15%, fue muy bueno.

### *Valoración del porcentaje de displasia.*

- Cuando se valoró el porcentaje de displasia de cada línea mieloide como variable continua, se observó un acuerdo casi perfecto para las líneas megacariocítica y granulocítica, mientras que en la serie eritroide fue menor.
- Cuando dichas variables se categorizaron tomando el 10% como umbral, la concordancia fue estadísticamente significativa en las series megacariocítica y granulocítica, pero no en la eritroide.
- Cuando se consideró el umbral del 40% mejoró el grado de acuerdo en las líneas megacariocítica y granulocítica pero no en la eritroide.

*Valoración del subtipo OMS.*

- La concordancia para establecer el subtipo OMS 2008 fue moderado de forma global. Se observó una mayor reproducibilidad para los subtipos AREB-2, CRDU y CRDM, respectivamente, siendo menor para ARSA y AREB-1.



# Reproducibility of the World Health Organization 2008 criteria for myelodysplastic syndromes

Leonor Senent,<sup>1,2\*</sup> Leonor Arenillas,<sup>1,3\*</sup> Elisa Luño,<sup>1,4</sup> Juan C. Ruiz,<sup>5</sup> Guillermo Sanz,<sup>1,2</sup> and Lourdes Florensa<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>On behalf of the Spanish MDS cooperative group (GESMD); <sup>2</sup>Servicio de Hematología, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain; <sup>3</sup>Laboratori de Citologia Hematològica, Servei de Patologia, Hospital del Mar, GRETNHE, IMIM (Hospital del Mar Research Institute), Barcelona, Spain; <sup>4</sup>Servicio de Hematología, Hospital Central de Asturias, Oviedo, Spain; and <sup>5</sup>Departamento de Metodología de las Ciencias del Comportamiento, Facultad de Psicología, Universidad de Valencia, Valencia, Spain

## ABSTRACT

The reproducibility of the World Health Organization 2008 classification for myelodysplastic syndromes is uncertain and its assessment was the major aim of this study. The different peripheral blood and bone marrow variables required for an adequate morphological classification were blindly evaluated by four cytomorphologists in samples from 50 patients with myelodysplastic syndromes. The degree of agreement among observers was calculated using intraclass correlation coefficient and the generalized *kappa* statistic for multiple raters. The degree of agreement for the percentages of blasts in bone marrow and peripheral blood, ring sideroblasts in bone marrow, and erythroid, granulocytic and megakaryocytic dysplastic cells was strong ( $P < 0.001$  in all instances). After stratifying the percentages according to the categories required for the assignment of World Health Organization subtypes, the degree of agreement was not statistically significant for cases with 5-9% blasts in bone marrow ( $P = 0.07$ ), 0.1-1% blasts in peripheral blood ( $P = 0.47$ ), or percentage of erythroid dysplastic cells ( $P = 0.49$ ). Finally, the interobserver concordance for World Health Organization-defined subtypes showed a moderate overall agreement ( $P < 0.001$ ), the reproducibility being lower for cases with refractory anemia with excess of blasts type 1 ( $P = 0.05$ ) and refractory anemia with ring sideroblasts ( $P = 0.09$ ). In conclusion, the reproducibility of the World Health Organization 2008 classification for myelodysplastic syndromes is acceptable but the defining criteria for blast cells and features of erythroid dysplasia need to be refined.

## Introduction

For more than 20 years the French-American-British morphological classification was the base for the diagnosis of myelodysplastic syndromes (MDS), a group of acquired clonal hematopoietic stem cell disorders with very heterogeneous outcomes and characterized by ineffective hematopoiesis, cytopenias, dysplastic morphological features, and an increased risk of development of acute myeloid leukemia (AML).<sup>1,2</sup> In an attempt to improve its prognostic value, to incorporate other relevant morphological and biological prognostic characteristics, such as grade of myelodysplasia and cytogenetics, and to redefine the border between MDS and AML, an expert panel of the World Health Organization (WHO) proposed, in 2001, a new classification system for MDS<sup>3</sup> that was refined in 2008.<sup>4</sup> Taking into account the type and number of cytopenias, percentage of cells with dysplastic changes in the different myeloid cell lineages, percentage of blasts in peripheral blood and bone marrow, percentage of ring sideroblasts in bone marrow, absolute monocyte count and conventional cytogenetics, the revised 2008 WHO classification recognizes seven subcategories of MDS that are shown in Table 1 (modified from

Vardiman JW *et al.*<sup>5</sup>). Although the usefulness of the WHO classification was initially criticized,<sup>6,7</sup> it has gained widespread acceptance.<sup>1,8</sup> The prognostic value of the 2001 WHO classification is clearly superior to that of the French-American-British classification<sup>9,10</sup> and has been incorporated into the recently defined WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS).<sup>11,12</sup> However, the reproducibility of the WHO classification is uncertain. The only published study on interobserver agreement according to the 2001 WHO criteria showed an acceptable reproducibility.<sup>13</sup> A recent study evidenced a 20% discrepancy in the WHO 2008 classification-based diagnosis between referring and tertiary care centers.<sup>14</sup> The concordance between observers of the 2008 WHO criteria has never been addressed. This issue is not only academically interesting, but also clinically relevant.

The aim of this study was to assess the reproducibility of the WHO 2008 morphological classification. For this purpose peripheral blood and bone marrow samples from 50 patients with MDS were blindly and independently reviewed by four cytomorphologists from three different referral centers with expertise in the diagnosis of MDS. The interobserver concordance in the quantification of the three morphological characteristics required for the assignment of patients to the

©2013 Ferrata Storti Foundation. This is an open-access paper. doi:10.3324/haematol.2012.071449

\*LS and LA contributed equally to this work

Manuscript received on June 3, 2012. Manuscript accepted on September 17, 2012.

Correspondence: senent\_jeo@gva.es.



appropriate WHO morphological subtype (the number of blast cells in peripheral blood and bone marrow, percentage of ring sideroblasts in bone marrow and myelodysplastic features) was evaluated.

## Design and Methods

### Patients and samples

Samples of bone marrow aspirates and peripheral blood from 50 patients with a clearly established diagnosis of MDS according to WHO 2008 criteria and diagnosed at two of the participating centers (Hospital del Mar, Barcelona and Hospital Universitari i Politecnic La Fe, Valencia) were included in this retrospective analysis. In all instances the analyzed samples had been obtained at initial evaluation. The number of cases of the different WHO 2008 morphological subtypes selected for review was prefixed according to their expected incidence in previous studies.<sup>4</sup> Preference for inclusion in the study was given to cases diagnosed in more recent years and with good quality samples available. Table 2 summarizes the main characteristics of the patients.

### Morphological studies

Four smears from each patient included in the study were available for blind and independent microscopical review by four experienced cytologists from three centers. Two bone marrow and one peripheral blood May-Grünwald-Giemsa-stained smears were used for assessing percentages of blasts in peripheral blood and bone marrow and percentages of dysplastic cells of the three myeloid cell lines. An additional Prussian blue-stained bone marrow smear was used for assessing the percentage of ring sideroblasts. The cytologists had a meeting to discuss the evaluation of

dysplasia and diagnosis using training slides. Blasts and ring sideroblasts were defined according to the recent consensus proposals of the International Working Group on Morphology of Myelodysplastic Syndromes (IWGM-MDS).<sup>15</sup> The WHO 2008 recommendations for evaluating the morphological diagnosis of MDS were followed strictly. Thus, bone marrow blast counts were calculated as percentages of all bone marrow nucleated cells. Peripheral blood and bone marrow differential counts were performed on at least 200 and 500 cells, respectively. The evaluation of dysplasia was based on morphological criteria described in the 2008 WHO publication.<sup>4</sup> Briefly, the following morphological features of dysplasia were evaluated: (i) dyserythropoiesis: nuclear budding, internuclear bridging, karyorrhexis, multinuclearity, nuclear hyperlobation, megaloblastic changes, basophil stippling, ring sideroblasts and vacuolization; (ii) dysgranulopoiesis: nuclear hypolobation (pseudo Pelger-Huët), irregular hypersegmentation, agranularity, pseudo Chediak-Higashi granules, Auer rods and Döhle bodies; and (iii) dysmegakaryocytopoiesis: micromegakaryocytes, nuclear hypolobation, and multinucleation. As defined in the WHO 2008 classification, the threshold used for considering a myeloid cell line as dysplastic was the presence of  $\geq 10\%$  abnormal cells in the corresponding myeloid lineage. To assess dysplasia at least 200 neutrophils, 200 erythroid precursors and 30 megakaryocytes were evaluated in bone marrow. Information on hemoglobin level, and absolute neutrophil and platelet counts was available for observers when performing the morphological review. In contrast, the observers were blinded to the clinical and cytogenetic data. Consequently, for the purpose of this study, cases of MDS associated with isolated 5q deletion were classified into other MDS morphological subtypes. All the morphological characteristics analyzed were recorded in specific forms designed for this purpose by the Spanish Group on Myelodysplastic Syndromes

**Table 1.** WHO 2008 classification of myelodysplastic syndromes.

Disease	Blood findings Cytopenia(s) and others criteria	Bone marrow findings Blasts	Dysplasia* and others criteria	Blasts
Refractory cytopenias with unilineage dysplasia (RCUD)	Uni or bicytopenia <sup>†</sup>	None or rare (<1%) <sup>†</sup>	Unilineage dysplasia <15% ring sideroblasts	<5%
Refractory anemia (RA)	Anemia			
Refractory neutropenia (RN)	Neutropenia			
Refractory thrombocytopenia (RT)	Thrombocytopenia			
Refractory anemia with ring sideroblasts (RARS)	Anemia	None	Erythroid dysplasia only $\geq 15\%$ ring sideroblasts	<5%
Refractory cytopenia with multilineage dysplasia (RCMD)	Cytopenia(s) <1 x10 <sup>6</sup> monocytes/L Dysplasia in $\geq 2$ myeloid lineages	None or rare (<1%) <sup>†</sup> No Auer rods	$\pm 15\%$ ring sideroblasts	<5% No Auer rods
Refractory anaemia with excess blasts-1 (RAEB-1)	Cytopenia(s) <1x10 <sup>6</sup> monocytes/L	<5% <sup>†</sup> No Auer rods	Unilineage o multilineage dysplasia	5 – 9% <sup>†</sup> No Auer rods
Refractory anaemia with excess blasts-2 (RAEB-2)	Cytopenia(s) <1x10 <sup>6</sup> monocytes/L	5 – 19% <sup>†</sup> $\pm$ Auer rods <sup>‡</sup>	Unilineage o multilineage dysplasia	10 – 19% <sup>†</sup> $\pm$ Auer rods <sup>‡</sup>
MDS unclassified (MDS-U)	Cytopenia(s)	$\leq 1\%$ <sup>†</sup>	Unequivocal dysplasia in <10% of cells in $\geq 1$ line when accompanied by a cytogenetic abnormality considered as presumptive evidence for a diagnosis of MDS <sup>§</sup>	<5%
MDS associated with isolated del(5q)	Anemia Usually normal or increased platelet count	None or rare (<1%)	Normal to increased megakaryocytes with hypolobated nuclei Isolated del(5q) abnormality	<5% No Auer rods

\*The percentage of cells manifesting dysplasia required to qualify as significant is  $\geq 10\%$  for each myeloid lineage. <sup>†</sup>Bicytopenia may occasionally be observed. Cases with pancytopenia should be classified as MDS-U. <sup>‡</sup>If the marrow myeloblast percentage is <5% but there are 2-4% myeloblasts in the blood, the diagnosis is RAEB1. Cases of RCUD and RCMD with myeloblasts in the blood should be classified as MDS-U. <sup>§</sup>Cases with Auer rods and <5% myeloblasts in the blood and <10% in the marrow should be classified as RAEB2. <sup>¶</sup>A presumptive diagnosis of MDS may be made in the absence of dysplasia if any of the following cytogenetic abnormalities is present: a) unbalanced: -7 or del(7q), -5 or del(5q), i(17q) or t(17p), -13 or del(13q), del(11q), del(12p) or t(12p), del(9q) and idic(X)(q13); b) balanced: t(11;16)(q23;p13.3), t(3;21)(q26.2;q22.1), t(2;11)(p21;q23), inv(3)(q21q26.2) and t(6;9)(p23;q34).

Table 2. Main characteristics of the patients.

Patient	Date of diagnosis	Gender	Age	WHO classification*	Karyotype	IPSS risk category
1	28-01-09	M	82	RCUD	47,XY,+18[1]46,XY[19]	Int-1
2	10-12-07	F	77	RARS	46,XX[20]	Low
3	15-01-08	M	76	RARS	46,XY[16]	Low
4	01-07-07	M	81	RCUD	46,XY[20]	Low
5	24-03-09	M	59	RCDM	46,XY[20]	Low
6	12-12-07	M	67	RCDM	46,XY[20]	Int-1
7	11-06-09	M	76	RCDM	46,XY[23]	Int-1
8	10-09-09	F	54	RAEB-1	46,XX[14]	Int-1
9	22-09-11	F	65	RAEB-1	41-43,XX,der(2)?ins(2;?) (q11.2;?)t(4;7) (q33-35;q11.2), del(5) (?q22),del(7) (q22),del(9) (q22q34),add(11) (p15),-12,-13,-17,-21,+2mar[cp16]/46,XX,del(11) (q23) [5]/46,XX[4]	High
10	01-04-09	F	47	RAEB-1	45,XX-7[14]/46,sl,+8[1]/46,XX[9]	High
11	17-10-06	F	55	RAEB-2	45,XX-7[11]	High
12	09-05-08	M	89	RCUD	46,XY[16]	Low
13	20-10-09	F	80	RAEB-2	46,XX[20]	High
14	27-07-10	F	84	RARS	46,XX[20]	Low
15	19-08-09	M	67	RAEB-1	47,XY,+13[6]/46,XY[12]	Int-2
16	28-05-09	M	82	RAEB-1	46,XY[20]	Int-2
17	14-04-10	F	56	RCDM	46,XX[20]	Low
18	31-03-10	F	46	RCDM	47,XX+8[2]/46,XX[18]	Int-1
19	28-09-09	M	77	RCDM	46,XY[20]	Low
20	25-05-10	M	77	RCDM	46,XY[20]	Low
21	29-06-09	F	46	RAEB-2	46,XX-7[12]/46,XX[8]	High
22	02-12-04	F	58	RAEB-2	46,XX, der(1), (q21;q44), +8, del[11] (q21)[20]	High
23	24-01-11	F	53	RAEB-2	46,XX[20]	High
24	18-05-10	F	79	MDS-U	47,XX,+8[3]/46,XX[7]	Int-2
25	24-06-02	M	77	RAEB-1	46,XY[10]	Int-1
26	21-10-09	F	75	RARS	46,XX[20]	Low
27	13-07-09	F	80	RCDM	47,XX,+8[13]46,XX[7]	Int-1
28	15-07-09	M	82	RAEB-1	46,XY,del(7q)[16]46,XY[4]	Int-2
29	12-12-07	M	73	RAEB-1	46,XY[15]	Int-2
30	02-06-08	M	82	MDS-U	45,X,-Y[11]46,XY[9]	Low
31	12-06-08	M	82	RCUD	46,XY[20]	Low
32	21-05-03	F	81	RCUD	46,XX[20]	Low
33	20-08-08	M	70	RAEB-1	46,XY[20]	Int-1
34	24-08-09	M	81	RCDM	46,XY[20]	Int-2
35	27-10-08	F	58	RARS	46,XX[20]	Low
36	04-12-02	M	73	RAEB-1	46,XY[4]	Int-1
37	02-06-09	M	76	RAEB-2	46,XY[20]	Low
38	20-02-08	F	82	5q- MDS	46,XX,del(5q)[14]46,XX[6]	Low
39	14-09-09	M	89	RCDM	47,XY,+mar[8]	Int-1
40	27-06-05	M	75	RAEB-1	46,XY[20]	Int-1
41	07-02-07	F	67	RCUD	46,XX[20]	Low
42	19-01-09	M	80	RCDM	45,X,-Y[20]	Low
43	29-10-08	F	75	RAEB-2	46,XX[14]	Int-2
44	21-04-08	F	78	RARS	46,XX[20]	Low
45	13-10-08	M	60	RAEB-2	46,XY[20]	Int-2
46	04-12-06	M	68	RAEB-1	46,XY[20]	Int-1

Continued on the next page

Continued from the previous page

47	15-10-08	M	82	RCDM	46,XY[20]	Low
48	08-10-08	M	70	RCDM	46,XY[20]	Int-1
49	22-04-09	M	83	RCDM	46,XY[20]	Low
50	03-06-09	M	79	RCDM	46,XY[20]	Int-1

M: male; F: female; RCUD: refractory cytopenia with unilineage dysplasia; RARS: refractory anemia with ring sideroblasts; RCMD: refractory cytopenia with multilineage dysplasia; RAEB: refractory anemia with excess of blasts; MDS-U: myelodysplastic syndrome unclassified; 5q-MDS: MDS associated with isolated del(5q); IPSS: International Prognostic Scoring System; Int-1: Intermediate-1; Int-2: Intermediate-2. \* WHO 2008 diagnosis previously established by the center of origin.

(GESMD) and transferred into a specific database. Once the review had been finished, no attempt was made to reach a consensus agreement on cases with discrepant results in any of the variables analyzed. The local ethics committees approved the studies which were conducted in accordance with the 2000 revision of the Helsinki Declaration.

### Statistical analysis

Agreement between the four observers for continuous quantitative variables (percentages of blasts in peripheral blood and bone marrow, percentages of ring sideroblasts in bone marrow and percentages of dysplastic cells of erythroid, granulocytic and megakaryocytic lineages) was evaluated using the intraclass correlation coefficient (ICC).<sup>16</sup> The ICC has advantages over Spearman's correlation coefficient, because it is adjusted for the effects of the scale of measurements, and allows the assessment of agreement when there are more than two observers. Quantitative variables (percentages of blast cells in peripheral blood and bone marrow, percentages of ring sideroblasts in bone marrow and percentage of dysplastic cells in each myeloid lineage) were categorized and also evaluated as categorical variables (Table 3). For this purpose, we used the cutoff levels defined by the WHO classification and an additional cutoff level of 40% of dysplastic cells according to previous data.<sup>17</sup> To evaluate the concordance between observers in qualitative and categorized quantitative variables, the generalized kappa statistic for multiple raters ( $\kappa$ ) was calculated. An ICC or generalized  $\kappa$  statistic value of 1 denotes complete agreement between the different observers, while an ICC value of 0 denotes agreement equivalent to chance. Both the ICC and the generalized  $\kappa$  statistic can be interpreted as follows: 0-0.2 indicates poor agreement, 0.3-0.4 indicates fair agreement, 0.5-0.6 indicates moderate agreement; 0.7-0.8 indicates strong agreement, and >0.8 indicates almost perfect agreement.<sup>18</sup> The statistical package SPSS, version 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used to calculate the ICC and a Microsoft Excel Template to calculate the  $\kappa$  statistic.

## Results

The degree of concordance between observers for the different morphological characteristics is summarized in Table 3.

### Interobserver concordance regarding blast cell count

There was a strong agreement in the percentage of blast cells in bone marrow considered as a continuous variable. The ICC for this parameter was 0.95 [95% confidence interval (CI), 0.92-0.97;  $P < 0.001$ ]. When its degree of concordance was assessed stratifying the variable into three categories (<5%, 5-9%, and  $\geq 10\%$ ), according to the thresholds used in WHO classification subtypes, the interobserver concordance was moderate (overall  $\kappa$ , 0.57;  $P < 0.001$ ). The degree of agreement was higher and significant when the bone marrow blast percentage was

less than 5% ( $\kappa$ , 0.72;  $P < 0.001$ ) or equal or greater to 10% ( $\kappa$ , 0.65;  $P < 0.001$ ), but it was lower for cases with an intermediate percentage of bone marrow blast cells (5-9%) for which only a fair agreement was reached ( $\kappa$ , 0.29;  $P = 0.07$ ). When this variable was further stratified into four categories, adding a cutoff point of 2% blast cells in bone marrow, the interobserver concordance was fair (overall  $\kappa$  0.42;  $P < 0.001$ ). The  $\kappa$  values were 0.50 ( $P = 0.002$ ) for cases with less or equal to 2%, 0.28 ( $P = 0.065$ ) for cases with more than 2% and less than 5%, 0.29 ( $P = 0.048$ ) for cases with 5% to less than 10% and 0.60 ( $P < 0.001$ ) for cases with more or equal than 10%.

Interobserver agreement for the percentage of blast cells in peripheral blood showed a very good agreement. The ICC for this parameter was 0.82 (95% CI: 0.72-0.89). When the variable was evaluated according to the subcategories used in the WHO classification (absent, less or equal to 1% and more than 1%), the overall  $\kappa$  score was 0.30 ( $P < 0.002$ ). The agreement between observers was significant in the condition with more than 1% blasts ( $\kappa$ , 0.37;  $P = 0.009$ ), but there was no significant agreement between observers in the condition without blasts ( $\kappa$ , 0.37;  $P = 0.20$ ) and in the intermediate category of less than or equal to 1% blasts ( $\kappa$ , 0.09;  $P = 0.47$ ).

### Interobserver concordance regarding ring sideroblast count

The agreement between observers on the percentage of ring sideroblasts in bone marrow was nearly perfect analyzed both as a continuous variable (ICC, 0.96; 95% CI: 0.93-0.98;  $P < 0.001$ ) and with the 15% cutoff point used in the WHO criteria ( $\kappa$ , 0.82;  $P < 0.001$ ).

### Interobserver concordance regarding the assessment of dysplasia

When the degree of dysplasia of the three different hematopoietic cell lines was studied as a continuous variable, the degree of concordance between observers was strong and almost perfect for the megakaryocytic lineage with an ICC of 0.91 (95% CI: 0.85-0.95;  $P < 0.001$ ) and for the granulocytic lineage with an ICC of 0.89 (95% CI: 0.83-0.94;  $P < 0.001$ ). A substantial agreement was observed for the erythroid lineage with an ICC of 0.75 (95% CI: 0.60-0.85;  $P < 0.001$ ). When those variables were stratified according to the 10% cutoff point required by the WHO criteria to define a hematopoietic cell lineage as dysplastic, the interobserver agreement was statistically significant for the granulocytic ( $\kappa$ , 0.40;  $P = 0.04$ ) and megakaryocytic ( $\kappa$ , 0.49;  $P < 0.001$ ) lineages. There was poor agreement regarding the erythroid lineage ( $\kappa$ , 0.19;  $P = 0.49$ ). When a cutoff of 40% dysplastic cells was used, the concordance between raters improved for the megakaryocytic and granulocytic lineages but did not improve for the erythroid lineage.

### Reproducibility of World Health Organization-defined subtypes of myelodysplastic syndromes

The overall interobserver concordance for WHO-defined MDS subtypes showed a moderate overall agreement ( $\kappa$ , 0.43;  $P < 0.001$ ) (Table 3 and Figure 1). A greater reproducibility was found for patients with refractory anemia with excess blasts-2 ( $\kappa$ , 0.60,  $P < 0.001$ ), refractory cytopenias with unilineage dysplasia ( $\kappa$ , 0.5;  $P < 0.001$ ) and refractory cytopenia with multilineage dysplasia ( $\kappa$ , 0.46;  $P < 0.01$ ). Concordance was lower for refractory anemia with ring sideroblasts ( $\kappa$ , 0.26,  $P = 0.09$ ) and refractory anemia with excess blasts-1 ( $\kappa$ , 0.29;  $P = 0.05$ ).

### Discussion

Despite major advances in the diagnosis of hematologic diseases, cytomorphological criteria remain the cornerstone of the diagnosis of MDS. The current study was designed to evaluate interobserver variability in assigning a diagnosis of MDS according to the WHO 2008 classification criteria and to define potential morphological difficulties. In our study, we observed a moderate reproducibility of the WHO 2008 classification.

In 2008, Muffi *et al.*<sup>15</sup> pointed out the difficulty of morphological diagnosis of blast cells, although the percentage of blasts in bone marrow is one of the main known prognostic factors<sup>7,19,20</sup> and has been included in the most commonly used prognostic scoring systems for MDS, such as the International Prognostic Scoring System (IPSS) and the WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS). In our work we found an almost perfect agreement regarding bone marrow blast cell count in cases with  $< 5\%$  or with  $\geq 10\%$ . In those cases with a blast cell count  $\geq 5\%$  and  $< 10\%$ , the rate of concordance showed a moderate agreement. This implies that one patient could be classified as having refractory cytopenia with multilineage dysplasia, refractory anemia with excess blasts-1 or refractory anemia with excess blasts-2 depending on the observer. We decided to evaluate the interobserver concordance for an additional cutoff point of 2% blasts in bone marrow for cases without excess of blasts because this threshold seems to portray prognostic relevance in the revised version of the IPSS<sup>21</sup>. The degree of agreement was adequate for cases with  $\leq 2\%$  blast cells but, again, it was not as good for cases with blast cell counts between 2% and 5%. Discrepancies in the blast count in bone marrow of patients with myeloid malignancies, including MDS, is partly due to the difficulty in distinguishing between granular blast cells and promyelocytes and the irregular distribution of blast cells in bone marrow. Although a good correlation between the percentage of blasts determined by morphological examination and percentage of CD34<sup>+</sup> cells determined by flow cytometry is usually observed, blast enumeration by morphology is the gold-standard method.<sup>4,22</sup>

The correct assignment of the percentage of blasts in peripheral blood is also crucial for a correct diagnosis and classification of patients.<sup>23</sup> In our study, we found a fair agreement in peripheral blood blast cell count. This result may be due to the low level of blast cells present in peripheral blood. Interobserver discrepancies may best be resolved by increasing the number of cells in the differential counts.

The recognition of dysplastic signs has a crucial value not only for the diagnosis and classification of MDS patients,

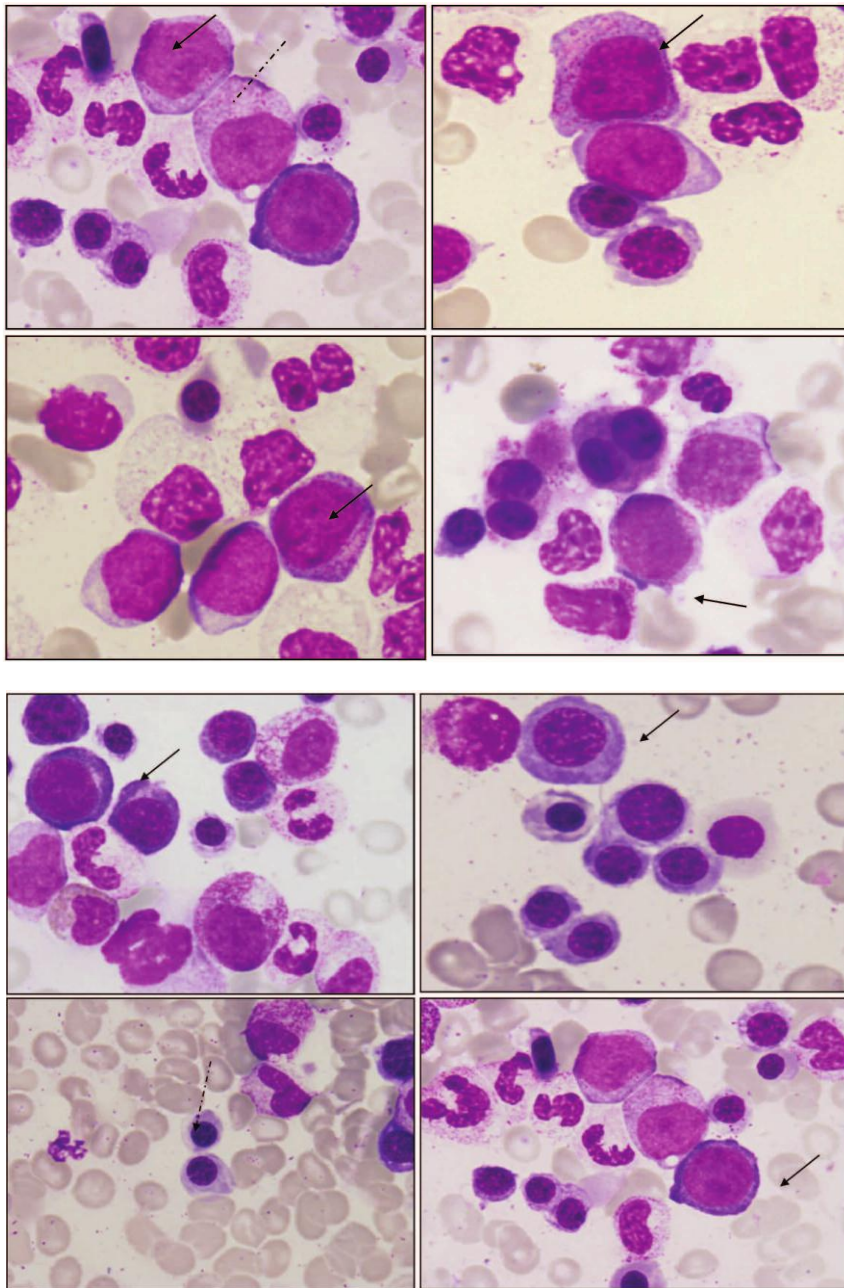
but also has a prognostic role in low-risk MDS patients. In this regard, Pseudo-Pelger-Huët anomaly in neutrophils and micromegakaryocytes has been correlated with overall survival.<sup>17,24</sup> Besides, several investigators consider that cases with multilineage dysplasia have a less favorable prognosis than those with only dyserythropoietic dysplasia.<sup>10,25-26</sup> The WHO classification therefore separated cases with

**Table 3. Statistical analyses of interobserver degree of agreement regarding morphological features.**

$\kappa$ (P value)		$\kappa$ (P value)		ICC
<b>Blasts in peripheral blood (%)</b>				
0	0.37 ( $P = 0.204$ )			
$\leq 1$	0.09 ( $P = 0.479$ )			
$> 1$	0.37 ( $P = 0.009$ )			
Overall kappa	0.30 ( $P = 0.002$ )			
As a continuous variable				0.82
<b>Blasts in bone marrow (%)</b>				
Percentage		Percentage		
$\leq 2$	0.50 ( $P = 0.002$ )	$< 5$	0.72 ( $P < 0.001$ )	
$> 2$ to $< 5$	0.28 ( $P = 0.065$ )	5-9	0.26 ( $P = 0.071$ )	
5-9	0.29 ( $P = 0.048$ )	$\geq 10$	0.65 ( $P < 0.001$ )	
$\geq 10$	0.60 ( $P < 0.001$ )	Overall	0.57 ( $P < 0.001$ )	
Overall	0.42 ( $P < 0.001$ )			
As a continuous variable				0.95
<b>Bone marrow ring sideroblasts (%)</b>				
Percentage				
$< 15$	0.82			
$\geq 15$	0.82			
Overall	0.82 ( $P < 0.001$ )			
As a continuous variable				0.96
<b>Bone marrow granulocytic dysplasia (%)</b>				
Percentage		Percentage		
$< 10$	0.39 ( $P = 0.009$ )	$< 10$	0.40 ( $P = 0.009$ )	
10-39	0.32 ( $P = 0.06$ )	$> 10$	0.40 ( $P = 0.43$ )	
$\geq 40$	0.50 ( $P = 0.04$ )			
Overall	0.41 ( $P < 0.001$ )	Overall	0.40 ( $P = 0.04$ )	
As a continuous variable				0.89
<b>Bone marrow megakaryocytic dysplasia (%)</b>				
Percentage		Percentage		
$< 10$	0.49 ( $P = 0.004$ )	$< 10$	0.49 ( $P = 0.004$ )	
10-39	0.22 ( $P = 0.21$ )	$> 10$	0.49 ( $P = 0.12$ )	
$\geq 40$	0.56 ( $P = 0.005$ )			
Overall	0.43 ( $P < 0.001$ )	Overall	0.49 ( $P < 0.001$ )	
As a continuous variable				0.91
<b>Bone marrow erythroid dysplasia (%)</b>				
Percentage		Percentage		
$< 10$	0.19 ( $P = 0.21$ )	$< 10$	0.19 ( $P = 0.21$ )	
10-39	0.04 ( $P = 0.83$ )	$> 10$	0.19 ( $P = 0.78$ )	
$\geq 40$	0.15 ( $P = 0.47$ )			
Overall	0.11 ( $P = 0.08$ )	Overall	0.19 ( $P = 0.49$ )	
As a continuous variable				0.75
<b>WHO 2008 subtype</b>				
RCUD	0.51 ( $P < 0.001$ )			
RARS	0.26 ( $P = 0.09$ )			
RCMD	0.46 ( $P = 0.01$ )			
RAEB-1	0.29 ( $P = 0.05$ )			
RAEB-2	0.60 ( $P < 0.001$ )			
MDS-U	0.01 ( $P = 0.97$ )			
Overall	0.43 ( $P < 0.001$ )			

ICC: intraclass correlation coefficient;  $\kappa$ : generalized kappa statistic for multiple raters; RCUD: refractory cytopenia with unilineage dysplasia; RARS: refractory anemia with ring sideroblasts; RCMD: refractory anemia with multilineage dysplasia; RAEB-1: refractory anemia with excess blasts-1; RAEB-2: refractory anemia with excess blasts-2; MDS-U: myelodysplastic syndrome-unclassified.





**Figure 1.** The presence of granulated blast cells (arrows) makes the distinction between blast cells and promyelocytes (discontinuous arrow) difficult so that the number of blast cells may differ and the same patient may be classified as having MDS with or without excess of blasts.

**Figure 2.** Evaluation of dysplastic features in erythropoiesis such as megaloblastoid changes (arrows) and cytoplasmic changes (discontinuous arrow) is poorly reproducible explaining why the agreement between observers in the evaluation of dyserythropoiesis is not good.

refractory anemia in the previous French-American-British classification into two categories depending on the presence or absence of multilineage dysplastic features. This distinction has been criticized by some groups,<sup>67</sup> because the assessment of the features of dysplasia is not always easy in clinical practice because of the lack of definition of objective parameters. Poor technical quality of the specimen could also be an obstacle to an accurate diagnosis of dysplasia. In our work we found a moderate but significant interobserver agreement for megakaryocytic and granulocytic dysplasia and a poor agreement for erythroid dysplasia. This is probably because features of dysgranulopoiesis (pseudo-Pelger-Huët, hypogranularity) and dysmegakaryopoiesis (micromegakaryocytes, non-

lobulated nuclei and multiple widely separated nuclei) are less subjective and more reproducible than features of erythroid dysplasia.

The WHO classification includes a uniform threshold of 10% for dysplasia in each myeloid lineage; however, as discussed by Parmentier *et al.*,<sup>27</sup> this level of dysplasia is highly questionable and is particularly low in the megakaryocytic lineage in which the number of cells analyzed is smaller than in the other series. We analyzed the interobserver concordance with a cutoff point of 40% dysplastic cells and found that the agreement improved in the megakaryocytic and granulocytic lineages but not in the erythroid lineage. These results agree with those of Matsuda *et al.*<sup>17</sup> and Germing *et al.*<sup>28</sup> who proposed raising

the threshold of dysmegakaryopoiesis from 10 to 40%.

The prognostic value of the WHO classification is already known.<sup>7,9,10,12</sup> Howe *et al.*<sup>13</sup> analyzed the reproducibility of the 2001 WHO classification showing a 92% of agreement among three reviewers. Their discrepancies were related to the identification and enumeration of dyspoiesis in neutrophils and megakaryocytes and in those cases with borderline blast percentages.

Recently, Naqvi *et al.*<sup>14</sup> analyzed the discrepancies in morphological diagnosis of MDS between referral and tertiary centers showing differences in 12% of the patients. They did not, however, analyze the causes of the discrepancy.

The current work, although reviewing a rather limited number of samples, is the first to analyze the correlation between observers of the 2008 WHO morphological criteria. We found a nearly moderate and significant concordance regarding the definition of 2008 WHO MDS subtypes ( $\kappa$ , 0.43;  $P < 0.001$ ). Most differences concerned the distinction of unilineage and multilineage dysplasia; consequently some patients were classified as having refractory anemia with ring sideroblasts or refractory cytopenia with multilineage dysplasia depending on the recognition of dysplasia in one or more myeloid lineages. As previously described by Howe *et al.*,<sup>13</sup> we also had difficulties in assigning MDS subtypes in those cases with borderline blast cell percentages. In fact, a substantial agreement was obtained only in cases with less than 2% or more than 10% of blast cells in the bone marrow.

To sum up, the WHO 2008 classification can be applied with a moderate interobserver concordance. Discrepancies are frequent and may have a potential negative impact on the assignment of prognosis and therapy planning in the individual patient. The degree of agreement could be improved if the criteria for features for

dyserythropoiesis were to be refined. Future studies should evaluate the potential increment in the threshold for considering a cell lineage as dysplastic in order to enhance the recognition of multilineage dysplasia. Finally, the diagnosis of MDS is complex, requires an accurate application of the WHO criteria, and should be performed by experienced morphologists. Despite all those measures, it must be highlighted that the value of cytomorphology alone for the classification of MDS is limited. In this regard, the development, standardization, and incorporation into our daily practice of other techniques, such as flow cytometry and molecular studies,<sup>29-31</sup> will likely allow us to diagnose, characterize, and classify this heterogeneous group of myeloid neoplasms better in the near future.

### Funding

This work was supported in part by research funding from "RTICC" (Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer, RD06/0020/0031, RD07/0020/2004), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain (FI07/00107; PI07/1009 and PI11/02010); SGR 541 ("Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca", "Departament d'Innovació, Universitats i Empresa") y COST-European Genetic and Epigenetic Study on AML and MDS (BM080).

### Acknowledgments

The authors wish to thank Dr. Ignacio Lorenzo for his helpful comments on statistical issues and Luis Benlloch for data management.

### Authorship and Disclosures

Information on authorship, contributions, and financial & other disclosures was provided by the authors and is available with the online version of this article at [www.haematologica.org](http://www.haematologica.org).

## References

- Tefferi A, Vardiman JW. Myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med.* 2009;361(19):1872-85.
- 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.
- Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. World Health Organization Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press: Lyon, France, 2001;1-351.
- Bruning RD, Orazi A, Germing U, LeBeau MM, Porwit A, Baumann I, et al. Myelodysplastic syndromes/neoplasms overview. In: Jaffe Es, Harris NL, Swerdlow SH, Vardiman JW, editors. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press: 2008; 88-93.
- Vardiman J, Thiele J, Arber D, Bruning R, Borowitz M, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 2009;114 (5):937-51.
- Greenberg P, Anderson J, de Witte T, Estey E; Fenoux P, Gupta P, et al. Problematic WHO reclassification of myelodysplastic syndromes. Members of the International MDS Study Group. *J Clin Oncol.* 2000; 18(19):3447-52.
- Nosslinger T, Reisner R, Koller E, Gruner H, Tuchler H, Nowotny H, et al. Myelodysplastic syndromes, from French-American-British to World Health Organization: comparison of classifications on 431 unselected patients from a single institution. *Blood.* 2001;98(10):2935-41.
- Greenberg PL, Attar E, Bennett J, Bloomfield C, De Castro C, Deeg J, et al. NCCN clinical practice guidelines in oncology: myelodysplastic syndromes. *J Natl Compr Canc Netw.* 2011;9(1):30-56.
- Germing U, Gattermann N, Strupp C, Aivado M, Aul C. Validation of the WHO proposal for a new classification of primary myelodysplastic syndromes: a retrospective analysis of 1600 patients. *Leuk Res.* 2000;24(12):983-92.
- Germing U, Strupp C, Kuendgen A, Isa S, Knipp S, Hildebrandt B, et al. Prospective validation of the WHO proposals for the classification of myelodysplastic syndromes. *Haematologica.* 2006;91(12):1596-604.
- Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, Della Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, et al. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol.* 2007;25(23):3503-10.
- Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, DellaPorta MG, Pascutto C, Invernizzi R, et al. Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision making. *J Clin Oncol.* 2005;23(30):7594-03.
- Howe RB, Porwit-MacDonald A, Wanat R, Tehranchi R, Hellström-Lindberg E. The WHO classification of MDS does make a difference. *Blood.* 2004;103(9):3265-70.
- Naqvi K, Jabbour E, Bueso-Ramos C, Pierce S, Borthakur G, Estrov Z, et al. Implications of discrepancy in morphologic diagnosis of myelodysplastic syndrome between referral and tertiary care centres. *Blood.* 2011;118(17):4690-93.
- Mufti GJ, Bennett JM, Goasguen J, Bain BJ, Baumann I, Bruning R, et al. Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome: International Working Group on Morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposals for the definition and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts. *Haematologica.* 2008;93(11):1712-7.
- McGraw KO, Wong SP. Forming inferences about some intraclass correlation coefficients. *Psychol Methods.* 1996;1:30-46.
- Matsuda A, Germing U, Jinnai I, Iwanaga M, Misumi M, A Kuendgen A, et al. Improvement of criteria for refractory

- cytopenia with multilineage dysplasia according to the WHO classification based on prognostic significance of morphological features in patients with refractory anemia according to the FAB classification. *Leukemia*. 2007;21(4):678-86.
18. Anthony J, Viera, MD; Joanne M. Garrett, PhD (2005). Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. *Fam Med* 2005;37(5):360-63.
  19. Wang H, Wang XQ, Xu XP, Lin GW. Bone marrow blasts level predicts prognosis in patients with refractory cytopenia with multilineage dysplasia. *Eur J Haematol*. 2009;83(6):550-8.
  20. Bennett JM. A Comparative review of classification systems in myelodysplastic syndromes (MDS). *Semin Oncol*. 2005;32(5): S3-S10.
  21. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, et al. Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R) for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012;120(12):2454-65.
  22. Kern W, Haferlach C, Schnittger S, Haferlach T. Clinical utility of multiparameter flow cytometry in the diagnosis of 1013 patients with suspected myelodysplastic syndrome. *Cancer*. 2010;116(19):4549-63.
  23. Knipp S, Strupp C, Gattermann N, Hildebrandt B, Schapira M, Giagounidis A, et al. Presence of peripheral blasts in refractory anemia and refractory cytopenia with multilineage dysplasia predicts an unfavourable outcome. *Leuk Res*. 2008;32(1):33-7.
  24. Matsuda A, Jinnai I, Yagasaki F, Kusumoto S, Minamihisamatsu M, Honda S, et al. Refractory anemia with severe dysplasia: clinical significance of morphological features in refractory anemia. *Leukemia*. 1998;12(4):482-5.
  25. Dunkley SM, Manoharan A, Kwan YL. Myelodysplastic syndromes: prognostic significance of multilineage dysplasia in patients with refractory anemia or refractory anemia with ringed sideroblasts. *Blood*. 2002;99(10):3870-1.
  26. Bennett JM, Brunning R, Vardiman JW. Myelodysplastic syndromes: from French-American-British to World Health Organization: a commentary. *Blood*. 2002;99(8):3074-5.
  27. Parmentier S, Schetelig M, Lorenz K, Kramer M, Ireland R, Schuler U, et al. Assessment of dysplastic hematopoiesis: lessons from healthy bone marrow donors. *Haematologica*. 2012;97(5):723-30.
  28. Germing U, Strupp C, Giagounidis A, Haas R, Gattermann N, Starke C, et al. Evaluation of dysplasia through detailed cytomorphology in 3156 patients from the Düsseldorf Registry on myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2012;36(6):727-34.
  29. van Dongen JJ, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VH, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012;26(9):1908-75.
  30. Cazzola M. Risk assessment in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2011;96(3):349-51.
  31. Felicitas Thol F, Kade S, Schlarman C, Löffeld P, Morgan M, Krauter J, et al. Frequency and prognostic impact of mutations in SRSF2, U2AF1, and ZRSR2 in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012;119(15):3578-84.

## SEGUNDO TRABAJO

### ***Considering Bone Marrow Blasts From Nonerythroid Cellularity Improves the Prognostic Evaluation of Myelodysplastic Syndromes.***

La clasificación OMS de los SMD se basa fundamentalmente en la cifra de blastos en MO. Establecer de forma adecuada el porcentaje de blastos en MO es crucial ya que tiene un importante valor pronóstico en esta enfermedad. En la elaboración de la clasificación OMS 2008 se produjo una falta de consenso en el comité de expertos sobre cómo establecer el porcentaje de blastos en MO de aquellos pacientes con SMD e incremento de la serie eritroide (SMD-E), en base a la totalidad celular (TC) o en base al compartimento celular no eritroide (CNE).

El objetivo de este estudio fue establecer el mejor método para calcular el porcentaje de blastos en los SMD, en base a la TC o en base a la CNE, en una serie amplia de pacientes con SMD.

#### Pacientes y métodos

Se estudiaron 3692 pacientes diagnosticados de SMD entre 1972 y 2015 e incluidos en el registro del GESMD. De todos ellos se disponía de información completa sobre las características morfológicas (entre ellas, el porcentaje de eritroblastos y porcentaje de blastos de la TC), citogenéticas y de seguimiento clínico. Los pacientes cumplían criterios de SMD de acuerdo a la clasificación OMS 2008. Se excluyeron pacientes con diagnóstico de SMD secundario, LMMC y NMP/SMD.

Los pacientes con una cifra de eritroblastos igual o superior al 50% fueron considerados SMD con incremento de serie eritroide (SMD-E).

El porcentaje de blastos de la celularidad no eritroide se calculó con la fórmula:

$$[\% \text{ Blastos de la TC} / (100 - \% \text{ Eritroblastos})] \times 100$$

La comparación de proporciones y rangos de las variables se llevó a cabo con los tests  $\chi^2$  o U de Mann-Whitney. No se realizaron ajustes de los valores de *P*. Las curvas de supervivencia se construyeron mediante el método de Kaplan-Meier para el intervalo entre la fecha del diagnóstico y la fecha de muerte o última visita (SG), y se compararon con el test de log-rank. Los pacientes que recibieron alo-TPH o



quimioterapia tipo LMA fueron censurados en el momento de recibir dichos tratamientos (el que aconteciera primero). El análisis multivariante se realizó con el método de regresión de Cox. Se empleó el C-índice para evaluar cuál de los dos métodos para contar los blastos presentaba el mayor valor pronóstico para SG.

## Resultados

### *Comparación de los SMD con y sin incremento de la serie eritroide.*

- De los 3692 pacientes, el 12.6% (N=465) presentaba incremento de la serie eritroide. Los 3227 pacientes sin incremento de la serie eritroide fueron considerados grupo control.
- Aunque en los pacientes con SMD con <50% de eritroblastos la media del porcentaje de blastos fue significativamente mayor que en los SMD-E, no se observaron diferencias en SG entre ambos grupos de pacientes.
- Al aplicar la clasificación OMS 2008, es decir contar los blastos de la TC, el diagnóstico de AREB-2 en pacientes con SMD-E es prácticamente imposible (limitado sólo a pacientes con 5-<20% blastos en SP o con bastones de Auer), ya que los pacientes con  $\geq 10\%$  blastos en MO, presentan  $\geq 20\%$  blastos de la CNE y, por tanto, cumplen criterios de eritroleucemia.

### *Aplicar la clasificación OMS enumerando la cifra de blastos de la CNE mejora la evaluación pronóstica de los pacientes con SMD-E.*

- Al realizar el recuento de blastos de la CNE, un 22% de pacientes diagnosticados de SMD con <5% de blastos de la TC, fueron reclasificados en categorías con exceso de blastos.
- La SG de estos pacientes que cambiaron a categorías de más alto riesgo fue significativamente inferior a la de los pacientes que no cambiaron de categoría y a la de los pacientes en categorías con <5% de blastos del grupo control.

### *Influencia del método de contar los blastos en la aplicación del IPSS para la evaluación pronóstica de los SMD-E.*

- Al aplicar la recomendación de la clasificación OMS 2008 de contar los blastos de la TC, no es posible catalogar ningún paciente con SMD-E en el grupo de alto riesgo del

IPSS, ya que los pacientes con  $\geq 10\%$  blastos en MO cumplen criterios de eritroleucemia y por tanto no candidatos a ser evaluados con este índice. Al aplicar el IPSS contando los blastos de la CNE se generaron 4 grupos de pacientes con diferencias en SG.

- Un 11% de pacientes catalogados en categorías de más bajo riesgo del IPSS (bajo, intermedio-1) cuando se contaban los blastos de la TC, fueron reclasificados en categorías de más alto riesgo (intermedio-2, alto) al contar los blastos de la CNE.
- La SG de estos pacientes que cambiaron a categorías de más alto riesgo fue significativamente inferior a la de los pacientes que no cambiaron de categoría y a la de los pacientes en categorías con  $< 5\%$  de blastos del grupo control.
- Contar los blastos de la CNE permite la detección de un grupo de pacientes catalogados como de bajo riesgo con la recomendación actual, pero que presentan un comportamiento clínico más cercano a los pacientes de alto riesgo.

*Aplicar la clasificación OMS enumerando la cifra de blastos de la CNE mejora la evaluación pronóstica de todos los pacientes con SMD.*

- La media del porcentaje de eritroblastos en los SMD-E fue de 58% y en los SMD sin incremento de serie eritroide fue del 30%. Por lo tanto, enumerar los blastos de la CNE sólo en los MDS-E podría infravalorar el peso pronóstico de los blastos en el resto de SMD.
- Al estudiar los 3692 pacientes de la serie completa, un 12% de pacientes clasificados en categorías OMS con  $< 5\%$  de blastos al contar blastos de la TC, fueron clasificados en categorías con exceso de blastos al contar los blastos de la CNE. La SG de estos pacientes que cambiaron a categorías de más alto riesgo fue significativamente inferior a la de los pacientes que no cambiaron de categoría.
- La clasificación OMS con el recuento de blastos de la CNE mantuvo su valor pronóstico independiente para SG en un análisis multivariante de regresión logística en el que se incluyeron además el resto de variables con valor pronóstico en el análisis univariante.
- La OMS considerando los blastos de la CNE mostró una mejor capacidad predictiva de mortalidad, con un C-Index ligeramente mayor que la OMS con blastos de la TC.
- Al estudiar los 3692 pacientes de la serie completa, un 8.4% de pacientes catalogados en categorías de más bajo riesgo del IPSS (bajo, intermedio-1) al contar los blastos de

la TC, fueron reclasificados en categorías de más alto riesgo (intermedio-2, alto) al contar los blastos de la CNE. La SG de estos pacientes que cambiaron a categorías de más alto riesgo fue significativamente inferior a la de los pacientes que no cambiaron de categoría.

- El IPSS considerando los blastos de la CNE mantuvo su valor pronóstico independiente para SG en un análisis multivariante de regresión logística en el que se incluían además el resto de variables con valor pronóstico en el análisis univariante.

## Considering Bone Marrow Blasts From Nonerythroid Cellularity Improves the Prognostic Evaluation of Myelodysplastic Syndromes

Leonor Arenillas, Xavier Calvo, Elisa Luño, Leonor Senent, Esther Alonso, Fernando Ramos, María Teresa Ardanaz, Carme Pedro, Mar Tormo, Víctor Marco, Julia Montoro, María Díez-Campelo, Salut Brunet, Beatriz Arrizabalaga, Blanca Xicoy, Rafael Andreu, Santiago Bonanad, Andrés Jerez, Benet Nomdedeu, Ana Ferrer, Guillermo F. Sanz, and Lourdes Florensa

Author affiliations appear at the end of this article.

Published online ahead of print at [www.jco.org](http://www.jco.org) on July 5, 2016.

Written on behalf of the Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos.

Supported in part by Grant No. RD12/0036/0044 from Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (FEDER) and Grant No. 2014/SGR585 from Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca of Generalitat de Catalunya.

L.A. and X.C. contributed equally to this work. G.F.S. and L.F. contributed equally to this work.

Presented in part at the 13th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes, Washington, DC, April 29–May 2, 2015, and at the 57th American Society of Hematology Annual Meeting, Orlando, FL, December 5–8, 2015.

Authors' disclosures of potential conflicts of interest are found in the article online at [www.jco.org](http://www.jco.org). Author contributions are found at the end of this article.

Corresponding author: Leonor Arenillas, MD, Hospital del Mar Research Institute, Paseo Marítimo, 25, 08003 Barcelona, Spain; e-mail: [larenillas@parcdesalutmar.cat](mailto:larenillas@parcdesalutmar.cat).

© 2016 by American Society of Clinical Oncology

0732-183X/16/3427w-3284w/\$20.00

DOI: 10.1200/JCO.2016.66.9705

### ABSTRACT

#### Purpose

WHO classification of myeloid malignancies is based mainly on the percentage of bone marrow (BM) blasts. This is considered from total nucleated cells (TNCs), unless there is erythroid-hyperplasia (erythroblasts  $\geq 50\%$ ), calculated from nonerythroid cells (NECs). In these instances, when BM blasts are  $\geq 20\%$ , the disorder is classified as erythroleukemia, and when BM blasts are  $< 20\%$ , as myelodysplastic syndrome (MDS). In the latter, the percentage of blasts is considered from TNCs.

#### Patients and Methods

We assessed the percentage of BM blasts from TNCs and NECs in 3,692 patients with MDS from the Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos, 465 patients with erythroid hyperplasia (MDS-E) and 3,227 patients without erythroid hyperplasia. We evaluated the relevance of both quantifications on classification and prognostication.

#### Results

By enumerating blasts systematically from NECs, 22% of patients with MDS-E and 12% with MDS from the whole series diagnosed within WHO categories with  $< 5\%$  BM blasts, were reclassified into higher-risk categories and showed a poorer overall survival than did those who remained in initial categories ( $P = .006$  and  $P = .001$ , respectively). Following WHO recommendations, refractory anemia with excess blasts (RAEB)-2 diagnosis is not possible in MDS-E, as patients with 10% to  $< 20\%$  BM blasts from TNCs fulfill erythroleukemia criteria; however, by considering blasts from NECs, 72 patients were recoded as RAEB-2 and showed an inferior overall survival than did patients with RAEB-1 without erythroid hyperplasia. Recalculating the International Prognostic Scoring System by enumerating blasts from NECs in MDS-E and in the overall MDS population reclassified approximately 9% of lower-risk patients into higher-risk categories, which indicated the survival expected for higher-risk patients.

#### Conclusion

Regardless of the presence of erythroid hyperplasia, calculating the percentage of BM blasts from NECs improves prognostic assessment of MDS. This fact should be considered in future WHO classification reviews.

*J Clin Oncol* 34:3284-3292. © 2016 by American Society of Clinical Oncology

### INTRODUCTION

Current WHO classification of myelodysplastic syndromes (MDS) is based mainly on the percentage of blasts from total bone marrow (BM) nucleated cells (TNCs).<sup>1-5</sup> In MDS with  $\geq 50\%$  BM erythroblasts (MDS-E) there is no consensus on the best method for enumerating BM blasts—from TNCs or from nonerythroid

nucleated cells (NECs). Despite the lack of agreement, WHO recommendation is to consider blasts from TNCs once the diagnosis of erythroleukemia is ruled out, which implies the presence of  $\geq 20\%$  BM blasts from NECs. Patients with MDS-E represent approximately 15% of patients with MDS.<sup>6</sup> Possible diagnoses when erythroid precursors are  $\geq 50\%$  of BM nucleated cells are summarized in Appendix Table A1 (online only).

Proportion of BM blasts is a major prognostic factor for outcome in patients with MDS and is used for individual risk assessment and therapy planning.<sup>7,8</sup> The main aim of our study was to address the best method for calculating the percentage of BM blasts to derive its prognostic usefulness in a large series of patients with MDS.

## PATIENTS AND METHODS

### Patients

At the completion of this report, the database of the Spanish group on MDS—Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos (GESMD)—contained complete cytomorphologic, clinical, and follow-up information on 3,692 patients diagnosed between 1972 and 2015 according to 2008 WHO criteria.<sup>1</sup> Patients with secondary MDS, chronic myelomonocytic leukemia, or unclassified myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms were excluded. Patients with  $\geq 50\%$  erythroblasts were defined as having MDS-E. Percentage of BM blasts from NECs was calculated as follows:

$$[\% \text{ BM blasts from TNCs} / (100 - \% \text{ BM erythroblasts})] \times 100.$$

Patients provided written informed consent. The study was conducted according to the Declaration of Helsinki and was approved by the ethical committee of GESMD.

### Statistical Analysis

Comparisons of proportions and ranks of variables were performed by using  $\chi^2$  or Mann-Whitney *U* tests, as appropriate. No adjustments to *P* values were made for multiple tests. Survival curves were constructed by using the Kaplan-Meier method from the interval from diagnosis to last contact or death (overall survival [OS]) and compared using the log-rank test. Patients undergoing allogeneic stem cell transplantation or acute myeloid leukemia (AML)-type chemotherapy were censored at date of starting chemotherapy or transplantation, whichever came first. Differences were considered statistically significant when *P* values were  $< .05$  in a two-tailed test. Multivariable analysis was performed by using Cox proportional hazards regression method, and C-index was implemented to assess the method for calculating BM blast percentage with the best prognostic value for OS.

## RESULTS

### Clinical, Pathologic, and Cytogenetic Features of MDS-E and of MDS With $< 50\%$ Erythroblasts

Overall, 465 patients had MDS-E (12.6%) and 3,227 patients with MDS had  $< 50\%$  erythroblasts (control group). Patient characteristics are summarized in Table 1. Distribution of WHO subtypes using both approaches for enumerating BM blasts is depicted in Table 2, Appendix Table A2 (online only), and Appendix Table A3 (online only). Distribution of International

**Table 1.** Main Demographic, Clinical, and Biologic Characteristics at Diagnosis of 3,692 Patients With MDS According to the Percentage of ENCs in Bone Marrow

Characteristic	MDS-E (n = 465)	MDS With $< 50\%$ ENCs (n = 3,227)	<i>P</i>
Median age (range), years	74.09 (26-94)	75.28 (20-101)	.027
< 60, No. (%)	59 (12.7)	361 (11.2)	
$\geq 60$ , No. (%)	406 (87.3)	2866 (88.8)	
Male sex, No. (%)	290 (62)	1882 (58.3)	.098
Median hemoglobin (range), g/L	9.7 (4.8-15.30)	10 (3-16.5)	.001
Median WBC (range), $\times 10^9/L$	4.2 (0.8-16.2)	4.2 (0.4-46.0)	.209
Median neutrophil count (range), $\times 10^9/L$	2.14 (0.06-12.85)	2.08 (0.01-13.8)	.999
< $0.5 \times 10^9/L$ , No. (%)	28 (6)	212 (6.6)	
$\geq 0.5 \times 10^9/L$ , No. (%)	437 (94)	3015 (93.4)	
Median platelet count (range), $\times 10^9/L$	182 (8-1,131)	152 (1-1,161)	$< .001$
< $30 \times 10^9/L$ , No. (%)	19 (4.1)	159 (4.9)	
$\geq 30 \times 10^9/L$ , No. (%)	446 (95.9)	3,068 (95.1)	
Mean erythroblasts (SD), %	58 (6.9)	30 (11.1)	$< .001$
Median dyserythropoiesis (range), %	40 (0-100)	32.29 (0-100)	$< .001$
Median dysgranulopoiesis (range), %	10 (0-100)	36.40 (0-100)	$< .001$
Median dysthrombopoiesis (range), %	10.5 (0-100)	31.80 (0-100)	$< .001$
Mean BM blasts (SD), %	1.82 (2.1)	3.99 (4.6)	$< .001$
Median LDH serum level (range), $\mu/L$	323 (54-1,807)	320 (0-4,502)	.615
Karyotype, abnormal/total cases, %	132 of 465 (28.4)	1,110 of 3,227 (34.4)	.01
IPSS cytogenetic group, No. (%)			.542
Low	376 (80.9)	2,563 (79.4)	
Intermediate	48 (10.3)	391 (12.1)	
High	41 (8.8)	273 (8.5)	
Treatments, No. (%)			
Azacitidine	58 of 465 (12.5)	457 of 3,227 (14.2)	.326
AML-like chemotherapy	14 of 465 (3)	153 of 3,227 (4.7)	.093
Allo-SCT	11 of 465 (2.4)	93 of 3,227 (2.9)	.529

NOTE. Estimated median follow-up, as calculated by reverse Kaplan-Meier method, was 42.19 months (95% CI, 40 to 44.4 months); 43.76 months (95% CI, 36.4 to 51.1 months) for MDS-E and 41.79 months (95% CI, 39.5 to 44 months) for MDS with  $< 50\%$  ENCs. Of 3,692 patients, 1,627 (44%) had died. Median OS, 58.4 months; 60.4 months for MDS-E and 57.8 months for MDS with  $< 50\%$  ENCs.

Abbreviations: AML, acute myeloid leukemia; BM, bone marrow; ENCs, erythroid nucleated cells; IPSS, International Prognostic Scoring System; LDH, lactate dehydrogenase; MDS, myelodysplastic syndromes; MDS-E, MDS with  $\geq 50\%$  BM erythroblasts; SCT, stem cell transplantation; SD, standard deviation; WBC, white blood cell.

Prognostic Scoring System (IPSS) categories using both methods is shown in Table 3 and Appendix Table A4 (online only).

### MDS-E and MDS Had Similar Survival

Although a higher BM blast percentage was observed in patients with < 50% erythroblasts (mean, 1.8 v 3.99;  $P < .001$ ), OS of both MDS-E and control groups was similar (median OS, 60.4 v 57.8 months;  $P = .31$ ; Appendix Fig A1, online only). Lower BM blast percentage observed in MDS-E was an expected finding, because those patients with MDS-E with 10% to < 20% of BM blasts from TNCs were diagnosed with erythroleukemia and, thus, were not included in this report.

### Considering Percentage of BM Blasts From NECs Rather Than From TNCs Improves Risk Assessment of MDS-E

When BM blast percentage was considered from NECs, 89 (22%) of 406 patients with MDS-E who were diagnosed within WHO subtypes without excess blasts (EB) were reclassified into higher-risk WHO categories—77 patients as refractory anemia with EB type 1 (RAEB-1) and 12 as RAEB-2. OS of these 89 upgraded patients was significantly shorter than that observed in 316 patients who remained in WHO subtypes without EB (median OS, 41.1 v 80.2 months;  $P = .006$ ; Fig 1A). Similarly, patients reclassified as RAEB subtypes showed a lower OS than the 2,277 patients with MDS without EB and with < 50% erythroblasts (median OS, 41.1 v 76.1 months;  $P = .001$ ; Fig 1B). These differences in OS remained statistically significant for the 77 patients who were upgraded to RAEB-1 (median OS, 43.7 v 80.2 months for patients with MDS-E without EB;  $P = .027$ ; and 43.7 v 76.1 months for patients with MDS without EB and with < 50% erythroblasts;  $P = .011$ ) as well as for the 12 patients reclassified as RAEB-2 (median OS, 31.5 v 80.2 months for patients with MDS-E without EB;  $P = .002$ ; and 31.5 v 76.1 months for patients with MDS without EB and with < 50% BM erythroblasts;  $P = .011$ ).

All patients with  $\geq 50\%$  erythroblasts and with 10% to < 20% of BM blasts from TNCs fulfill criteria for erythroleukemia; therefore, with the current WHO recommendation, diagnosis of RAEB-2 is not possible in this subset of patients. By estimating the BM blast percentage from NECs, there were 72 patients with

RAEB-2: all 60 previous patients diagnosed with RAEB-1 and 12 patients classified in categories without EB (nine patients with refractory cytopenia with multilineage dysplasia, one with MDS with isolated 5q deletion, and two with refractory anemia with ring sideroblasts) by current WHO criteria. These 72 patients recoded to RAEB-2 showed a significantly poorer OS than did the 492 patients with RAEB-1 and with < 50% BM erythroblasts (median OS, 28.9 v 34.9 months;  $P = .037$ ; Fig 1C), but had a better OS than did the 458 patients with RAEB-2 and with < 50% BM erythroblasts (median OS, 28.9 v 13.4 months;  $P = .025$ ). These differences in OS could be explained, at least in part, by the different BM blast percentage mean considered from NECs in the three groups of patients (9.63% and 18.83% for patients with RAEB-1 and RAEB-2 with < 50% erythroblasts, respectively, and 14.25% for patients with MDS-E who were recoded as RAEB-2;  $P < .001$ ). Of interest, OS of patients with RAEB-1 and with < 50% erythroblasts was longer than that of patients recoded as RAEB-2 by assessing blasts from NECs despite the mean percentage of blasts of the former group being higher when BM blast percentage was considered from TNCs (6.76% v 5.80%;  $P < .001$ ) according to WHO criteria. Mean and standard deviation of BM blast percentage from TNCs and NECs by WHO subtypes are given in Appendix Table A5 (online only).

Finally, by counting BM blasts from NECs, patients recoded as RAEB-2 showed a significantly lower OS than did those recoded as RAEB-1 (median OS, 28.9 v 43.7 months;  $P = .008$ ).

### Influence of the Method of Enumerating BM Blasts in Prognostication of MDS-E by IPSS

We assessed OS predicted by IPSS in patients with MDS-E by counting BM blast percentage from TNCs (Fig 2A) and from NECs (Fig 2B). It should be stressed that, by using current WHO recommendation (counts performed from TNCs), it is not possible to assign patients with MDS-E to the highest-risk IPSS category because all patients with BM blasts  $\geq 10\%$  are diagnosed with erythroleukemia and are thus excluded from this scoring system. However, when blasts were calculated from NECs, four groups with significant differences in OS were observed: median OS, 83.2 months for low risk; 52.8 months for intermediate 1 risk;

**Table 2.** Reclassification of 2008 WHO Subtypes Considering Bone Marrow Blasts From TNCs or From NECs in MDS With  $\geq 50\%$  Bone Marrow Erythroblasts

Subtype Considering Blasts From TNCs	Subtype Considering Blasts From NECs							Total
	RCUD	RARS	RCMD	5q-	MDS-U	RAEB-1	RAEB-2	
RCUD	36	0	0	0	0	6	0	42
RARS		119	0	0	0	18	2	139
RCMD			147	0	0	44	9	200
5q-				9	0	2	1	12
MDS-U					5	7	0	12
RAEB-1						*	60	60
RAEB-2						†		0
Total	36	119	147	9	5	77	72	465

Abbreviations: 5q-, myelodysplastic syndromes with isolated del(5q); MDS-U, unclassifiable myelodysplastic syndromes; NEC, nonerythroid cell; RAEB-1, refractory anemia with excess blasts-1; RAEB-2, refractory anemia with excess blasts-2; RARS, refractory anemia with ring sideroblasts; RCMD, refractory cytopenia with multilineage dysplasia; RCUD, refractory cytopenia with unilineage dysplasia; TNC, total nucleated cell.

\*All patients classified as RAEB-1 when considering blasts from TNCs were reclassified as RAEB-2 when considering blasts from NECs.

†In patients with  $\geq 50\%$  bone marrow erythroblasts, when blasts were enumerated from total bone marrow cellularity, none of the cases could be classified as RAEB-2 because these cases fulfilled the current WHO criteria for erythroleukemia.



**Table 3.** Reclassification of IPSS Categories Considering Bone Marrow Blasts From TNCs or From NECs in Myelodysplastic Syndromes With  $\geq 50\%$  Bone Marrow Erythroblasts

IPSS Category Considering Blasts From TNCs	IPSS Category Considering Blasts From NECs				Total
	Low	Intermediate-1	Intermediate-2	High	
Low	221	39	2	0	262
Intermediate-1		115	45	0	160
Intermediate-2			19	24	43
High				*	0
Total	221	154	66	24	465

Abbreviations: IPSS, International Prognostic Scoring System; NEC, non-erythroid cell; TNC, total nucleated cell.

\*In patients with  $\geq 50\%$  bone marrow erythroblasts, when blasts were enumerated from total bone marrow cellularity, none of the cases could be classified into high-risk IPSS category because all patients with bone marrow blasts  $\geq 10\%$  are diagnosed with erythroleukemia and thus excluded from this scoring system.

22.6 months for intermediate 2 risk; and 8.8 months for high risk ( $P < .001$ ). Of 422 patients, 47 (11%) with MDS-E who were classified in the lower-risk IPSS categories (low and intermediate 1) by current WHO criteria were reclassified into higher-risk categories when BM blasts were enumerated from NECs. OS of these 47 upgraded patients was significantly shorter than OS of patients who remained in the lower-risk categories (median OS, 28.9 and 80.6 months, respectively;  $P < .001$ ; Fig 2C). Thus, by counting BM blasts from NECs we were able to detect a group of patients labeled at present as having lower-risk disease but who presented an outcome much closer to that of higher-risk patients with MDS.

#### **Enumerating Blasts From NECs in the Whole Series Homogenizes the Diagnosis and Prognostic Evaluation of Patients Regardless of the Presence of Erythroid Hyperplasia**

Mean of BM erythroblasts in patients with MDS-E was 58% versus 30% in the control group ( $P < .001$ ); therefore, counting BM blast percentage from NECs only in patients with MDS-E could underestimate the real weight of blasts in patients without erythroid hyperplasia.

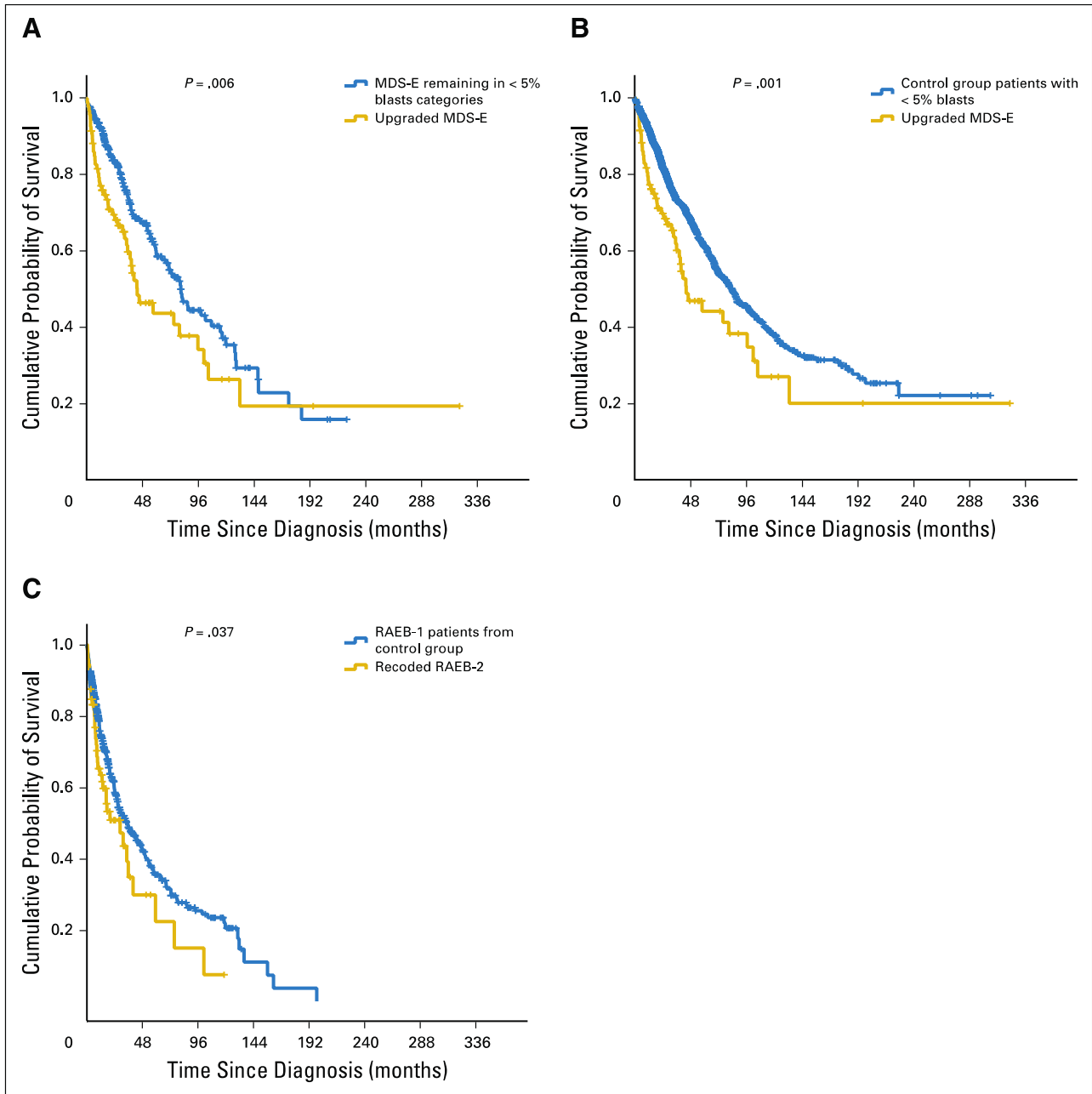
Thus, we finally reassigned 2008 WHO categories (recoded WHO) of all 3,692 patients with MDS by calculating BM blasts from NECs. With this methodology, 2,352 patients were placed in morphologic subtypes without EB (63.7%), 615 patients had RAEB-1 subtype (16.7%), 550 were RAEB-2 subtype (14.9%), and 175 were classified as AML (4.7%). Four groups of patients defined by this method had significantly different OS (median OS, 78.5 months; 45.9 months; 18.2 months; and 14 months, respectively;  $P < .001$ ). Of interest, no significant OS differences were observed in each of the new recoded WHO categories regardless of the presence of erythroid hyperplasia, even in the 175 patients with MDS who were upgraded to AML who achieved a similar survival to 56 patients who were diagnosed with erythroleukemia (median OS, 13.2 months and 14 months, respectively;  $P = .5$ ).

As observed in patients with MDS-E, when BM blast percentage was calculated from NECs, 330 (12%) of 2,682 patients diagnosed within WHO subtypes with  $< 5\%$  BM blasts were reclassified into WHO subtypes with EB, whereas no patient was

upgraded to AML. OS of these 330 upgraded patients was significantly shorter than that observed in 2,352 patients who remained in WHO subtypes without EB (median OS, 48.4 months  $\nu$  78.5 months;  $P = .001$ ). Moreover, 255 (46%) of 552 patients previously diagnosed with RAEB-1 were reallocated to the RAEB-2 category and achieved a significantly shorter OS than did those who remained in the initial category (median OS, 28.9 months  $\nu$  38.7 months;  $P = .006$ ).

IPSS cytogenetic risk classification distinguished three risk categories with significantly different OS in each of the recoded WHO subgroups—MDS without EB: 80.9 months, 68.2 months, and 32.8 months; RAEB-1: 58.5 months, 39.9 months, and 14.2 months; RAEB-2: 30.3 months, 15.2 months, and 7.5 months; AML: 18.3 months, 13.2 months, and 7.8 months; for good, intermediate, and poor cytogenetic risk categories, respectively ( $P < .001$  between strata of each group). We carried out a multivariable analysis of OS by using Cox proportional hazards regression modeling and included recoded WHO subtypes and all variables with a significant prognostic impact in univariable analysis: age  $\geq 60$  years, sex, platelets  $< 30 \times 10^9/L$ , neutrophils  $< 0.5 \times 10^9/L$ , and IPSS cytogenetic risk categories (log-rank  $P < .001$  for all comparisons). All variables, including recoded WHO, retained their independent prognostic influence on OS (recoded WHO: hazard ratio, 1.53; 95% CI, 1.45 to 1.62;  $P < .001$ ; Appendix Table A6, online only). We estimated C-index of the multivariable regression model to assess whether the new recoded WHO classification has an acceptable predictive capability in terms of mortality. The model with recoded WHO classification showed a slightly higher C-index value than that which incorporated the current WHO classification (C-index, 0.652  $\nu$  0.650, respectively).

To assess whether there was an influence on survival analysis related to different standards of care applied over time, we segmented our series into three time periods according to diagnosis date: 1972 to  $< 2000$ , 2000 to  $< 2008$ , and 2008 to present. These thresholds were selected according to increased indication of allo-SCT in the 2000 to  $< 2008$  period and the use of azacitidine as a standard of care in Spain for high-risk patients after 2008. Percentage of patients diagnosed in each period from the group of patients whose WHO risk category was upgraded when BM blasts were considered from NECs (upgraded group) was compared with the percentage of patients diagnosed in each of these time periods from the group of patients that remained in their original categories regardless of whether BM blasts were counted from NECs (comparator group). When assessing the group of patients diagnosed within WHO categories without EB, no significant difference was observed between the upgraded and comparator groups regarding percentage of patients diagnosed in each of these time periods (9.1% comparator group  $\nu$  8.4% upgraded group in the first period; 24% comparator group  $\nu$  27.8% upgraded group in the second period; and 66.9% comparator group  $\nu$  63.9% upgraded group in the third period;  $P = .325$ ). This finding suggests that the poorer survival observed in the group of patients who upgraded to WHO categories with EB was not influenced by receiving a diagnosis in a different time period, highlighting that their shorter survival was not conditioned by application of a different standard of care. In the same way, when assessing patients with RAEB-1, no significant difference was observed between the upgraded and comparator groups regarding percentage of patients diagnosed in



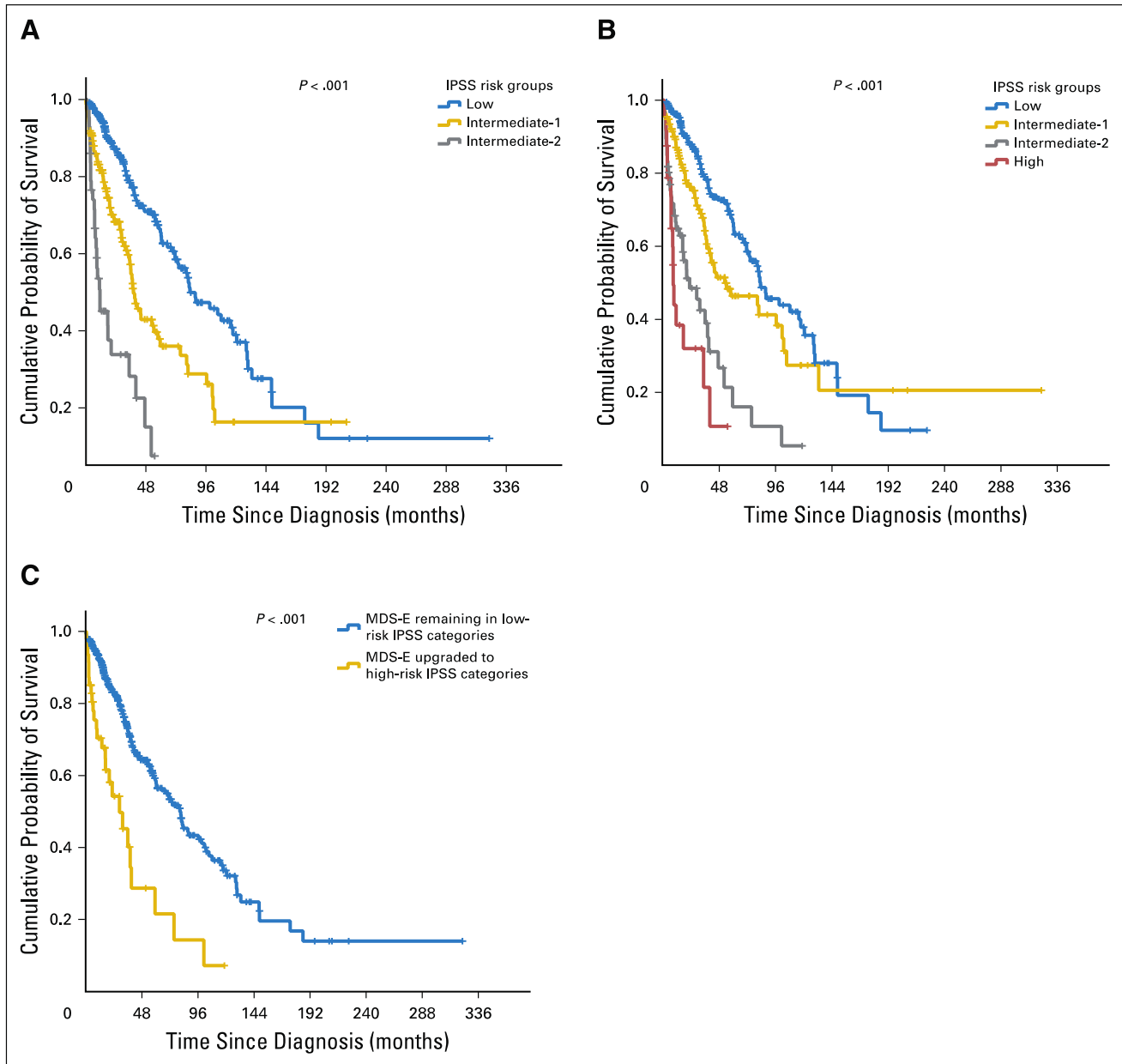
**Fig 1.** Overall survival (OS) by Kaplan-Meier analysis of patients with myelodysplastic syndromes with  $\geq 50\%$  bone marrow (BM) erythroblasts (MDS-E). Of 406 patients, 89 with erythroid hyperplasia and  $< 5\%$  BM blast cells in total BM cellularity were reclassified into higher BM blast categories when the percentage of blasts was assessed from nonerythroid cells. (A) OS of the 89 upgraded patients with MDS-E was inferior to that of the 316 patients with MDS-E who remained in  $< 5\%$  BM blast categories (median OS, 41.1 months v 80.2 months). (B) OS of the 89 upgraded patients with MDS-E patients was inferior to that of the 2,277 patients who were diagnosed with WHO categories with  $< 5\%$  BM blasts of the control group (median OS, 41.1 months v 76.1 months). (C) OS of the 72 patients who were recoded to RAEB-2 was inferior to that of the patients with 492 RAEB-1 of the control group (median OS, 28.9 months v 34.9 months). OS was compared with two-sided log-rank test.

each of these time periods (10.2% comparator group v 14.2% upgraded group in first period; 24.4% comparator group v 28.4% upgraded group in second period; and 65.4% comparator group v 57.5% upgraded group in third period;  $P = .126$ ).

We then evaluated IPSS-R BM blast thresholds, considering blasts from NECs, and focused on the new BM blast categories defined by this index (0% to 2% v 2 to  $< 5\%$ ). No significant difference was observed between the 617 patients with MDS with 0% to 2% BM blasts from TNCs who were upgraded to  $> 2$  to

$< 5\%$  BM blasts from NECs or the 1,417 patients with MDS who were not upgraded (median OS, 76.78 months v 81.81 months;  $P = .305$ ). Nevertheless, the four IPSS-R blast groups generated had significantly different OS (0% to 2% v 2 to  $< 5\%$ : median OS, 81.81 months v 67.06 months;  $P = .003$ ; 2 to  $< 5\%$  v 5% to 10%: median OS, 67.06 months v 48.07 months;  $P < .001$ ; 5% to 10% v  $> 10\%$ : median OS, 48.07 months v 16.86 months;  $P < .001$ ; combined for all strata  $P < .001$ ), which demonstrated that our approach fits well with IPSS-R blast thresholds.





**Fig 2.** Overall survival (OS) by Kaplan-Meier analysis of patients with myelodysplastic syndromes with  $\geq 50\%$  bone marrow (BM) erythroblasts (MDS-E) according to the International Prognostic Scoring System (IPSS). (A) OS by IPSS risk groups enumerating blasts from total BM cellularity. (B) OS by IPSS risk groups enumerating blasts from nonerythroid cells. (C) Forty-seven low-risk patients with MDS-E were upgraded to high-risk categories when blasts were considered from nonerythroid cellularity. These upgraded patients achieved a lower OS than did those who remained in low-risk categories (median OS, 28.9 months v80.6 months). OS was compared with two-sided log-rank test.

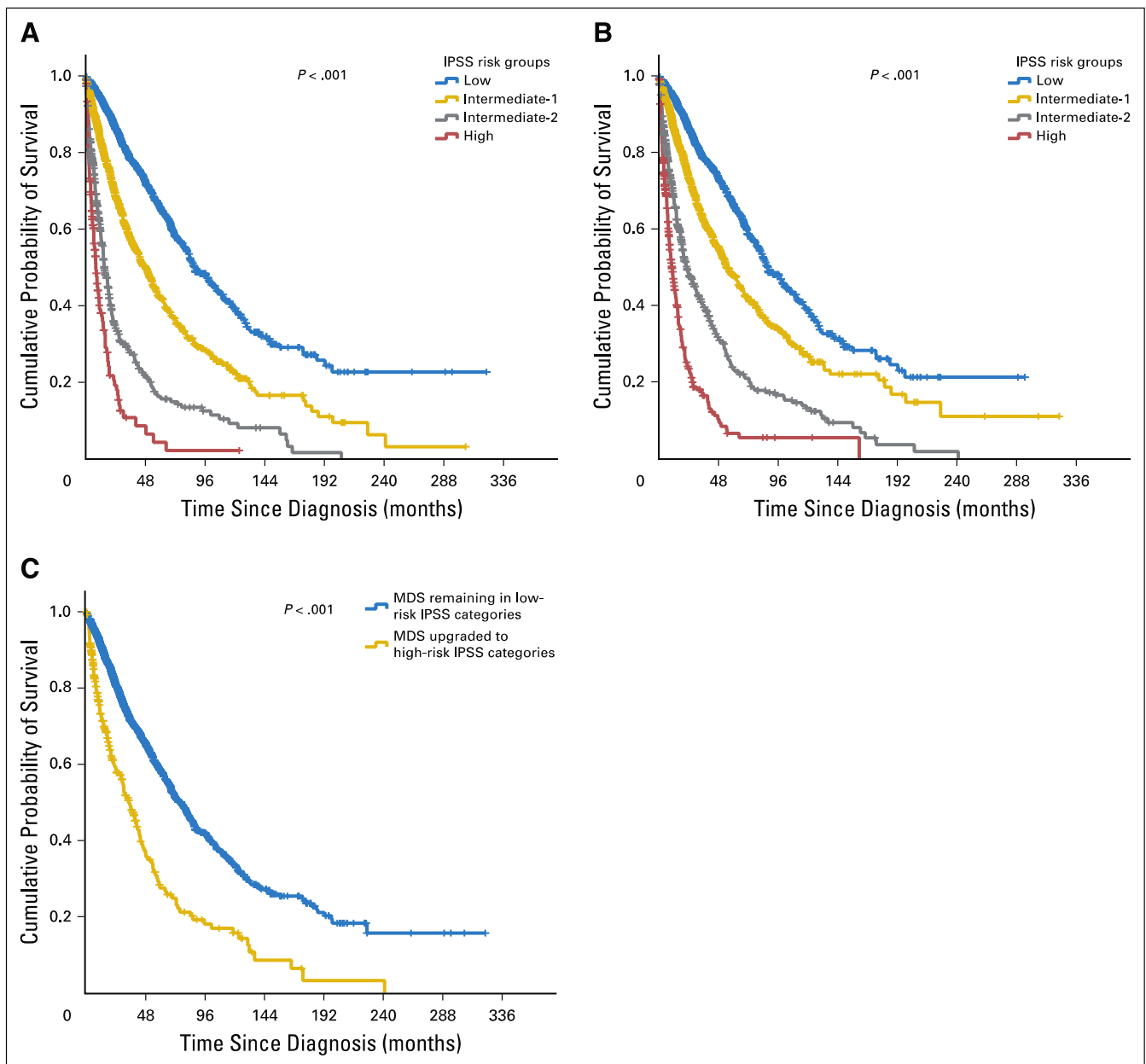
Finally, IPSS was recalculated enumerating BM blasts from NECs for all 3,692 patients with MDS. As the upper limit of BM blast percentage accepted in IPSS is 30%, patients with a higher percentage were excluded. Four groups of patients defined by this method had significantly different OS (median OS, 87.4 months, 54.1 months, 22.4 months, and 10.4 months, respectively;  $P < .001$ ; Figs 3A and 3B). Of interest, 258 (8.4%) of 3,083 patients who were previously classified in lower-risk IPSS categories were reclassified into higher-risk categories when blasts were enumerated from NECs. OS of this group of higher-risk upgraded patients was significantly shorter

compared with the group of patients who remained in lower-risk categories (median OS, 34.1 months v 76.1 months, respectively;  $P < .001$ ; Fig 3C). Again, counting blasts from NECs enabled us to detect a subset of patients that was considered as lower risk but, in fact, achieved outcomes similar to those expected in higher-risk patients. In a multivariable Cox proportional hazards regression model for OS, including the recoded IPSS and the previously shown predictive variables, recoded IPSS retained its independent prognostic influence on OS (hazard ratio, 1.87; 95% CI, 1.77 to 1.97;  $P < .001$ ; Appendix Table A7, online only).

## DISCUSSION

The current study analyzed the clinicopathologic features of the largest series of patients with de novo MDS-E (n = 465) reported to date. An extensive group of patients with de novo MDS with < 50% BM erythroblasts who were diagnosed in the same period was also studied and used as a control group (n = 3,227). Our study indicates that enumeration of blasts from NECs was the best strategy for the prognostic assessment not only in patients with MDS-E but also in all patients with MDS.

Expanded erythropoiesis is observed in approximately 15% of patients with MDS but does not represent any specific subtype of MDS in the 2008 WHO classification, as they have similar clinical and cytogenetic features compared with MDS without erythroid hyperplasia.<sup>1,9,10</sup> In our series, patients with MDS-E achieved an OS similar to that of the control group, even though the latter had more BM blasts. The lower blast count in patients with MDS-E was an expected finding because patients with 10% to < 20% BM blasts fulfilled erythroleukemia criteria and these were excluded from this comparison.



**Fig 3.** Overall survival (OS) by Kaplan-Meier analysis of all patients with myelodysplastic syndromes (MDS) according to the International Prognostic Scoring System (IPSS). (A) OS by IPSS risk groups enumerating blasts from total bone marrow cellularity. (B) OS by IPSS risk groups enumerating blasts from nonerythroid cells. (C) Two hundred fifty-eight low-risk patients with MDS were upgraded to high-risk categories when blasts were considered from nonerythroid cellularity. These upgraded patients showed a lower OS than did those who remained in low-risk categories (median OS, 34.07 months v 76.12 months). OS was compared with two-sided log-rank test.

Although there was no clear consensus in MDS-E on the best method for enumerating BM blasts (from TNCs *v* NECs), final WHO recommendation was to consider blasts from TNCs. We assessed BM blast percentage according to both approaches to evaluate the relevance of both methods on classification and prognostication, first, on MDS-E and, last, in the whole series.

Approximately one fifth of patients with MDS-E who were diagnosed within WHO categories with < 5% BM blasts were reclassified into higher-risk categories when blasts were enumerated from NECs, and these patients achieved a lower OS than did patients with MDS-E who did not upgrade to another category. It to be noted that by following current WHO recommendations, RAEB-2 diagnosis is not possible in patients with MDS-E, as patients with 10% to < 20% of BM blasts from TNCs fulfilled erythroleukemia criteria. However, by enumerating blasts from NECs, 72 patients with MDS-E—12 previously diagnosed within categories with < 5% BM blasts and all 60 patients with RAEB-1—were recoded to RAEB-2 and showed an inferior OS than did patients with RAEB-1 without erythroid hyperplasia. These findings suggest that considering BM blasts from TNCs underestimates the risk of MDS-E when assigning a WHO category. Our results, derived from a larger series, are in agreement with data from a study by Wang et al<sup>6</sup> that investigated 74 patients with MDS-E and suggested that enumerating blasts from NECs provides a better risk stratification for MDS-E.

Mean of BM erythroblasts in patients with MDS-E was 58% versus 30% in the control group; therefore, counting blasts from NECs only in patients with MDS-E could underestimate the real weight of blasts in patients without erythroid hyperplasia. On the basis of this concept, we decided to enumerate BM blasts from NECs in all patients of the series to reassign them into different WHO categories. Risk groups defined by this model had significantly different OS. Moreover, in line with previous data,<sup>11</sup> 12% of MDS patients who were diagnosed within WHO categories with < 5% BM blasts were reclassified into higher-risk categories, and these patients achieved a poorer OS than did those who remained in initial categories. Of interest, no significant OS differences were observed in each of the new WHO categories regardless of the presence of erythroid hyperplasia. Of note, OS of patients with erythroleukemia did not differ from that of patients without erythroid hyperplasia who had  $\geq$  20% BM blasts from NECs, which reinforced the idea supported, by several studies, that erythroleukemia is in the continuum with MDS.<sup>12-17</sup>

Following current WHO recommendations, it is not possible to assign patients with MDS-E to the high-risk IPSS category. After recalculating IPSS by enumerating BM blasts from NECs in patients with MDS-E and in the overall MDS population, approximately 9% of lower-risk patients were reclassified into higher-risk categories and demonstrated survival that would be expected for higher-risk patients (approximately 30 months). These outcomes are in line with the proposal of GESMD, which considers to be high-risk patients those with an expected median OS < 30 months.<sup>18-22</sup>

A proper prognostic stratification in MDS is essential for designing risk-adapted therapeutic strategies than can range from watchful waiting to allogeneic stem cell transplantation. The design of improvement strategies in prognostic evaluation of patients with MDS could help clinicians in risk-adapted therapeutic decisions. A revision of the 4th edition of WHO Classification of MDS is expected in mid-2016. On the basis of recommendations of a clinical advisory committee, the nonerythroid blast cell count rule will be eliminated.<sup>23</sup> Our results, which are based on the largest series of patients with MDS with erythroid hyperplasia, are not in line with this statement and evidence that enumerating BM blasts from NECs rather than from TNCs improves risk stratification of MDS.

Our findings mean an important change in the global paradigm of prognostication in MDS and should be considered in future WHO MDS classifications.

#### AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Disclosures provided by the authors are available with this article at [www.jco.org](http://www.jco.org).

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

**Conception and design:** Leonor Arenillas, Xavier Calvo, Guillermo F. Sanz, Lourdes Florensa

**Collection and assembly of data:** All authors

**Data analysis and interpretation:** Leonor Arenillas, Xavier Calvo, Guillermo F. Sanz, Lourdes Florensa

**Manuscript writing:** All authors

**Final approval of manuscript:** All authors

#### REFERENCES

1. Swerdlow S, Campos E, Lee Harris N, et al (eds): Myelodysplastic syndromes. in WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press, Lyon, France, 2008, pp 87-107
2. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al: Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 33:451-458, 1976
3. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al: Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 51:189-199, 1982

4. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al: Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 103:620-625, 1985

5. Bennett JM, Begg CB: Eastern Cooperative Oncology Group study of the cytochemistry of adult acute myeloid leukemia by correlation of subtypes with response and survival. *Cancer Res* 41:4833-4837, 1981

6. Wang SA, Tang G, Fadare O, et al: Erythroid-predominant myelodysplastic syndromes: Enumeration of blasts from nonerythroid rather than total marrow cells provides superior risk stratification. *Mod Pathol* 21:1394-1402, 2008

7. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al: International scoring system for evaluating prognosis in

myelodysplastic syndromes. *Blood* 89:2079-2088, 1997

8. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al: Revised International Prognostic Scoring System for myelodysplastic syndromes. *Blood* 120:2454-2465, 2012

9. Wong E, Juneja S: Acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndromes with 50% or greater erythroblasts: A diagnostic conundrum. *Pathology* 47:289-293, 2015

10. Mazzella FM, Smith D, Horn P, et al: Prognostic significance of pronormoblasts in erythrocyte predominant myelodysplastic patients. *Am J Hematol* 81:484-491, 2006

11. Germing U, Neukirchen J, Strupp C, et al: How to assess the medullary blast count in MDS?

Pay attention to the proportion of erythroid cells! *Leuk Res* 35:S20-S21, 2011 (suppl 1)

12. Bacher U, Haferlach C, Alpermann T, et al: Comparison of genetic and clinical aspects in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes all with more than 50% of bone marrow erythropoietic cells. *Haematologica* 96:1284-1292, 2011

13. Grossmann V, Bacher U, Haferlach C, et al: Acute erythroid leukemia (AEL) can be separated into distinct prognostic subsets based on cytogenetic and molecular genetic characteristics. *Leukemia* 27:1940-1943, 2013

14. Hasserjian RP, Zuo Z, Garcia C, et al: Acute erythroid leukemia: A reassessment using criteria refined in the 2008 WHO classification. *Blood* 115:1985-1992, 2010

15. Park S, Picard F, Guesnu M, et al: Erythro-leukaemia and RAEB-t: A same disease? *Leukemia* 18:888-890, 2004

16. Santos FP, Faderl S, Garcia-Manero G, et al: Adult acute erythroleukemia: An analysis of 91 patients treated at a single institution. *Leukemia* 23:2275-2280, 2009

17. Zuo Z, Medeiros LJ, Chen Z, et al: Acute myeloid leukemia (AML) with erythroid predominance exhibits clinical and molecular characteristics that differ from other types of AML. *PLoS One* 7:e41485, 2012

18. Valcárcel D, Sanz G, Ortega M, et al: Use of newer prognostic indices for patients with myelodysplastic syndromes in the low and intermediate-1 risk categories: A population-based study. *Lancet Haematol* 2:e260-e266, 2015

19. Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos (GESMD); Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH): Guías españolas de diagnóstico y tratamiento de los síndromes mielodisplásicos y la

leucemia mielomonocítica crónica. [http://gesmd.es/pdfs/guias\\_smd/Haematologia\\_Guias\\_SMD.pdf](http://gesmd.es/pdfs/guias_smd/Haematologia_Guias_SMD.pdf)

20. Cordoba I, Gonzalez-Porras JR, Such E, et al: The degree of neutropenia has a prognostic impact in low risk myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 36:287-292, 2012

21. Gonzalez-Porras JR, Cordoba I, Such E, et al: Prognostic impact of severe thrombocytopenia in low-risk myelodysplastic syndrome. *Cancer* 117:5529-5537, 2011

22. Della Porta MG, Malcovati L, Boveri E, et al: Clinical relevance of bone marrow fibrosis and CD34-positive cell clusters in primary myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 27:754-762, 2009

23. Arber DA, Hasserjian RP: Reclassifying myelodysplastic syndromes: What's where in the new WHO and why. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2015:294-298, 2015

### Affiliations

Leonor Arenillas, Xavier Calvo, Carme Pedro, Ana Ferrer, and Lourdes Florensa, Hospital del Mar Research Institute; Esther Alonso, Hospital Universitario Bellvitge Hospitalet de Llobregat; Julia Montoro, Hospital Universitario Vall d' Hebron; Salut Brunet, Hospital Santa Creu i Sant Pau; Benet Nomdedeu, Hospital Clínic, Barcelona; Elisa Luño, Hospital Universitario Central Asturias, Oviedo; Leonor Senent and Guillermo F. Sanz, Hospital Universitario La Fe; Mar Tormo, Hospital Clínico Universitario de Valencia; Rafael Andreu, Hospital Universitario Doctor Peset, Valencia; Fernando Ramos, Hospital Universitario de León, León; María Teresa Ardanaz, Hospital Universitario Txagorritxu, Vitoria; Víctor Marco, Hospital Arnau Vilanova, Lleida; María Díez-Campelo, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca; Beatriz Arrizabalaga, Hospital Universitario Cruces, Baracaldo; Blanca Xicoy, ICO-Badalona, Badalona; Santiago Bonanad, Hospital La Ribera, Alzira; and Andrés Jerez, Hospital Morales Meseguer, IMIB-Arrixaca, Murcia, Spain.

### **Acknowledgment**

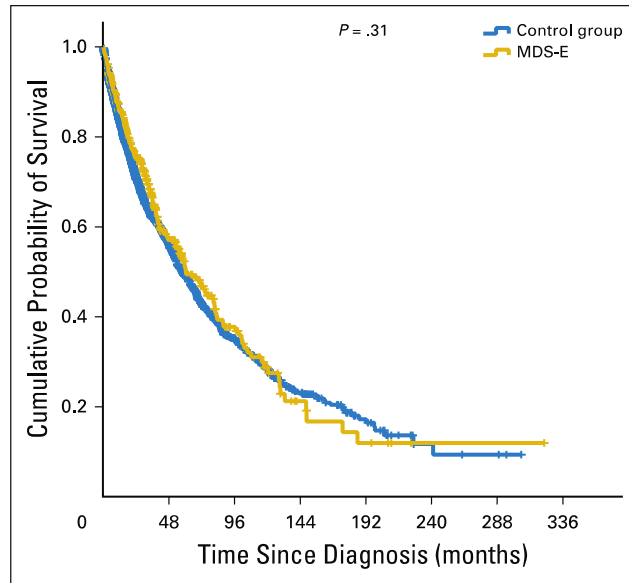
We thank Luis Benlloch and Ana Vicente for maintaining the Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos database.

### **Appendix**

#### **Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos Members**

*The following institutions and investigators from the Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos (GESMD) participated in the study:* Hospital Universitario La Fe, Valencia (G. Sanz, E. Such, J. Cervera, L. Senent, A. Avaria); Hospital Clinic, Barcelona (B. Nomdedeu, M. Nomdedeu, A. Pereira, D. Costa); Hospital del Mar, Barcelona (L. Arenillas, X. Calvo, L. Florensa, A. Ferrer, C. Pedro); Hospital Central de Asturias, Oviedo (E. Luño, T. Bernal); Hospital Universitario Bellvitge Hospitalet de Llobregat, Spain (E. Alonso, M. Arnan), Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona (B. Xicoy, J. Jiménez, J. Grau); Hospital Morales Meseguer, Murcia (A. Jerez, M.L. Amigo, F. Ortuño); Hospital Universitario Vall D'Hebron, Barcelona (D. Valcarcel, J. Montoro); Hospital General Universitario, Valencia (F. Carbonell, R. Collado); Hospital Univeristario 12 de Octubre, Madrid (J. Martínez, M.T. Cedeña); Hospital Universitario, Salamanca (C. del Cañizo, M. Díez-Campelo); Hospital Txagorritxu, Vitoria (M.T. Ardanaz); Hospital Clínico Universitario, Valencia (M. Tormo); Hospital de León (F. Ramos); Hospital de la Ribera, Alcira (S. Bonanad); Hospital Arnau de Vilanova, Lleida (V. Marco); Hospital de La Princesa, Madrid (V. Gómez); Hospital Carlos Haya, Málaga (A. Bailén); Hospital. Clínico San Carlos, Madrid (A. Villegas); Hospital U. Virgen del Rocío, Sevilla (J. Falantes); Hospital de Sagunto, Sagunto (M.J. Arilla); Hospital de Cabueñes, Gijón (A. Fernández-González); Hospital Puerta de Hierro, Madrid (G. Bautista); Hospital Dr Peset, Valencia (R. Andreu); Hospital Severo Ochoa, Madrid (M.J. Requena); Hospital Valle de los Pedroches, Pozoblanco (R. Ríos); Hospital Nuestra Señora de Aranzazu, San Sebastian: (M.A. Etxebeste); Hospital Son Llatzer, Palma de Mallorca (J. Bargay); Fundación Hospital de Alcorcón, Madrid (L. Villalón); Hospital Universitario de Canarias, Santa Cruz de Tenerife (B. González); Hospital de Mataró, Barcelona (E. Plensa); Hospital Marqués de Valdecilla, Santander (A. Insunza); Hospital de Jerez, Jerez de la Frontera (L. Hermosín); Hospital Duran i Reynals, L'Hospitalet (R. Duarte); Hospital General de Castellón (G. Cañigral); Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Málaga (R. García); Hospital Insular de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria (M. Caballero); Complejo Hospitalario de Pontevedra, Pontevedra (M.J. Allegue); Hospital Sant Pau, Barcelona (S. Brunet, A. Garrido); Universidad de Navarra, Pamplona (M.J. Calasanz); and Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid (J. Cruz, S. Alvarez).

### Improving Prognostic Evaluation of Myelodysplastic Syndromes



**Fig A1.** Overall survival (OS) by Kaplan-Meier analysis of patients with myelodysplastic syndromes with  $\geq 50\%$  bone marrow (BM) erythroblasts (MDS-E) and comparison with control group. OS of 465 patients with MDS-E was similar to that observed in 3,227 patients with MDS with  $< 50\%$  erythroblasts (median OS, 60.4 months  $\nu$  57.8 months). OS is indicated in months and was compared with two-sided log-rank test. *P* value is denoted in the graph.

**Table A1.** 2008 WHO Classification of Myeloid Malignancies for Patients with Erythroid Precursors  $\geq 50\%$  of Total Nucleated Cells in BM

Erythroid Precursors in BM, %	Blood/BM Findings	Other Findings	Diagnosis
$\geq 50$	$\geq 20$ blasts in blood or of all nucleated cells	Case meets criteria for AML with myelodysplasia-related changes	AML with myelodysplasia-related changes
$\geq 80$ immature erythroid precursors with minimal maturation	Few, if any, myeloblasts	Minimal, if any, granulocytic component	Pure erythroid leukemia
$\geq 50$	$< 20\%$ blasts in blood; blasts $< 20\%$ of all nucleated BM cells	Blasts $\geq 20\%$ of nonerythroid cells in BM	Erythroleukemia (acute erythroid/myeloid leukemia)
$\geq 50$	$< 20\%$ blasts in blood; blasts $< 20\%$ of all nucleated BM cells	Blasts $< 20\%$ of nonerythroid cells in BM	MDS; classify MDS according to number of blasts as percentage of all nucleated BM cells

Abbreviations: AML, acute myeloid leukemia; BM, bone marrow; MDS, myelodysplastic syndromes.



**Table A2.** Distribution of 2008 WHO Subtypes Considering Blast Cells From Total Marrow Nucleated Cells or From Nonerythroid Compartment in MDS With Erythroid Hyperplasia ( $\geq 50\%$  Erythroblasts) and Comparison With Control Group ( $< 50\%$  Erythroblasts)

Subtype	MDS-E (n = 465)		Control Group (n = 3,227)	
	Considering Blasts From TNCs (Approach A)	Considering Blasts From NECs (Approach B)	Considering Blasts From TNCs (Approach A)	Considering Blasts From NECs (Approach B)
RCUD	42 (8.1)	36 (6.9)	338 (10.5)	320 (9.9)
RARS	139 (26.7)	119 (22.9)	413 (12.8)	396 (12.3)
RCMD	200 (38.4)	147 (28.2)	1,272 (39.4)	1,100 (34.1)
5q-	12 (2.3)	9 (1.7)	192 (5.9)	167 (5.2)
MDS-U	12 (2.3)	5 (1)	62 (1.9)	53 (1.6)
RAEB-1	60 (11.5)	77 (14.9)*	492 (15.2)	538 (16.7)
RAEB-2	0†	72 (13.8)‡	458 (14.2)§	478 (14.8)
				175 (5.4)§

NOTE. Data are given as No. (%).

Abbreviations: 5q-, myelodysplastic syndromes with isolated del(5q); MDS-U, unclassifiable myelodysplastic syndromes; NEC, nonerythroid cell; RAEB-1, refractory anemia with excess blasts-1; RAEB-2, refractory anemia with excess blasts-2; RARS, refractory anemia with ring sideroblasts; RCMD, refractory cytopenia with multilineage dysplasia; RCUD, refractory cytopenia with unilineage dysplasia; TNC, total nucleated cell.

\*These patients belong to categories with  $< 5\%$  bone marrow blasts when enumerating of blasts from TNCs: RCUD, n = 6; RARS, n = 18; RCMD, n = 44; 5q-, n = 2; MDS-U, n = 7.

†In patients with  $\geq 50\%$  erythroblasts when blasts were enumerated from total bone marrow cellularity, none of the cases could be classified as RAEB-2 because these cases fulfilled the current WHO criteria of erythroleukemia.

‡This group was composed of cases classified as RARS (n = 2), RCMD (n = 9), 5q- (n = 1), and RAEB-1 (n = 60) when blasts were considered from TNCs.

§Of patients with RAEB-2, 38% (n = 175) presented  $\geq 20\%$  BM blasts when those were considered from NECs.

**Table A3.** Reclassification of 2008 WHO Subtypes Considering Bone Marrow Blasts From TNCs or From NECs in Control Group

Subtype Considering Blasts From TNCs	Subtype Considering Blasts From NECs								Total
	RCUD	RARS	RCMD	5q-	MDS-U	RAEB-1	RAEB-2	AML	
RCUD	320	0	0	0	0	18	0	0	338
RARS		396	0	0	0	17	0	0	413
RCMD			1,100	0	0	172	0	0	1,272
5q-				167	0	25	0	0	192
MDS-U					53	9	0	0	62
RAEB-1						297	195	0	492
RAEB-2							283	175	458
Total	320	396	1,100	167	53	538	478	175	3,227

Abbreviations: 5q-, myelodysplastic syndromes with isolated del(5q); AML, acute myeloid leukemia; MDS-U, unclassifiable myelodysplastic syndromes; NEC, nonerythroid cell; RAEB-1, refractory anemia with excess blasts-1; RAEB-2, refractory anemia with excess blasts-2; RARS, refractory anemia with ring sideroblasts; RCMD, refractory cytopenia with multilineage dysplasia; RCUD, refractory cytopenia with unilineage dysplasia; TNC, total nucleated cell.

**Improving Prognostic Evaluation of Myelodysplastic Syndromes**

**Table A4.** Reclassification of IPSS Categories Considering Bone Marrow Blasts From TNCs or From NECs in Control Group

IPSS Category Considering Blasts From TNCs	IPSS Category Considering Blasts From NECs					Total
	Low	Intermediate-1	Intermediate-2	High	≥ 30% BM Blast, IPSS Not Assessable	
Low	1,373	131	0	0	0	1,504
Intermediate-1		946	211	0	0	1,157
Intermediate-2			265	138	6	409
High				141	10	151
Total	1,373	1,077	476	279	16	3,221*

Abbreviations: IPSS, International Prognostic Scoring System; NEC, nonerythroid cell; TNC, total nucleated cell.  
\*We had information to calculate the IPSS in 3,221 (99.8%) of 3,227 patients in the control group.

**Table A5.** Mean and SD of Percent of Bone Marrow Blasts From TNCs and From NECs by 2008 WHO Subtypes

Subtype	MDS-E		Control Group		P	
	A: Blasts From TNCs, Mean (SD)	B: Blasts From NECs, Mean (SD)	C: Blasts From TNCs, Mean (SD)	D: Blasts From NECs, Mean (SD)	A v C	B v D
RCUD	0.89 (0.98)	2.22 (2.45)	1.26 (1.27)	1.74 (1.73)	.103	.561
RARS	0.91 (1.09)	2.16 (2.60)	0.97 (1.02)	1.53 (1.62)	.239	.127
RCMD	1.39 (1.29)	3.45 (3.40)	1.68 (1.3)	2.48 (1.98)	.002	.013
5q-	1.25 (1.48)	3.26 (4.62)	1.81 (1.46)	2.41 (2.00)	.183	.833
MDS-U	1.93 (1.24)	4.91 (3.12)	1.83 (1.39)	2.52 (1.96)	.738	.015
RAEB-1	6.21 (1.39)	14.89 (3.65)	6.76 (1.36)	9.63 (2.48)	.005	< .001
RAEB-2			13.35 (3.03)	18.83 (5.54)		

Abbreviations: 5q-, myelodysplastic syndromes with isolated del(5q); MDS-U, unclassifiable myelodysplastic syndromes; NEC, nonerythroid cell; MDS-E, myelodysplastic syndromes with ≥ 50% BM erythroblasts; RAEB-1, refractory anemia with excess blasts-1; RAEB-2, refractory anemia with excess blasts-2; RARS, refractory anemia with ring sideroblasts; RCMD, refractory cytopenia with multilineage dysplasia; RCUD, refractory cytopenia with unilineage dysplasia; SD, standard deviation; TNC, total nucleated cell.

**Table A6.** Univariable and Multivariable Analyses for Overall Survival

Variable	Univariable		Multivariable	
	P	HR	95% CI	P
Male sex	< .001	1.23	1.11 to 1.37	< .001
Age, years ≥ 60	< .001	1.94	1.63 to 2.32	< .001
Platelet count, ×10 <sup>9</sup> /L < 30	< .001	1.61	1.32 to 1.97	< .001
Neutrophil count, ×10 <sup>9</sup> /L < 0.5	< .001	1.36	1.13 to 1.63	.001
IPSS cytogenetic risk categories	< .001	2.88	2.48 to 3.36	< .001
Recoded WHO	< .001	1.53	1.45 to 1.62	< .001

Abbreviations: HR, hazard ratio; IPSS, International Prognostic Scoring System.



**Table A7.** Univariable and Multivariable Analyses for Overall Survival

Variable	Univariable	Multivariable		
	<i>P</i>	HR	95% CI	<i>P</i>
Male sex	< .001	1.24	1.11 to 1.37	< .001
Age, years				
≥ 60	< .001	1.89	1.58 to 2.26	< .001
Platelet count, ×10 <sup>9</sup> /L				
< 30	< .001	1.58	1.29 to 1.93	< .001
Neutrophil count, ×10 <sup>9</sup> /L				
< 0.5	< .001	1.23	1.07 to 1.55	.008
Recoded IPSS	< .001	1.87	1.77 to 1.97	< .001

Abbreviations: HR, hazard ratio; IPSS, International Prognostic Scoring System.

### TERCER TRABAJO

#### ***Single nucleotide polymorphism array karyotyping: a diagnostic and prognostic tool in myelodysplastic syndromes with unsuccessful conventional cytogenetic testing.***

Alrededor de un 50% de los pacientes con SMD *de novo* presentan un cariotipo alterado. Este porcentaje se incrementa en los SMD secundarios a tratamiento, en los que se observan alteraciones citogenéticas hasta en un 80% de los casos. Las alteraciones citogenéticas tienen un importante valor diagnóstico y pronóstico independiente en los SMD. En ocasiones, en el estudio citogenético de algunos SMD no se obtiene un número adecuado de metafases analizables. La técnica de SNP *arrays* ha sido validada para la detección de alteraciones cromosómicas en varias hemopatías. Para llevarla a cabo no es necesario disponer de células en división sino ADN.

El objetivo de este estudio fue aplicar la técnica de SNP *arrays* en una serie de SMD en los que no se obtuvo un cultivo citogenético adecuado y estudiar la utilidad de esta técnica en el diagnóstico y pronóstico de este grupo de pacientes.

#### Pacientes y métodos

- Se estudiaron 62 pacientes (56 SMD primarios y 4 LMMC, según la clasificación OMS 2008; y 2 AREB-T, según la clasificación FAB) en los que no se obtuvieron un número adecuado de metafases en el cultivo citogenético.
- 42 pacientes pertenecían a centros participantes en el GESMD y 20 a la Cleveland Clinic (Cleveland (OH), EEUU).
- Se disponía de la información del tratamiento recibido en 33 de los 62 pacientes: 20 habían recibido tratamiento de soporte y 13 habían recibido tratamientos adicionales (6 agentes eritropoyéticos, 5 azacitidina y 2 lenalidomida). Ninguno de los pacientes recibió trasplante de progenitores hematopoyéticos.
- Se disponía de seguimiento clínico completo de 60 de los 62 pacientes.
- El ADN se extrajo de muestras del diagnóstico, en 47 pacientes de MO total y en 15 pacientes de SP. No se disponía de ADN de tejido control.

- En 55 pacientes la plataforma de *microarray* utilizada fue Genome-Wide Human SNP Array 6.0 y en 7 pacientes GeneChip Human Mapping 250K Nsp, ambas de Affymetrix®.
- El análisis de los resultados se realizó con los *softwares*: Genotyping Console 4.0 y Chromosome Analysis Suite 1.0.1.
- Al no disponer de tejido control se aplicó el algoritmo de análisis propuesto por Maciejewski.<sup>182</sup> De forma resumida, consideramos las CNA (microdeleciones o microduplicaciones) con una longitud mínima de 100 Kb y que contengan un mínimo de 10 sondas aberrantes. Cuando la CNA se superponía en un 50% o más con algún polimorfismo previamente descrito en las bases de datos públicas o en una serie de 1003 controles de la Cleveland Clinic, era considerada germinal y excluida del análisis. Para las CN-LOH, se consideraron somáticas todas las localizadas a nivel telomérico y las intersticiales con un tamaño igual o superior a 20 Mb.
- Las curvas de supervivencia se construyeron mediante el método de Kaplan-Meier para el intervalo entre la fecha del diagnóstico y la fecha de muerte o última visita (SG), y se compararon con el test de log-rank.

## Resultados

### *Cariotipado mediante SNP arrays*

- La técnica de SNP *arrays* permitió la detección de alteraciones citogenéticas en 31(50%) de 62 pacientes: 21 CNA; 2 CNA y CN-LOH; 8 CN-LOH.
- Se detectaron alteraciones tanto en muestras de SP (N=8) como en MO (N=23). No se observaron diferencias en el tipo de alteraciones detectadas entre un tipo de muestra y otro.
- Los cromosomas en los que se detectaron más alteraciones fueron: 1, 3, 5 y 7. En cuanto a las alteraciones citogenéticas más frecuentemente observadas en SMD. 10 casos presentaban del(5q) y 6 casos alteraciones en el cromosoma 7 (4 deleciones y 2 CN-LOH).
- En 7 pacientes (11%) se detectó un cariotipo complejo por SNP *arrays* ( $\geq 3$  alteraciones numéricas).

- Se detectaron 19 CN-LOH de tamaño significativo en 10 pacientes. Dichas alteraciones no pueden ser detectadas ni por citogenética convencional ni por FISH.

#### *Impacto clínico de las alteraciones citogenéticas detectadas mediante SNP arrays*

- La mediana de seguimiento fue de 32.2 meses. El 43% de los pacientes (N=26) habían fallecido en el momento del análisis.
- No se observaron diferencias en SG entre los pacientes que presentaban alteraciones por SNP arrays y los que no presentaban, cuando se consideraban juntas la CNA y CN-LOH. Sin embargo, cuando se consideraron únicamente las CNA, los pacientes que las presentaban tenían una SG significativamente menor a los que no las presentaban.
- Se utilizó la información citogenética obtenida mediante SNP arrays para calcular el grupo de riesgo citogenético según el IPSS. Los 3 grupos de riesgo mostraron diferencias en cuanto a OS. Resultados similares se observaron con los 5 grupos de riesgo citogenético del IPSS-R.

#### *Resultados en los 54 pacientes con diagnóstico de SMD según OMS 2008*

- La mediana de seguimiento fue de 32.36 meses. El 40% de los pacientes (N=26) habían fallecido en el momento del análisis.
- Al igual que ocurría en toda la serie, la SG de los pacientes con CNA fue significativamente menor que la de los pacientes que no las presentaban.
- En 35 pacientes se disponía información completa para calcular el IPSS y el IPSS-R utilizando los resultados de las CNA mediante SNP arrays para establecer el riesgo citogenético. Se observaron diferencias en SG entre los pacientes catalogados en categorías de riesgo bajo e intermedio-1 frente a los catalogados en categorías de riesgo intermedio-2 y alto, según IPSS. Asimismo, se observaron diferencias entre los pacientes con riesgo muy bajo/bajo/intermedio y los que presentaban riesgo alto/muy alto, según IPSS-R.



# Single Nucleotide Polymorphism Array Karyotyping: A Diagnostic and Prognostic Tool in Myelodysplastic Syndromes with Unsuccessful Conventional Cytogenetic Testing

Leonor Arenillas,<sup>1</sup> Mar Mallo,<sup>2</sup> Fernando Ramos,<sup>3</sup> Kathryn Guinta,<sup>4</sup> Eva Barragán,<sup>5</sup> Eva Lumbreras,<sup>6</sup> María-José Larráyoiz,<sup>7</sup> Raquel De Paz,<sup>8</sup> Mar Tormo,<sup>9</sup> María Abáigar,<sup>6</sup> Carme Pedro,<sup>10</sup> José Cervera,<sup>5</sup> Esperanza Such,<sup>5</sup> María José Calasanz,<sup>7</sup> María Díez-Campelo,<sup>6</sup> Guillermo F. Sanz,<sup>5</sup> Jesús María Hernández,<sup>6</sup> Elisa Luño,<sup>11</sup> Sílvia Saumell,<sup>1</sup> Jaroslaw Maciejewski,<sup>4</sup> Lourdes Florensa,<sup>1</sup> and Francesc Solé<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratori de Citologia Hematològica, Laboratori de Citogenètica Molecular, Pathology Department, Hospital del Mar, GRETNHE, IMIM (Hospital del Mar Research Institute), Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Institut de Recerca contra la Leucèmia Josep Carreras (IJC), Badalona, Spain

<sup>3</sup>Hematology Department, Hospital Universitario de León, Instituto de Biomedicina (IBIOMED), Universidad de León, León, Spain

<sup>4</sup>Department of Translational Hematology and Oncology Research, Taussig Cancer Institute, Cleveland Clinic, Cleveland, OH

<sup>5</sup>Hematology Department, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain

<sup>6</sup>IBSAL, IBMCC (Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca-CSIC) and Hematology Department, Hospital Universitario de Salamanca, Spain

<sup>7</sup>Departamento de Genética, Universidad de Navarra, Pamplona, Spain

<sup>8</sup>Hematology Department, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain

<sup>9</sup>Hematology and Oncology Department, Hospital Clínico Universitario de Valencia, Spain

<sup>10</sup>Clinic Hematology Department, Hospital del Mar, GRETNHE, IMIM (Hospital del Mar Research Institute), Barcelona, Spain

<sup>11</sup>Hematology Department, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain

Cytogenetic aberrations identified by metaphase cytogenetics (MC) have diagnostic, prognostic, and therapeutic implications in myelodysplastic syndromes (MDS). However, in some MDS patients MC study is unsuccessful. Single nucleotide polymorphism array (SNP-A) based karyotyping could be helpful in these cases. We performed SNP-A in 62 samples from bone marrow or peripheral blood of primary MDS with an unsuccessful MC study. SNP-A analysis enabled the detection of aberrations in 31 (50%) patients. We used the copy number alteration information to apply the International Prognostic Scoring System (IPSS) and we observed differences in survival between the low/intermediate-1 and intermediate-2/high risk patients. We also saw differences in survival between very low/low/intermediate and the high/very high patients when we applied the revised IPSS (IPSS-R). In conclusion, SNP-A can be used successfully in PB samples and the identification of CNA by SNP-A improve the diagnostic and prognostic evaluation of this group of MDS patients. © 2013 Wiley Periodicals, Inc.

## INTRODUCTION

Myelodysplastic syndromes (MDS) are a group of acquired clonal hematopoietic disorders, characterized by cytopenias, dysplasia in one or more of the myeloid cell lines, and an increased risk of development of acute myeloid leukemia (AML). Cytogenetic analysis has provided fundamental insights into the molecular pathogenesis of a variety of hematological disorders. Cytogenetic abnormalities identified by metaphase cytogenetics (MC) are observed in approximately 50% of MDS cases (Haase et al., 2007). MDS have been classified according to the French-American-British (FAB) classification system (Bennett et al., 1982) and, more recently, according to the WHO criteria (Brunner et al., 2008), the latter based on the

**Supported by:** Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain, Grant number: PI 11/02010; Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC, FEDER), Grant number: RD12/0036/0014, RD07/0020/2004, RD12/0036/0044; Pla Director d'Oncologia de Catalunya (XBTC), Grant number: SGR 541; Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca, "Departament d'Innovació, Universitat i Empresa"; COST-European Genetic and Epigenetic Study on AML and MDS, Grant number: BM0801; Sanidad de Castilla y León (SACYL), Grant number: 06/A/06, 355/A/09; Generalitat Valenciana PROMETEO/2011/025, Fundación Española de Hematología y Hemoterapia; and Celgene, Spain, Grant number: INBIOMED HEMA-001/2006; CSIC, Spain

\*Correspondence to: Francesc Solé, Crta. de Can Ruti, Camí de les Escoles s/n. Edifici IMPPC 08916 Badalona, España. E-mail: fsolé@carrerasresearch.org

Received 5 April 2013; Accepted 28 August 2013

DOI 10.1002/gcc.22112

Published online 7 October 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

number of cytopenias, the type and degree of dysplasia, the presence of ring sideroblasts, percent of blasts in the peripheral blood (PB) and the bone marrow (BM) and, cytogenetic data. The International Prognostic Scoring System (IPSS) (Greenberg et al., 1997), and the recently published revised IPSS (IPSS-R) (Greenberg et al., 2012), are the most commonly used prognostic systems for MDS and include variables such as the number and depth of cytopenias, percentage of BM blasts, and karyotype. However, standard MC has technical limitations that result in the underestimation of the degree of chromosomal changes and in some cases may fail to provide results because of the growth of no or few cells in metaphase (Cervera et al., 2009). Fluorescence in situ hybridization (FISH) may complement the MC study (Cherry et al., 2003); however, its utility is limited to the detection of particular lesions (Jiang et al., 2012). Array-based technologies can be used for karyotyping and can solve some of the shortcomings of MC. Single nucleotide polymorphism arrays (SNP-A) and comparative genomic hybridization arrays (CGH-A) have identified new chromosomal defects in several hematologic disorders, suggesting its potential clinical utility (Gondek et al., 2007; Maciejewski et al., 2009). SNP-A provides a whole genome approach with a good resolution for copy number alterations (CNA) and copy number neutral loss of heterozygosity (CN-LOH). To date, several SNP-A studies of MDS have been published (Mohamedali et al., 2007; Gondek et al., 2008; Heinrichs et al., 2009; Tiu et al., 2011; Merkerova et al., 2012). SNP-A-based karyotyping could resolve MDS cases with non-informative MC. Only limited data on the application of this technique in this subset of MDS patients are available. The aim of our study was to apply SNP-A karyotyping in MDS patients with an unsuccessful routine MC study in order to elucidate the potential usefulness of this technique to improve the diagnosis and prognostication of this group of patients.

## MATERIALS AND METHODS

### Patient Cohort

We studied 62 patients (56 primary MDS according to the 2008 WHO classification and 4 chronic myelomonocytic leukemia (CMML) as well as 2 refractory anemia with excess of blasts in transformation (RAEB-t) according to the FAB classification) whose BM karyotype showed no

mitoses ( $n = 61$ ) or  $<10$  analyzable metaphases ( $n = 1$ ). We had treatment information on 33 out of the 62 patients. Among them, 20 patients received only supportive care with red blood cell and/or platelet transfusions and 13 received additional treatments (5 azacytidine, 2 lenalidomide, and 6 erythropoiesis-stimulating agents). None of the patients received allogeneic stem cell transplantation. Information on overall survival (OS) and transformation to AML was available in 60 patients. Informed consent had been obtained for sample collection from patients according to institutionally approved protocols. The study was conducted fulfilling the biomedical research guidelines of Declaration of Helsinki.

### G-Banding Cytogenetics

Conventional cytogenetics studies were performed on bone marrow (BM) at the individual centers following standard procedures.

### DNA Preparation

DNA was extracted from whole BM ( $n = 47$ ) or peripheral blood (PB) ( $n = 15$ ) at the individual centers at diagnosis and before receiving any therapy. Some of the samples were obtained from Parc de Salut MAR Biobank (MARBiobanc). The purity and concentration of genomic DNA was evaluated using the ND-1000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Wilmington, DE). The integrity was checked by a 2% agarose gel. Only DNA that fulfilled quality controls required by Affymetrix® were submitted to array procedure. No DNA samples from control tissue were available.

### Single Nucleotide Polymorphism (SNP-A)

SNP-A were performed at two centers (Hospital del Mar, Barcelona, Spain and Cleveland Clinic, Cleveland, OH). Cases were hybridized with Human SNP arrays from Affymetrix® (Affymetrix, Santa Clara, CA): 55 with Genome-Wide Human SNP Array 6.0 and 7 with GeneChip Human Mapping 250K Nsp. Assays were performed according to the manufacturer's protocols.

### SNP-A Data Analysis

The analysis was performed with the Genotyping Console 4.0 and Chromosome Analysis Suite 1.0.1, using annotations of genome version NCBIv30 (hg18). The diagnostic procedures for detection of lesions were as follows: (1) We

considered CNA (microdeletions or microduplications) of 100 Kb that carried a minimum of 10 aberrant probes. In addition to software-reported CNA analysis, a visual test was performed. When CNA overlapped  $\geq 50\%$  with previously reported in public available copy number variant databases or in an internal control database ( $n = 1,003$ ) provided by the Translational Hematology and Oncology Research Department from Cleveland Clinic (USA) they were considered germline and excluded; (2) If CN-LOH were detected, telomeric lesions or interstitial defects  $\geq 20$  Mb were considered somatic abnormalities (Maciejewski et al., 2009).

#### Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)

FISH was performed on cases with available fixed Carnoy cells. The studied regions were 5q, 7q, chromosome 8, and 20q, with the following probes: LSI5q31 (EGR1)/D5S23, D5S21 probe; LSI7q31 (D7S486)/CEP7; CEP8, and LSI20q12 (D20S108) (Abbott Molecular, Des Plaines, IL).

#### Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using SPSS version 17.0 (SPSS, Chicago, IL). Comparison between groups was made using a two-sided Fisher's exact test. We used the Kaplan–Meier method to estimate OS and log rank for comparisons. OS was defined as time from diagnosis to death or last follow-up. All  $P$  values reported are two-sided and a  $P$  value  $< 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

#### SNP-A Karyotyping Results

SNP-A results are summarized in Table 1. SNP-A analysis enabled the detection of aberrations in 31 (50%) out of 62 patients: 21 with CNA, 2 with CNA plus CN-LOH, and 8 with only CN-LOH.

We performed SNP-A of BM samples in 47 patients and of PB samples in 15 patients. Eight out of 31 aberrations were detected in PB samples and 23 in BM. There were no differences in either the number or the type of alterations observed in PB or BM.

SNP-A abnormalities were most frequently found in chromosomes 1, 3, 5, and 7. Focusing on characteristic cytogenetic MDS aberrations, we observed 10 cases involving deletion of 5q (all of them also observed in the FISH study) and 6 cases

with 7q abnormalities (4 deletions, observed in the FISH study also, and 2 CN-LOH). In one patient, del(5q) was detected by FISH but not by SNP-A. In seven (11%) cases we observed a complex karyotype ( $\geq 3$  numerical aberrations) by SNP-A.

We detected 19 significant CN-LOH in 10 patients, seven affecting the telomeric region and 18 in interstitial position. Median size of telomeric lesions was 9.3 and 32.2 Mb in the interstitial ones. We also detected six interstitial CN-LOH smaller than 20 Mb. A list of selected genes located in aberrant regions with potential role in the disease is provided in Table 1.

#### Clinical Relevance of Defects in Patients with Failed MC

Follow-up information of 60 patients was available. Median follow-up for surviving patients was 8.9 months (range 0.4–95.9). Median OS for the entire cohort was 31.2 months (95% CI: 14.16–48.20). Twenty-six (43%) patients were dead at the time of the analysis. We examined whether identification of chromosomal abnormalities had any impact on patient prognosis. We analyzed the survival of patients with or without abnormalities (CNA and/or CN-LOH) detected by SNP-A. No significant difference was found. However, when we considered only the presence of CNA, survival of patients with CNA detected by SNP-A was worse compared with those without CNA (median 7.7 months [95% CI: 5.7–9.8] vs. 43.4 months [95% CI: 21.4–69.37];  $P = 0.010$ ) (Fig. 1).

We grouped patients by IPSS cytogenetic risk categories (low, intermediate, and high) with the CNA information obtained by SNP-A. There were differences in terms of survival (median 46.03 months [95% CI: 11.48–80.58] vs. 31.63 months [95% CI: 0.01–66.84] vs. 6.54 months [95% CI: 1.42–11.66];  $P = 0.000$ ). We observed the same results when we grouped patients in the five cytogenetic risk categories according the IPSS-R (median 46.03 months [95% CI: 8.15–83.90] vs. 31.63 months [95% CI: 0–67.56] vs. 4.43 months [95% CI: not calculable] vs. 6.53 months [95% CI: 0–15.02];  $P = 0.000$ ). In our series, no patient was classified in the cytogenetic category of very good prognosis. Survival analysis are summarized in Table 2.

#### Results of the 54 Patients with MDS According to 2008 WHO Classification

Median follow-up was 11.15 months (range 0.36–95.93). Median OS for the WHO MDS



TABLE 1. Cytogenetic Lesions Detected by SNP-A

Array	Gender	WHO 2008 subtype	Sample	Metaphase cytogenetics	FISH	SNP-A results				IPSS-R CG Risk	IPSS-R	IPSS-R CG Risk	IPSS-R
						Loss	Gain	CN-LOH (selected genes)	IPSS CG Risk				
1	6.0	M	RCUD	PB	No mitoses	Absence 5q-	No	No	No	Low	Low	Good	low
2	6.0	M	RCMD	PB	No mitoses	Absence 5q-	No	No	3q25.1qter (MLF1, TERC, THPO, DBA5) 1pterp15.5 4p15.32p13 6q23.2q26 (MYB) 7q31.2q34	Low	Low	Good	Very Low
3	6.0	M	RCMD	PB	No mitoses	Absence 5q-	No	No	No	Low	Low	Good	Low
4	6.0	M	MDS-U	PB	No mitoses	Presence 5q-	3pterp24.3 (FANC2) 5q12.3q33.3	No	No	Intermediate	Intermediate-1	Good	Low
5	6.0	F	RCMD	PB	46,XX[8]	Absence 5q-	No	No	No	Low	Low	Good	Low
6	6.0	M	RAEB-I	PB	No mitoses	Absence 5q-	No	No	No	Low	Intermediate-1	Good	Low
7	6.0	M	RCMD	PB	No mitoses	Absence 5q-	No	No	No	Low	Intermediate-1	Good	Low
8	6.0	M	RAEB-I	PB	No mitoses	Presence 5q- Presence 7q-	5q13.1q35.3 7q22.1q36.3 13q13.1q13.3 13q14.13q31.2 (RB1) 13q31.3q32.2 15q11.1q21.2 (BCL8, CDANI) Chr. 18	1p36.33p36.13 13q13.3q14.13 13q31.3q31.3	High	Intermediate-2	Very Poor	Very High	
9	6.0	M	RCMD	PB	No mitoses	Absence 5q-	No	No	No	Low	Low	Good	Intermediate
10	6.0	F	RCUD	BM	No mitoses	Presence 5q-	5q22.1q33.3	No	No	Low	Low	Good	Very low
11	6.0	M	RCMD	PB	No mitoses	Absence 5q-	No	No	2p25.3p25.1 (SF3B1)* 2q31.1q35 (CASP10) 5p15.2p12.10p15.3p14 <sup>b</sup> 16p13.1p13.3	Low	Low	Good	Very low
12	6.0	M	RCMD	PB	No mitoses	Absence 5q-	No	No	No	Low	Low	Good	Very low
13	6.0	M	RARS	PB	No mitoses	Absence 5q-	No	No	No	Low	Low	Good	Very low
14	6.0	M	RCMD	PB	No mitoses	Absence 5q-	No	No	3q23q26.1(MLF1)	Low	Low	Good	Very low
15	6.0	F	RCMD	BM	No mitoses	Absence 5q-	No	No	No	Low	Low	Good	Very low
16	6.0	F	RAEB-2	BM	No mitoses	Absence 5q-	No	No	No	Low	Intermediate-2	Good	High
17	6.0	F	RCMD	PB	No mitoses	Absence 5q-	No	Chr. X	No	Intermediate	Intermediate-1	Intermediate	Low
18	6.0	M	RCMD	BM	No mitoses	Absence 5q-	No	No	No	Low	Low	Good	Very low
19	6.0	M	RCMD	BM	No mitoses	5q- (21% abnormal cells)	No	No	No	Low	Low	Good	Very low
20	6.0	F	RAEB-2	PB	No mitoses	Absence 5q-	No	No	No	Low	Intermediate-2	Good	Very high
21	6.0	F	RCMD	BM	No mitoses	Absence 5q-	No	No	11q14.1q23.1	Low	Low	Good	Low
22	6.0	M	RCMD	BM	No mitoses	Absence 5q-	No	No	No	Low	Low	Good	Low
23	6.0	M	Unknown	BM	No mitoses	Absence 5q-	No	No	No	Low	NC	Good	NC
24	6.0	M	RCMD	BM	No mitoses	Absence 5q-	No	No	No	Low	Low	Good	Low
25	6.0	M	RCMD	BM	No mitoses	Absence 5q- Presence +8	No	Chr. 8	No	Intermediate	Intermediate-1	Intermediate	Intermediate
26	6.0	F	Unknown	BM	No mitoses	Absence 5q-	No	No	No	Low	Low	Good	Very low

TABLE I. (Continued)

Array		WHO 2008	Metaphase	SNP-A results				CN-LOH						
Gender	Age	subtype	Sample	cytogenetics	FISH	Loss	Gain	(selected genes)	IPSS	IPSS-R	CG Risk	CG Risk	IPSS-R	
F	6.0	RAEB-I	BM	No mitoses	Absence 5q-	No	No	No	Low	NC	Low	Low	NC	
M	6.0	Unknown	BM	No mitoses	Absence 5q-	No	No	1p31.3p21.3 (MPL) 2p16.3p13.3* 4pterp16.1 9pterp24.2	Low	NC	Low	Low	NC	
F	6.0	RARS	BM	No mitoses	Absence 5q-	No	No	No	Low	Low	Low	Low	Low	
M	6.0	Unknown	BM	No mitoses	Absence 5q-	No	No	No	Low	NC	Low	Low	NC	
F	6.0	RCMD	BM	No mitoses	Absence 5q-	No	No	7q11.2q22.2 12pterp13.31 14q22.2q24.3	Low	Intermediate-1	Low	Low	Low	
F	6.0	RAEB-2	BM	No mitoses	Presence 5q-	3q25.33q25.33 5q14.3q23.1 5q23.1q33.3 12p13.31p12.3 18q22.1q22.2 20q11.23q13.2 4q21.22q27 5q11.2qter 7p12.1p11.2 7q11.22q11.22 7q11.21qter 12q21.2q21.2 13q13.3q21.2 13q21.2q21.31 13q34q34 17p13.3p11.2 7pterp12.111q14.1q- terChr. X	9p24.1p24.1	High	High	High	High	Very poor	Very high	
M	6.0	RAEB-I	BM	No mitoses	Absence 5q-	12p13.31p12.3 18q22.1q22.2 20q11.23q13.2 4q21.22q27 5q11.2qter 7p12.1p11.2 7q11.22q11.22 7q11.21qter 12q21.2q21.2 13q13.3q21.2 13q21.2q21.31 13q34q34 17p13.3p11.2 7pterp12.111q14.1q- terChr. X	No	Intermediate	Intermediate-2	Intermediate	Intermediate	Intermediate	High	
F	6.0	RAEB-I	BM	No mitoses	Presence 20q- Presence 5q- Presence 7q-	4q21.22q27 5q11.2qter 7p12.1p11.2 7q11.22q11.22 7q11.21qter 12q21.2q21.2 13q13.3q21.2 13q21.2q21.31 13q34q34 17p13.3p11.2 7pterp12.111q14.1q- terChr. X	3q25.1q28	High	Intermediate-2	High	High	Very poor	Very high	
M	6.0	RAEB-I	BM	No mitoses	Absence 5q-	7pterp12.111q14.1q- terChr. X	No	No	High	Intermediate-2	High	High	High	
F	6.0	RAEB-2	BM	No mitoses	NP	No	No	No	Low	NC	Low	Low	NC	
M	6.0	RAEB-I	BM	No mitoses	Absence 5q-	21q22.12q22.12 7q	No	No	Intermediate	Intermediate-2	Intermediate	Intermediate	Intermediate	
M	6.0	RCMD	BM	No mitoses	Absence 5q- Presence 7q-	7q	1q	No	High	Intermediate-2	Poor	Poor	Intermediate	
F	6.0	RCMD	BM	No mitoses	Presence 5q-	5q22.1q31.3	No	No	Low	Low	Low	Low	Very low	
F	6.0	RCMD	BM	No mitoses	Absence 5q-	No	No	No	Low	Low	Low	Low	Low	
M	6.0	Unknown	BM	No mitoses	Absence 5q-	No	No	No	Low	NC	Low	Low	NC	
F	6.0	Unknown	BM	No mitoses	Absence 5q-	9p11.2p11.1 5q13.3q35.3 7q11.21q36.3 12p13.32p12.1 13q13.1q13.3 13q13.1q13.3 13q14.3q21.1 13q14.2q14.3 13q14.12q14.2 17q25.1q25.3 17p13.3p11.2 17p13.3p11.2	5p14.3 12p12.1p11.23 13 13q12.11q13.1 13q14.2 13q14.3 13q31.1q34 17q21.2q21.31 17q22q23.2 17q23.2q24.3 17q25.3	Intermediate	Intermediate-2	Intermediate	Intermediate	Intermediate	Intermediate	Intermediate
M	6.0	Unknown	BM	No mitoses	Presence 5q- Presence 7q-	7q11.21q36.3 12p13.32p12.1 13q13.1q13.3 13q13.1q13.3 13q14.3q21.1 13q14.2q14.3 13q14.12q14.2 17q25.1q25.3 17p13.3p11.2 17p13.3p11.2	No	High	NC	High	High	Very poor	NC	

TABLE 1. (Continued)

Array	Gender	WHO 2008 subtype	Sample	Metaphase cytogenetics	FISH	Loss	Gain	SNP-A results				
								IPSS	IPSS CG Risk	IPSS-R CG Risk	IPSS-R	
44	6.0	M	Unknown	BM	No mitoses NP	No	No	3q12.3q13.31* 4q32.1q32.2* 6q25.3q2.7* 14q12q22.1	Low	NC	Good	NC
45	6.0	M	Unknown	BM	No mitoses NP	No	No		Low	NC	Good	NC
46	6.0	F	Unknown	BM	No mitoses NP	16p11.2	13q14.2q22.3	No	Intermediate	NC	Intermediate	NC
47	6.0	M	Unknown	BM	No mitoses NP	6p21.1	No	No	Intermediate	NC	Intermediate	NC
48	6.0	F	Unknown	BM	No mitoses NP	No	22q13.32	No	Intermediate	NC	Intermediate	NC
49	6.0	F	Unknown	BM	Absence 5q-	No	14q11.1q11.2 8p11.21q24.3 8p23.3p12	No	High	NC	Poor	NC
50	6.0	M	Unknown	BM	No mitoses NP	No	No	No	Low	NC	Good	NC
51	6.0	M	Unknown	BM	No mitoses Absence 5q-	No	No	No	Low	NC	Good	NC
52	6.0	M	Unknown	BM	No mitoses Absence 5q-	No	No	No	Low	NC	Good	NC
53	6.0	F	Unknown	BM	No mitoses Absence 5q-	No	No	No	Low	NC	Good	NC
54	6.0	M	Unknown	BM	No mitoses Absence 5q-	No	No	No	Low	NC	Good	NC
55	6.0	M	Unknown	BM	No mitoses Absence 5q-	No	16p13.3	No	Intermediate	NC	Intermediate	NC
56	250K	F	Unknown	BM	No mitoses NP	No	No	No	Low	NC	Good	NC
57	250K	M	Unknown	BM	No mitoses NP	No	No	No	Low	NC	Good	NC
58	250K	F	Unknown	BM	No mitoses NP	No	No	No	Low	NC	Good	NC
59	250K	M	Unknown	BM	No mitoses Presence 5q-	5q14.3q34	18q12.2	No	Intermediate	NC	Good	NC
60	250K	M	Unknown	BM	No mitoses Presence 5q-	16p21.1 5q21.2q33.2	No	2p22.3 8p23.1p23.2	Intermediate	NC	Good	NC
61	250K	F	Unknown	BM	No mitoses Absence 5q-	No	1p36.31pter	1p36.31pter	Intermediate	NC	Good	NC
62	250K	M	Unknown	BM	No mitoses Presence 5q- Presence +8	1p35.2p36 5q12.1q21.3 5q21.3qter	1p31.2p35.2 5p12.1pter 5q21.2q21.3 chr. 8 chr. 12 chr. 21	No	High	NC	Very poor	NC

M: male; F: female; WHO: World Health Organization; RCUD: refractory cytopenia with multilineage dysplasia; RCMD: refractory cytopenia with multilineage dysplasia; MDS-U: myelodysplastic syndrome unclassified; RAEB: refractory anaemia with excess of blasts; RARS: refractory anaemia with ringed sideroblasts; PB: peripheral blood; BM: bone marrow; NP: not performed; CN-LOH: copy number neutral loss of heterozygosity; IPSS CG risk: International Scoring Prognostic System cytogenetic risk group; IPSS: International Scoring Prognostic System risk group; NC: not calculable; IPSS-R CG Risk: IPSS-Revised cytogenetic risk group; IPSS-R: IPSS-Revised risk group.

\*CN-LOH smaller than 20 Mb.

cohort was 32.36 months (95% CI: 7.94–56.77). Twenty-two (40%) patients were dead at the time of the analysis. As in the whole series, when we considered the presence or not of CNA by SNP-A, OS of patients with CNA was worse compared with those without CNA (median 7.72 months [95% CI: 6.91–8.52] vs. 45.37 months [95% CI: 21.56–69.22];  $P = 0.019$ ) (Fig. 2).

Considering that the most frequent cytogenetic abnormalities in MDS are unbalanced chromosomal abnormalities (gains and losses), we tentatively assessed the IPSS risk group of the 35 patients with clinical and morphologic data available, using the CNAs information obtained by SNP-A to determine the cytogenetic risk category. We clustered the patients into low/intermediate-1

risk and intermediate-2/high risk and observed differences in OS (median: 67.77 [95% CI: not calculable] vs. 7.95 months [95% CI: 5.09–10.82];  $P = 0.002$ ) (Fig. 3). In the same way, we calculated the revised IPSS (IPSS-R) and also noted differences in survival after grouping patients into two categories, very low/low/intermediate and high/very high (median: 67.77 [95% CI: not calculable] vs. 7.95 months [95% CI: 5.053–10.85];  $P = 0.001$ ) (Fig. 4).

DISCUSSION

MC is a robust, reliable, and extremely useful technique in the diagnosis of hematologic disorders, particularly in MDS. However, in certain

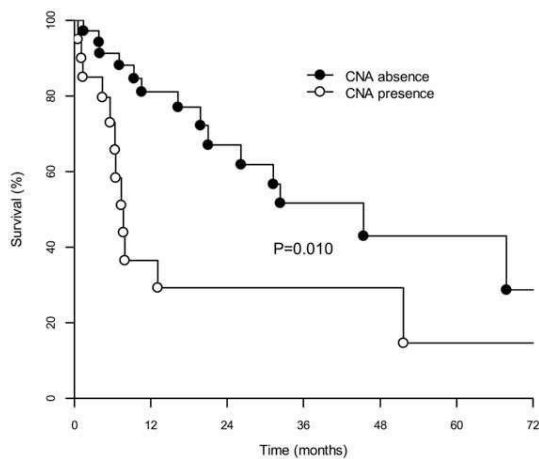


Figure 1. Kaplan–Meier survival curve of patients with or without copy number alterations (CNA) detected by SNP-A. Whole series ( $P = \text{log-rank test}$ ).

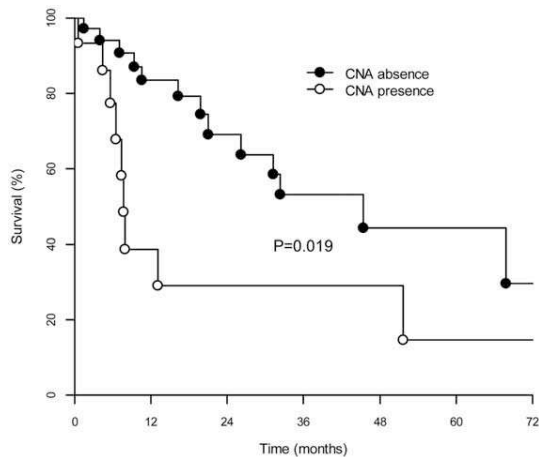


Figure 2. Kaplan–Meier survival curve of patients with or without copy number alterations (CNA) detected by SNP-A. MDS according to 2008 WHO classification ( $P = \text{log-rank test}$ ).

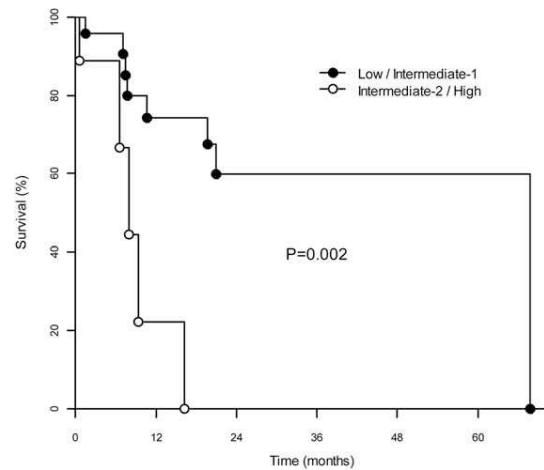


Figure 3. Kaplan–Meier survival curve of patients within individual IPSS risk groups considering SNP-A results ( $P = \text{log-rank test}$ ). Patients were grouped in low/intermediate-1 risk and intermediate-2/high risk.

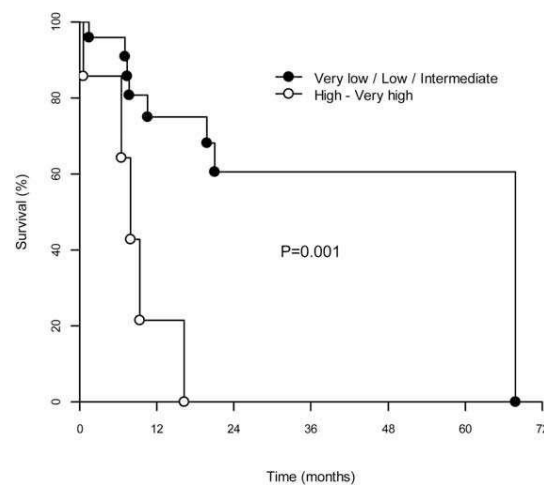


Figure 4. Kaplan–Meier survival curve of patients within individual IPSS-R risk groups considering SNP-A results ( $P = \text{log-rank test}$ ). Patients were grouped in very low/low/intermediate risk and high/very high risk.

TABLE 2. Survival Analysis with Cytogenetic Information Obtained by SNP-A

Factor	Median survival (months)	95% CI	P
<b>Aberrations detected by SNP-A</b>			
CNA	7.7	5.7–9.8	0.010
No CNA	43.4	21.4–69.37	
<b>IPSS cytogenetic risk categories</b>			
Good	46.03	11.48–80.58	0.000
Intermediate	31.63	0.01–66.84	
Poor	6.54	1.42–11.66	
<b>IPSS-R cytogenetic risk categories</b>			
Very good	no patients		0.000
Good	46.03	8.153–83.90	
Intermediate	31.63	0–67.56	
Poor	4.43	NC	
Very Poor	6.538	0–15.02	
<b>IPSS category</b>			
Low/intermediate-1	67.77	NC	0.002
Intermediate-2/high	7.95	5.09–10.82	
<b>IPSS-R category</b>			
Low/low/intermediate	67.77	NC	0.001
High/very high	7.95	5.053–10.85	

IPSS: international scoring prognostic system; IPSS-R: IPSS- Revised.

patients cytogenetic testing does not yield informative results, hindering the application of prognostic schemes, such as IPSS or IPSS-R and leading to loss of important diagnostic and prognostic information. It is difficult to establish the actual incidence of MC study failure because it is highly variable among centers, but it has been estimated to be about 6–20% (Cervera et al., 2009; Jiang, 2012). MDS Spanish Registry and the German-Austrian MDS Study Group evaluated the characteristics, outcome and prognostic factors of a large series of 247 MDS patients with unsuccessful conventional cytogenetic study, and compared with those of a group of 2,418 patients with successful cytogenetic study (Cervera et al., 2009). They found that the median OS of patients with unsuccessful cytogenetics was comparable to that of patients belonging to the IPSS intermediate cytogenetic risk category, suggesting that unsuccessful cytogenetics have an independent prognostic impact in MDS. Probably, MDS with unsuccessful conventional cytogenetic study is a heterogeneous group, in some cases due to disease related factors but in others due to technical problems.

Identification of new defects with the use of DNA-based techniques, such as CGH-A and SNP-A, may complement MC and improve the diagnosis and prognostication in MDS and other myeloid malignancies. The concurrent use of SNP-A, FISH, and MC in the initial cytogenetic evaluation of patients with hematologic conditions

has been proposed by some authors (Tiu et al., 2011; Merkerova et al., 2012). DNA-based techniques are particularly useful in samples that are inadequate for cytogenetic analysis. This is likely due to the fact that they do not require culture and can be performed on extracted DNA, easily obtainable from even very paucicellular specimens. SNP-A provides a whole genome approach with a good resolution for CNA and CN-LOH. Its disadvantages are the inability to detect balanced chromosomal aberrations, although these changes are rare in MDS (Costa et al., 2013), or the failure to detect minor pathologic clones (Maciejewski et al., 2009). FISH has a higher sensitivity, with detection of aberrations with minimal number of clonal cells in the sample, but its utility is limited to the detection of particular lesions (Cherry et al., 2003; Jiang et al., 2012).

The clinical usefulness of SNP-A as a karyotyping platform in MDS and other hematologic disorders has been previously reported (Mohamedali et al., 2007; Gondek et al., 2008; Heinrichs et al., 2009; Tiu et al., 2011; Merkerova et al., 2012), but to our knowledge this is the largest series of MDS patients with an unsuccessful routine MC study. We observed that application of SNP-A karyotyping allows for establishment of karyograms and thereby detection of the presence of clonal chromosomal aberrations in this subset of MDS patients. The present SNP-A application detected aberrations in 31 (50%) out of 62 patients, eight of

which were detected in PB. We did not observe differences in either the proportion or the type of alterations observed in PB or BM. A good correlation between BM and PB FISH results in MDS patients has been described. PB samples have been proposed as an optimal specimen to monitor the clinical course using FISH, in some cases being able to detect cytogenetic alterations before clinical manifestations (Braulke et al., 2010; Cherry et al., 2012). In myeloproliferative neoplasms, PB samples have been used successfully to perform SNP-A analysis (Rumi et al., 2011). In MDS, a recent study showed an excellent concordance both for SNP-A karyotype and mutational analyses between BM and PB, although with a lower clonal burden in PB (Mohamedali et al., 2013). Our results also show that the SNP-A technique could be used successfully in PB MDS samples.

In the present study, among 62 MDS patients with unsuccessful MC, SNP-A revealed abnormalities in half of them. These included some of the most characteristic MDS aberrations detected by MC such as del(5q), chromosome 7 abnormalities (-7/7q-) and trisomy of chromosome 8 in 10, 5, and 2 cases, respectively, replicating the frequencies of these recurrent defects in patients with successful MC exam (Solé et al., 2005; Haase et al., 2007). We have also identified large defects involving chromosomes 1, 12, and 13. All these aberrations are clearly somatic and have been described previously in myeloid malignancies by MC studies (Solé et al., 2005; Haase et al., 2007). FISH analysis could also identify these lesions, although if a broad panel of probes is needed the cost-effectiveness of SNP-A is higher.

In one of our cases we detected del(5q) by FISH but not by SNP-A; we apply FISH technique routinely in all patients with failed MC (Mallo et al., 2008). This discrepancy could be explained by the low tumor burden in this patient (FISH analysis on cultured cells revealed 5q deletion in 21% of nuclei) and the sensitivity of the SNP-A technique is estimated to be around 20% for losses.

In our series, the detection of CNA by SNP-A could have clinical relevance as shown by its impact on OS. Identification of chromosomal aberrations with poor prognostic value is of clear clinical significance and may affect clinical management. It has been reported that use of SNP-A in the evaluation of patients with MDS and related cancers was able to delineate further cytogenetic risk groups determined by MC as defined by IPSS (Mohamedali

et al., 2007). In our cases, we had no cytogenetic information due to MC failure, so we examined the effect of CNA defects detected by SNP-A on the IPSS risk groups. Patients categorized in the low/intermediate-1 risk category had better OS than patients in the intermediate-2/high risk category. Similar results were observed when the CNA aberrations were used to determine the cytogenetic risk category and to calculate the IPSS-R.

One of the major advantages of SNP-A as compared to CGH-A is detection of CN-LOH or uniparental disomy (UPD), a common defect in hematologic malignancies and present in 20% of MDS (Gondek et al., 2008; O'Keefe et al., 2010). CN-LOH are valuable markers for identifying segments that can harbor mutations in genes, including *EZH2*, *CBL*, *TET2*, and *TP53* (Kralovics et al., 2002, 2005; Delhommeau et al., 2009; Lange-meijer et al., 2009; Heinrichs et al., 2010; Jasek et al., 2010; Nikoloski et al., 2010). Somatic point mutations are common in MDS and are associated with specific clinical features (Bejar et al., 2011). We report the identification of CN-LOH in ten out of 62 patients, which based on size ( $\geq 20$  Mb) and location (telomeric) were considered of somatic origin. Some of these aberrations affect regions containing genes previously reported as important in MDS pathogenesis. Another six interstitial CN-LOH, smaller than 20 Mb in size, were detected. One of these small aberrations was located in 2p25.3p25.1, a region that contains a gene component of RNA splicing machinery, *SF3B1*, whose mutations are related to the presence of ring sideroblasts (Malcovati et al., 2011; Patnaik et al., 2012). The patient who had this CN-LOH did not show  $\geq 15\%$  ring sideroblasts and no sample was available to verify the possible presence of an *SF3B1* mutation. Whether CN-LOH provides important prognostic information or not, is a question to be addressed in prospective studies with larger cohorts using SNP-A technology.

In summary, our results show that the SNP-A technique can be used successfully on PB and BM samples in patients with unsuccessful MC analysis and its application leads to improved prognostic classification according to IPSS in this group of patients. Our results demonstrate that a large proportion of such cases harbor clinically relevant lesions. The identification of CNA by SNP-A karyotyping would improve the diagnostic and prognostic evaluation of these subset of MDS patients. Recurrent areas of acquired CN-LOH are lesions widely present in MDS, but their definitive impact awaits a formal prognostic analysis in larger



patient series. Therefore, we suggest that in cases with failed MC, SNP-A should be included as a promising tool for both diagnosis as well as prognostic stratification.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Eulalia Puigdecamet for her SNP array advice and Sergi Mojal for his statistical assistance.

#### REFERENCES

- Bejar R, Stevenson K, Abd-El-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, Kantarjian H, Raza A, Levine RL, Neuberg D, Ebert BL. 2011. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* 364:2496–2506.
- Bennett JM, Canovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Grunick HR, Sultan C. 1982. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 51:189–199.
- Brauker F, Schanz J, Jung K, Shimeshan K, Schulte K, Schuetz C, Steffens R, Trümper L, Haase D. 2010. FISH analysis of circulating CD34+ cells as a new tool for genetic monitoring in MDS: Verification of the method and application to 27 MDS patients. *Leuk Res* 10:1296–1301.
- Bruning RD, Ozci A, Germing U, Le Beau MM, Porwit A, Baumann I, Vladimirov JW, Hellstrom-Lindberg E. 2008. Myelodysplastic syndromes. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, editors. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon: IARC, pp. 87–107.
- Cervera J, Solé F, Haase D, Luño E, Such E, Nomdedeu B, Costa D, Bernal T, Vallespi T, Bueno J, Pedraza C, Mallo M, Ardanaz MT, Calasanz MJ, del Cañizo C, Hernández-Rivas JM, Schanz J, Steidl C, Hildebrandt B, Carbonell F, Otero M, Ramos F, Marco V, Tomo M, Gómez V, Andreu R, Xicoy B, Amigo ML, Muñoz JA, Bonanad S, Arizabalaga B, Senent ML, Germing U, Sanz GF. Prognostic impact on survival of an unsuccessful conventional cytogenetic study in patients with myelodysplastic syndromes. In: *Leukemia Research 2009*; 33: Abstracts of the 10th International symposium on myelodysplastic syndromes, Patras (Greece) 6–9 May 2009. Abstract number: P030.
- Cherry AM, Bruckman SR, Paternoster SF, Hicks GA, Neuberg D, Higgins RR, Bennett JM, Greenberg PL, Miller K, Tallman MS, Rowe J, Dewald GW. 2003. Comparison of interphase FISH and metaphase cytogenetics to study myelodysplastic syndrome: An Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) study. *Leuk Res* 27:1085–1090.
- Cherry AM, Slovak ML, Campbell LJ, Chun K, Eclache V, Haase D, Haferlach C, Hildebrandt B, Iqbal AM, Juanwar SC, Ohyashiki K, Solé F, Vandenberghe P, VanDyke DL, Zhang Y, Dewald GW. 2012. Will a peripheral blood (PB) sample yield the same diagnosis and prognostic cytogenetic data as the concomitant bone marrow (BM) in myelodysplasia? *Leuk Res* 36: 832–840.
- Costa D, Muñoz C, Carrío A, Nomdedeu M, Calvo X, Solé F, Luño E, Cervera J, Vallespi T, Bemeaga D, Gómez C, Añás A, Such E, Sanz G, Gnu J, Insunza A, Calasanz MJ, Ardanaz MT, Hernández JM, Azaceta G, Alvarez S, Sánchez J, Martín ML, Bargay J, Gómez V, Cervero C, Allegue MJ, Collado R, Campo E, Nomdedeu B, on behalf of the Spanish Group of Myelodysplastic Syndromes (GESMD). 2013. Reciprocal translocations in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia: Review of 5,654 patients with an evaluable karyotype. *Genes Chromosomes Cancer* 52:751–761.
- Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Massé A, Kozmider O, Le Couedic JP, Robert F, Albesani A, Lédoux Y, Flo I, Dreyfus FJ, Marzac C, Casadevall N, Lacombe C, Romana SP, Dessen P, Soulier J, Vigué F, Fontenay M, Vainchenker W, Benaïd OA. 2009. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med* 360:2289–2301.
- Gondek LP, Haddad AS, O'Keefe CL, Tiu R, Wlodarski MW, Sekeres MA, Theil KS, Maciejewski JP. 2007. Detection of cryptic chromosomal lesions including acquired segmental uniparental disomy in advanced and low-risk myelodysplastic syndromes. *Exp Hematol* 35:1728–1738.
- Gondek LP, Tiu R, O'Keefe CL, Sekeres MA, Theil KS, Maciejewski JP. 2008. Chromosomal lesions and uniparental disomy detected by SNP arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-derived AML. *Blood* 11:1534–1542.
- Greenberg P, Cox C, Le Beau MM, Fenaux P, Masiel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D, Ohyashiki K, Toyama K, Aul C, Muftić G, Bennett J. 1997. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 89:2079–2088.
- Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, Bennett JM, Bowen D, Fenaux P, Dreyfus F, Kantarjian H, Koedgen A, Lewis A, Malcovati L, Cazzola M, Germak J, Fontana C, Le Beau MM, Slovak ML, Krieger O, Luebbert M, Maciejewski J, Magalhães SM, Miyazaki Y, Pfeilstückler M, Sekeres M, Sperr WR, Stauder R, Tiu R, Valent P, Vallespi T, van de Loosdrecht AA, Germing U, Haase D. 2012. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* 120:2454–2465.
- Haase D, Germing U, Schanz J, Pfeilstückler M, Nüsslinger T, Hildebrandt B, Kundgen A, Lübbert M, Kunzmann R, Giagounidis A, Aul C, Trümper L, Krieger O, Stauder R, Müller TH, Witzel F, Valent P, Fontana C, Steidl C. 2007. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: Evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* 110:4385–4395.
- Heinrich S, Kulkarni RV, Bueno-Ramos CE, Levine RL, Loh ML, Li C, Neuberg D, Komblau SM, Issa JP, Gilliland DG, Garcia-Manero G, Kantarjian HM, Estey EH, Look AT. 2009. Accurate detection of uniparental disomy and microdeletions by SNP array analysis in myelodysplastic syndromes with normal cytogenetics. *Leukemia* 23:1605–1613.
- Heinrich S, Li C, Look AT. 2010. SNP array analysis in hematologic malignancies: Avoiding false discoveries. *Blood* 115:4157–4161.
- Jock M, Gondek LP, Bejanyan N, Tiu R, Huh J, Theil KS, O'Keefe C, McDevitt MA, Maciejewski JP. 2010. TP53 mutations in myeloid malignancies are either homozygous or hemizygous due to copy number neutral loss of heterozygosity or deletion of 17p. *Leukemia* 24:216–219.
- Jiang H, Xue Y, Wang Q, Pan J, Wu Y, Zhang J, Bai S, Wang Q, He G, Sun A, Wu D, Chen S. 2012. The utility of fluorescence in situ hybridization analysis in diagnosing myelodysplastic syndromes is limited to cases with karyotype failure. *Leuk Res* 36: 448–452.
- Kalavric R, Guan Y, Prehal JT. 2002. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp Hematol* 30:229–236.
- Kalavric R, Passamonti F, Buser AS, Tes SS, Tiedt R, Pawieg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC. 2005. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 353:1779–1790.
- Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, Knops R, Adaryan MG, Massop M, Stevens-Lindens E, van Hoogen P, van Kessel AG, Raymakers RA, Kamping EJ, Verhoef GE, Verburgh E, Hagemeijer A, Vandenberghe P, de Witte T, van der Reijden BA, Jansen JH. 2009. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet* 41:838–842.
- Maciejewski JP, Tiu RV, O'Keefe C. Application of array-based whole genome scanning technologies as a cytogenetic tool in hematological malignancies. 2009. *Br J Haematol* 146:479–488.
- Malcovati L, Papaemmanuil E, Bowen DT, Boulwood J, Della Porta MG, Pascutto C, Tringolo E, Ganes MJ, Godfrey AL, Ambaglio I, Galli A, Da Via MC, Conte S, Tasso S, Keenan N, Hyalop A, Hinton J, Mudie LJ, Wainscoat JS, Futreal PA, Stanton MR, Campbell PJ, Hellström-Lindberg E, Cazzola M. 2011. Chronic Myeloid Disorders Working Group of the International Cancer Genome Consortium and of the Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative. Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood* 117:6239–6246.
- Mallo M, Arenillas L, Espinet B, Salido M, Hernández JM, Lumbrales E, del Rey M, Aranz E, Ramiro S, Font P, González O, Renedo M, Cervera J, Such E, Sanz GF, Luño E, Sanz C, González M, Calasanz MJ, Mayans J, García-Ballesteros C, Amigo V, Collado R, Oliver I, Carbonell F, Bureo E, Insunza A, Yañez L, Muñozbal MJ, Gómez-Beltrán E, Andreu R, León P, Gómez V, Sanz A, Cazorla N, Moreno

- E, Alegre A, Martín ML, Pedro C, Serrano S, Florensa L, Solé F. 2008. Fluorescence in situ hybridization improves the detection of 5q31 deletion in myelodysplastic syndromes without cytogenetic evidence of 5q-. *Haematologica* 93:1001–1008.
- Merkerova MD, Bystricka D, Belickova M, Krejcik, Z, Zemanova Z, Polak J, Hajkova H, Brezina J, Michalova K, Cermak J. 2012. From cryptic chromosomal lesions to pathologically relevant genes: Integration of SNP-array with gene expression profiling in myelodysplastic syndrome with normal karyotype. *Genes Chromosomes Cancer* 51:419–428.
- Mohamedali A, Gäken J, Twine NA, Ingram W, Westwood N, Lea NC, Hayden J, Donaldson N, Aul C, Gattermann N, Giagounidis A, Germing U, List AF, Mufti GJ. 2007. Prevalence and prognostic significance of allelic imbalance by single-nucleotide polymorphism analysis in low-risk myelodysplastic syndromes. *Blood* 110:3365–3373.
- Mohamedali A, Alkhatibi H, Kulasekararaj A, Shinde S, Mian S, Malik F, Smith A, Gäken J, Mufti GJ. 2013. Utility of peripheral blood for cytogenetic and mutation analysis in myelodysplastic syndrome. *Blood* 122:567–570.
- Nikoloski G, Langemeijer SM, Kuiper RP, Knops R, Massop M, Tönnissen ER, van der Heijden A, Scheele TN, Vandenberghe P, de Witte T, van der Reijden BA, Jansen JH. 2010. Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet* 42:665–667.
- O'Keefe C, McDevitt MA, Maciejewski JP. 2010. Copy neutral loss of heterozygosity: A novel chromosomal lesion in myeloid malignancies. *Blood* 115:2731–2739.
- Patnaik MM, Lasho TL, Hodnefield JM, Knudson RA, Ketterling RP, Garcia-Manero G, Steensma DP, Pardanani A, Hanson CA, Tefferi A. 2012. SF3B1 mutations are prevalent in myelodysplastic syndromes with ring sideroblasts but do not hold independent prognostic value. *Blood* 120:569–572.
- Rumi E, Harutyunyan A, Elena C, Pietra D, Klampfl T, Bagienski K, Berg T, Casetti I, Pascutto C, Passamonti F, Kralovics R, Cazzola M. 2011. Identification of genomic aberrations associated with disease transformation by means of high-resolution SNP array analysis in patients with myeloproliferative neoplasm. *Am J Hematol* 86:974–979.
- Solé F, Luno E, Sanzo C, Espinet B, Sanz GF, Cervera J, Calasanz MJ, Cigudosa JC, Milla F, Ribera JM, Bureo E, Marquez ML, Arranz E, Florensa L. 2005. Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 90: 1168–1178.
- Tiu RV, Gondek LP, O'Keefe CL, Elson P, Huh J, Mohamedali A, Kulasekararaj A, Advani AS, Paquette R, List AF, Sekeres MA, McDevitt MA, Mufti GJ, Maciejewski JP. 2011. Prognostic impact of SNP array karyotyping in myelodysplastic syndromes and related myeloid malignancies. *Blood* 117:4552–4560.





## **IV. DISCUSIÓN**



Los síndromes mielodisplásicos constituyen un conjunto heterogéneo de enfermedades agrupadas por varios rasgos comunes como son la hematopoyesis ineficaz y la displasia morfológica. En los últimos años, se han desarrollado sistemas de clasificación e índices pronósticos basados fundamentalmente en datos analíticos, morfológicos y citogenéticos. La heterogeneidad en su presentación clínica así como el solapamiento de algunas de sus características con otras entidades, convierte a los SMD en una enfermedad difícil de diagnosticar. Asimismo, bajo el diagnóstico de SMD se incluyen entidades con una evolución clínica muy variable, desde procesos indolentes con supervivencias esperadas de más de 10 años a cuadros más agresivos con una esperanza de vida de pocos meses. Dado que el tratamiento de los pacientes con SMD se indica en función a su riesgo, es de vital importancia una adecuada evaluación pronóstica.

En el primero de los trabajos que compone la presente tesis se han evaluado las potenciales dificultades en el diagnóstico morfológico de los SMD según la clasificación OMS y se han propuesto estrategias de mejora. El segundo de los trabajos evalúa si establecer el porcentaje de blastos de MO en base a la celularidad no eritroide tienen un impacto en la predicción del riesgo de los pacientes con SMD. Por último, en el tercer trabajo, se estudió la aplicabilidad y utilidad de la técnica de SNP *arrays* en pacientes con SMD en los que no se había conseguido un estudio citogenético convencional adecuado, y por tanto, carentes de una información indispensable para evaluar su riesgo. A continuación se discutirán los resultados obtenidos en cada uno de ellos.

### **PRIMER TRABAJO**

A pesar de los importantes avances en el conocimiento genético y molecular de los síndromes mielodisplásicos, la citología óptica sigue siendo la piedra angular de su diagnóstico. Este estudio se diseñó con el objetivo de evaluar la variabilidad entre observadores a la hora de aplicar los criterios diagnósticos propuestos por la clasificación OMS 2008 y definir potenciales dificultades. De forma global, en nuestro trabajo encontramos una moderada reproducibilidad en la clasificación 2008.

El porcentaje de blastos en médula ósea es uno de los principales factores pronósticos en los SMD,<sup>1,7,39,43</sup> y ha sido incluido en los índices pronósticos más utilizados<sup>120,121,132</sup>. Por tanto, es crucial una correcta identificación de los blastos. La clasificación FAB definía dos tipos de blastos, tipo I y tipo II. Ambas células estaban definidas en líneas generales como células con una elevada relación nucleocitoplasmática, una cromatina poco condensada y nucleolos generalmente visibles, y se diferenciaban entre ellas por la presencia (tipo II) o ausencia (tipo I) de granulación.<sup>43</sup> Posteriormente Goasguen *et al* describieron un tercer tipo de blasto, el blasto tipo III, con las características generales de la célula blástica pero con más de 20 finos gránulos azurófilos.<sup>183</sup> Esta última definición no tuvo una gran aceptación, siendo éstas células consideradas promielocitos por la mayoría de los autores. La clasificación de la OMS no da ninguna recomendación específica para la definición de las células blásticas. En 2008, Mufti y colaboradores del IWG-MDS expusieron las dificultades en el diagnóstico morfológico de los blastos.<sup>44</sup> En dicho trabajo, los expertos definieron los mieloblastos en base a varias características nucleares (alta relación nucleocitoplasmática, nucléolos fácilmente visibles y, habitualmente pero no invariablemente, cromatina fina) y citoplasmáticas (basofilia variable, ausencia de zona clara, que corresponde al aparato de Golgi), y recomendaron la terminología agranular (tipo I en clasificación FAB) y granular (tipo II en clasificación FAB y III definido por Goasguen). La mayor dificultad en la identificación de los blastos en los SMD radica en la distinción entre el blasto granular y el promielocito, que habitualmente presente dismorfias (hipo y desgranulación). En nuestro trabajo encontramos un acuerdo casi perfecto entre observadores en el recuento de blastos de MO en casos con <5% o con  $\geq 10\%$  blastos. En aquellos casos con blastos  $\geq 5\%$  y <10%, la tasa de concordancia fue moderada. Esto implica que un paciente puede ser clasificado como AREB-1 ó AREB-2 dependiendo del observador. Evaluamos además la concordancia interobservador para el punto de corte de 2% que propone el IPSS-R.<sup>121</sup> El grado de acuerdo fue óptimo para los casos con  $\leq 2\%$  de células blásticas pero, de nuevo, no fue tan bueno para los casos con recuentos de blastos entre 2% y 5%. Datos similares fueron encontrados por Font *et al*.<sup>184</sup> Para minimizar estas discrepancias las guías clínicas recomienda la realización del mielograma en al menos 500 células.<sup>36,61,62</sup> La tinción inmunohistoquímica con anti-CD34 en muestras de biopsia de médula ósea puede ser

útil para realizar una estimación del número de blastos, sin embargo, este recuento no debe sustituir nunca al realizado mediante citología.<sup>1,36</sup> Del mismo modo, la evaluación cuantitativa de los blastos de MO mediante citometría de flujo presenta ciertas limitaciones. lo que dificulta su exactitud y reproducibilidad (variabilidad en el procesamiento de la muestra, muestras hemodiluidas, dificultad de identificación de los blastos respecto a otras poblaciones celulares, no siempre expresan el antígeno CD34, etc).<sup>117</sup> Por todo ello, la determinación de la cifra de blastos mediante otras técnicas puede ser orientativa pero nunca sustituir a la citología óptica que, hoy por hoy, sigue siendo la técnica *gold-standard*.

Establecer de forma adecuada el porcentaje de blastos en SP también es vital para el diagnóstico y clasificación de los pacientes con SMD.<sup>185</sup> En nuestro estudio, encontramos un acuerdo débil en el recuento de blastos de sangre periférica. Este resultado podría deberse al escaso número de células blásticas presentes habitualmente en SP. Las discrepancias entre observadores podrían solventarse incrementando el número de células en los recuentos diferenciales.

Varios estudios han correlacionado la presencia de displasia multilinea (displasia en al menos 2 de las tres series mieloides) con un peor pronóstico en SMD sin exceso de blastos,<sup>48,144</sup> concepto que se incorporó en la clasificación OMS<sup>1,39,7</sup> Además, el hallazgo de neutrófilos hiposegmentados tipo *Pelger* ( $\geq 10\%$ ) y micromegacariocitos ( $\geq 10\%$ ) se ha relacionado con una menor supervivencia.<sup>138</sup> La distinción entre displasia unilínea y multilinea ha sido criticada por algunos grupos, ya que la evaluación de los rasgos morfológicos de displasia es en ocasiones difícil debido a la escasez de parámetros objetivos.<sup>184,186-188</sup> En nuestro trabajo encontramos un moderado grado de acuerdo entre observadores en el diagnóstico de los rasgos de dismegacariopoyesis y disgranulopoyesis, pero fue pobre para la displasia eritroide. Esto probablemente se debe a que los rasgos de displasia más frecuentemente observados en la serie megacariocítica (núcleos sueltos, núcleos monolobulados, micromegacariocitos, etc) y en la granulocítica (hipo/agranularidad, anomalía pseudo-*Pelger-Huët*, etc) son más objetivos y reproducibles que los rasgos de la displasia de la serie eritroide (asincronismo madurativo, distribución anómala de la hemoglobina, etc). En un intento de mejorar la identificación de los signos de displasia el IWGM-MDS ha publicado varios documentos de consenso en los que se revisa la definición de

mieloblastos y sideroblastos en anillo, la evaluación morfológica de los monocitos y sus precursores, definición de los signos disgranulopoyesis y dismegacariopoyesis.<sup>44,70-72</sup>

Otra de las posibles dificultades podría estar relacionada con que el criterio del 10% para considerar una línea como displásica está muy próximo a los valores de displasia observados en personas sanas y considerados fisiológicos. Esto podría afectar sobre todo a la serie megacariocítica donde se evalúan un número menor de elementos (p.ej: si se valoran 30 elementos, encontrar únicamente 3 dismórficos ya implicaría la presencia de displasia significativa). Algunos autores sugieren elevar este umbral o establecer umbrales diferentes para cada una de las líneas mieloides.<sup>73</sup> En nuestro trabajo se analizó la concordancia interobservador elevando el punto de corte al 40%. Observamos que el acuerdo mejoraba en la línea megacariocítica y en la granulocítica, pero no en la línea eritroide. Estos resultados concuerdan con los de Matsuda<sup>138</sup> y Germing<sup>48</sup> que propusieron cambiar el umbral del 10 al 40%. Todos los estudios en este sentido coinciden en que para la correcta evaluación de los rasgos de displasia se requiere un material con buena calidad técnica y profesionales experimentados.<sup>69</sup>

El presente trabajo, aunque realizado en un número limitado de pacientes, fue el primero en analizar la concordancia interobservador al aplicar los criterios morfológicos de la clasificación OMS 2008. Se observó un grado de acuerdo moderado a la hora de establecer el subtipo OMS. Las principales discrepancias estaban relacionadas con la distinción entre displasia unilínea y multilínea. La concordancia también fue menor en aquellos pacientes con cifras de blastos cercanas a los umbrales que definen los grupos. Resultados similares habían sido observados por Howe y colaboradores al estudiar la clasificación OMS 2001.<sup>189</sup>

En la revisión de la clasificación OMS 2016 ha sido referenciado este trabajo.<sup>7</sup>

## SEGUNDO TRABAJO

En este estudio se analizaron las características clínico-patológicas de 465 pacientes con SMD con incremento de eritropoyesis (cifra de eritroblastos igual o superior al 50%), la serie más amplia de este grupo de SMD publicada hasta el momento. Asimismo se estudiaron 3227 pacientes con menos de 50% de eritroblastos diagnosticados en el mismo periodo, analizados como grupo control.

Aproximadamente un 15% de los SMD presenta incremento de la serie eritroide, aunque no constituyen un subtipo individualizado dentro de la clasificación OMS 2008 ya que presentan características clínicas y citogenéticas similares al resto de SMD.<sup>190,191</sup> En nuestra serie, aunque la media del porcentaje de blastos en los pacientes con SMD con <50% de eritroblastos fue significativamente mayor que en los SMD-E, no se observaron diferencias en SG entre ambos grupos de pacientes. Esto resulta llamativo ya que son numerosos los estudios que demuestran el importante peso pronóstico del porcentaje de blastos en MO en los SMD.<sup>1,7,39,43</sup>

En el capítulo de la clasificación de la OMS 2008 en la que se explican y argumentan los cambios incluidos en dicha clasificación, se expone la falta de consenso que se produjo entre los miembros del comité sobre el mejor método para enumerar los blastos de médula ósea en los pacientes con SMD e incremento de la serie eritroide, sobre la totalidad celular o sobre la celularidad no eritroide. Finalmente recomendaron realizar un recuento de la celularidad no eritroide, si en éste el número de blastos era  $\geq 20\%$  se debía establecer el diagnóstico de LA eritroide/mieloide o eritroleucemia, y si era <20% se debía establecer el diagnóstico de SMD. En esta última circunstancia, recomendaban considerar la cifra de blastos resultante del recuento de la TC para establecer el subtipo de SMD.<sup>1</sup> En el presente estudio evaluamos el impacto de ambos métodos en la clasificación y evaluación pronóstica de los SMD, en primer lugar, en los pacientes con SMD-E, y a continuación, en toda la serie.

Al realizar el recuento de blastos de la CNE, aproximadamente una quinta parte de los pacientes con SMD-E clasificados en categorías con <5% de blastos de la TC, fueron reclasificados en categorías con exceso de blastos. La SG de estos pacientes que cambiaron a categorías de más alto riesgo fue significativamente inferior a la de los pacientes que no cambiaron de categoría y a la de los pacientes en categorías con <5% de blastos del grupo control. Cabe destacar que siguiendo la recomendación de la OMS



2008, es decir contar los blastos de la TC, el diagnóstico de AREB-2 en pacientes con SMD-E es prácticamente imposible, quedando limitado a los infrecuentes casos con 5- <20% blastos en SP o con bastones de Auer, ya que los pacientes con SMD-E con  $\geq 10\%$  blastos en MO presentan invariablemente  $\geq 20\%$  blastos de la CNE, y por tanto, cumplen criterios de eritroleucemia. Sin embargo, al enumerar los blastos de la CNE, 72 pacientes con SMD-E (12 previamente diagnosticados dentro en categorías con menos de 5% de blastos y los 60 pacientes con AREB-1) fueron reclasificados como AREB-2, presentando una SG inferior a la de los pacientes con AREB-1 del grupo control. Estos resultados sugieren que contar los blastos de la TC en los pacientes con SMD-E infraestima su riesgo, catalogándolos de forma incorrecta. Estos resultados, derivados de una amplia serie, están en consonancia con los datos publicados por Wang y colaboradores en su estudio de 74 pacientes con SMD-E.<sup>192</sup>

En nuestra serie, la media de eritroblastos en MO fue de 58% en pacientes con SMD-E frente al 30% en los pacientes del grupo control. Por tanto, contar los blastos de la CNE únicamente en los pacientes con SMD-E podría subestimar el peso real de los blastos en el grupo de pacientes sin incremento de serie eritroide. Por este motivo, decidimos realizar el mismo análisis en toda la serie. Las categorías generadas con este nuevo modelo presentaban supervivencias diferentes. Un 12% de pacientes clasificados en categorías con menos de 5% de blastos de la TC, fueron reclasificados en categorías de mayor riesgo al contarlos de la CNE, presentando una SG menor que los pacientes que permanecieron en las categorías iniciales. En 2011, Germing y colaboradores comunicaron los datos de cómo cambiaban de categoría OMS los pacientes del registro de SMD de Düsseldorf al determinar el porcentaje de blastos de la CNE.<sup>193</sup> En dicho trabajo no se hicieron análisis de supervivencia.

En nuestro trabajo no observamos diferencias en la SG de los pacientes sin incremento de serie eritroide con más de 20% blastos de la CNE y un grupo de pacientes con eritroleucemia incluidos en el registro del GEMSD. Este hecho refuerza la idea defendida en varios estudios, entre ellos uno de nuestro grupo (en Anexos), de que la eritroleucemia está en el espectro clínico de los SMD.<sup>63,66,194-196</sup> En base a esta relación, la revisión de la OMS 2016 elimina la categoría de LAM mieloeritroide o eritroleucemia y el recuento de blastos de la CNE en todas las circunstancias. Con esto, los casos previamente diagnosticados de eritroleucemia ( $\geq 50\%$  eritroblastos, <20%

blastos de la celularidad total,  $\geq 20\%$  blastos de la celularidad no eritroide) quedarán clasificados como SMD, mayoritariamente SMD con exceso de blastos. Nuestros resultados, basados en la serie más amplia de pacientes con SMD-E publicada hasta la fecha, si bien apoyan la relación entre los SMD y la eritroleucemia, no avalan la eliminación del recuento de la CNE. En nuestra opinión, la desaparición de la eritroleucemia como categoría es inadecuada y probablemente debería constituir una categoría individualizada dentro de los SMD.

Al aplicar la recomendación de la clasificación OMS 2008 de contar los blastos de la TC, no es posible catalogar ningún paciente con SMD-E en el grupo de alto riesgo del IPSS, ya que los pacientes con 10% o más blastos en MO cumplen criterios de eritroleucemia y por tanto no evaluables con este índice. Al aplicar el IPSS contando los blastos de la CNE se generaron 4 grupos de pacientes con diferencias en SG. Aproximadamente un 9% de pacientes previamente clasificados en las categorías de más bajo riesgo fueron reclasificados en categorías de mayor riesgo, mostrando una SG inferior a 30 meses. Estos resultados están en línea con la propuesta del GESMD, que considera pacientes de alto riesgo aquellos con una mediana de SG estimada inferior a 30 meses.<sup>36,197</sup>

Este trabajo ha sido complementado por otro estudio publicado por nuestro grupo (en Anexos), en el que se demuestra que contar los blastos de la CNE permite una mejor estratificación del riesgo de los pacientes con SMD (con y sin incremento de serie eritroide) también en el contexto del IPSS-R.<sup>198</sup> Aplicando este sencillo método detectamos un grupo de pacientes etiquetados de bajo riesgo según la recomendación actual de la OMS 2008, pero que presentaban una evolución clínica mucho más cercana a la de los pacientes de alto riesgo. Además, nuestro enfoque permitió una mejor distribución de los pacientes incluidos en la categoría de riesgo intermedio del IPSS-R. Al contar los blastos de la CNE un 24% de pacientes de este grupo fueron reclasificados en las categorías de riesgo alto o muy alto, presentando una menor SG y un menor tiempo hasta la transformación leucémica. Con el método propuesto, la mediana de supervivencia de los pacientes finalmente catalogados en la categoría de riesgo intermedio es más cercana a las de los pacientes de bajo riesgo, lo cual puede tener implicaciones clínicas. Resultados similares han sido comunicados por Yu *et al* en una serie de 346 pacientes con SMD-E.<sup>199</sup>

En una publicación reciente Bennett *et al* no encontraron ventajas en la aplicación del recuento de blastos sobre la CNE en el contexto de la clasificación OMS y el IPSS-R.<sup>200</sup>

En nuestra opinión dicho trabajo tiene ciertas limitaciones. Por un lado, aunque el estudio se llevó en un amplio número de pacientes del registro de SMD de Düsseldorf (N=1448), no se disponía de la información citogenética de una gran mayoría de ellos. En estos se asumió un cariotipo normal. Dado que entre el 30 y el 50% de los pacientes con SMD presenta un cariotipo alterado, la asunción de “cariotipo normal” en los pacientes sin información citogenética introduce un sesgo metodológico. Por otro lado, la conclusión de que el nuevo método no aportaba ventajas respecto al clásico, se basó fundamentalmente en que no encontraron diferencias en términos del estadístico *Dxy*. Este test estadístico, también denominado *Somer's Dxy rank correlation*, es un método de concordancia (junto a otros como el C- índice o el CPE) utilizado para evaluar el poder discriminatorio y la precisión predictiva de modelos estadísticos.<sup>201</sup> Las características clínicas inherentes a los pacientes con SMD (edad avanzada, frecuente comorbilidad...) hacen que los métodos de concordancia probablemente no sean adecuados para establecer la idoneidad de un índice pronóstico, ya que resulta muy difícil establecer si el SMD es la verdadera causa de la muerte, especialmente en los pacientes de bajo riesgo. Por ejemplo, podría interpretarse como un error del método de predicción un paciente de 87 años diagnosticado de SMD con IPSS-R de bajo riesgo que fallece al año del diagnóstico debido a un accidente cerebrovascular. Por esta razón, los resultados derivados de los métodos de concordancia en MDS, aunque resultan útiles, deben ser interpretados con cautela dentro del contexto clínico.

Nuestro estudio demuestra que enumerar los blastos de la celularidad no eritroide mejora la evaluación pronóstica de todos los SMD, con y sin incremento de la serie eritroide. En este momento nuestro grupo está liderando un estudio dentro del IWG para validar estos resultados en una serie más amplia de pacientes.

### TERCER TRABAJO

Desde los años 60 la técnica de citogenética convencional se ha considerado la técnica *gold-standard* para el estudio de las neoplasias hematológicas, especialmente en los SMD, donde tiene un importante valor diagnóstico y pronóstico. Entre el 30 y el 50% de los pacientes con SMD presenta un cariotipo alterado.<sup>75-78</sup> Sin embargo, en un porcentaje no despreciable de pacientes el estudio citogenético convencional resulta no valorable por la obtención de un número insuficiente de metafases analizables. Dado que el cariotipo es una de las variables con mayor peso en los índices pronósticos más utilizados, estos pacientes carecen de una información fundamental en su evaluación pronóstica. Es difícil establecer la incidencia real del fracaso del estudio citogenético ya que es altamente variable entre los centros, pero se ha estimado en torno a un 6-20%.<sup>85,86</sup> En el año 2009, el GESMD y el grupo germano-austriaco, estudiaron las características clínicas y la evolución de 247 pacientes con SMD con estudio citogenético fallido y las compararon con una serie de 2418 pacientes con cultivo citogenético valorable. Encontraron que la mediana de SG de los pacientes “sin mitosis” fue comparable a la del grupo intermedio de riesgo citogenético del IPSS, sugiriendo que la no obtención de metafases tendría un valor pronóstico independiente.<sup>85</sup> Probablemente, los pacientes en los que falla el cultivo citogenético no constituyen un grupo homogéneo ya que las causas por las que el cultivo fracasa son variables, pudiendo deberse tanto a características intrínsecas de la enfermedad como a problemas técnicos (muestra insuficiente, cultivo en centro de referencia muchas horas después de la extracción de la muestra, etc).

En los últimos años se han desarrollado técnicas genómicas que permiten la detección de alteraciones en base al estudio del número de copias del ADN, como son los *arrays* de CGH y de SNP. Estas técnicas han demostrado ser técnicas complementarias a la citogenética convencional y al FISH en diversas hemopatías, entre ellas los SMD.<sup>157,202</sup> Pueden resultar de gran utilidad en situaciones en las que el cultivo citogenético no es valorable, ya que no requieren cultivo celular sino una pequeña cantidad de ADN que se puede obtener fácilmente incluso en muestras hipocelulares.

La técnica de SNP *arrays* permite la evaluación del genoma completo y ha demostrado una gran resolución para la detección de CNA y CN-LOH. Una posible desventaja es que

no permite la detección de alteraciones cromosómicas balanceadas, sin embargo, esto no supondría un problema importante en los SMD ya que son alteraciones muy poco frecuentes en esta enfermedad.<sup>203-205</sup> Otra posible limitación sería una baja sensibilidad, estimada en torno al 20% para las pérdidas de cromosomas, con lo cual no permitiría la detección de clones minoritarios.<sup>182</sup> La técnica de FISH tiene una mayor sensibilidad, permitiendo la detección de alteraciones que afectan a un escaso número de células en una muestra, pero su utilidad está limitada a la detección de las alteraciones para las que se aplica la sonda.<sup>86,153</sup>

La utilidad clínica de los SNP *arrays* en los SMD ya había sido evaluada por otros autores,<sup>155-157,202,206</sup> sin embargo hasta la publicación de este trabajo, ningún estudio había evaluado su utilidad concreta en SMD en los que no se había obtenido cultivo citogenético. En nuestro trabajo se demuestra la utilidad de la aplicación de SNP *arrays* para la detección de alteraciones cromosómicas clonales en este subgrupo de pacientes. Con esta técnica observamos la presencia de alteraciones en el 50% de los pacientes de la serie. Se observaron alteraciones tanto en muestras de MO como de SP, sin diferencias entre la proporción ni el tipo de alteraciones observadas en ambas fuentes de ADN. Esto está en línea con lo publicado por Mohamedali y colaboradores que observaron una buena correlación en la detección de alteraciones mediante SNP *arrays* en muestras de MO y SP de SMD.<sup>207</sup>

En nuestro estudio observamos alteraciones en 31 de los 62 pacientes, algunas de las alteraciones frecuentemente observadas en SMD como del(5q), alteraciones en el cromosoma 7 (-7/7q-) y trisomía 8, con incidencia similar a la descrita mediante citogenética convencional.<sup>76,77</sup> Asimismo, observamos alteraciones de gran tamaño que afectaban a los cromosomas 1, 12 y 13. Estas alteraciones son somáticas y habían sido descritas previamente mediante citogenética convencional en patología mieloides.<sup>76,77</sup> Todas estas alteraciones habrían podido ser diagnosticadas también mediante FISH, pero habría sido necesario aplicar una amplia batería de sondas. En estas circunstancias la técnica de SNP *arrays* presentaría una relación coste/eficacia mayor. En uno de los pacientes estudiados, se observó la presencia de del(5q) mediante FISH pero no por SNP *arrays*. Esta discrepancia podría ser explicada por la baja carga tumoral del paciente, ya que sólo el 21% de los núcleos analizados por FISH presentaba la alteración, cifra muy cercana a la sensibilidad de la técnica de *arrays*.

En nuestra serie, la detección de CNA mediante SNP *arrays* tiene relevancia clínica ya que se asoció a una peor SG. El papel complementario de los SNP *arrays* a las técnicas de citogenética convencional para definir pacientes con alto riesgo citogenético ya había sido validado.<sup>207</sup> En nuestro estudio, al no disponer de cariotipo, se empleó el resultado de los *arrays* como sustitutos del estudio citogenético convencional para establecer el grupo de riesgo citogenético del IPSS. Al calcular el IPSS para toda la cohorte, observamos que los pacientes clasificados en las categorías de riesgo bajo/intermedio-1 presentaban una mejor SG que los pacientes clasificados en las categorías de riesgo intermedio-2/alto. Se observaron resultados similares al calcular el IPSS-R.

Una de las ventajas que aporta la técnica de SNP *arrays* es la detección de CN-LOH, una alteración frecuente en hemopatías y presente hasta en un 20% de los SMD.<sup>208,209</sup> El hallazgo recurrente de determinadas CN-LOH ha permitido la identificación de segmentos que contienen mutaciones, tales como *EZH2*, *CBL*, *TET2* y *TP53*.<sup>98,210–215</sup> En el presente trabajo, 10 de los 62 pacientes presentaban CN-LOH, que por su tamaño y localización fueron consideradas somáticas. Algunas de estas alteraciones se encontraban localizadas en regiones que contienen genes importantes en la patogenia de los SMD. Son necesarios estudios más amplios para determinar si la presencia de CN-LOH puede tener utilidad en la evaluación pronóstica de los pacientes con SMD.

En base a estos resultados, las guías españolas para el diagnóstico y tratamiento de los SMD referencian nuestro trabajo en su recomendación de aplicar la técnica de SNP *arrays* en aquellos pacientes en los que no se dispone de cultivo citogenético valorable.<sup>36</sup>



## **V. CONCLUSIONES**





1. El estudio de reproducibilidad de la clasificación OMS 2008 muestra que:
  - 1.1. El grado de acuerdo entre observadores para establecer el subtipo OMS 2008 es moderado.
  - 1.2. La concordancia entre observadores para establecer el porcentaje de blastos de médula ósea es bajo en aquellos pacientes con SMD con cifras de blastos cercanas a los umbrales que definen los subtipos.
  - 1.3. El grado de acuerdo interobservador para el porcentaje de blastos de sangre periférica es débil.
  - 1.4. Para una correcta evaluación de los rasgos de displasia se requiere un material con buena calidad técnica y profesionales experimentados.
  - 1.5. El grado de acuerdo entre observadores en la evaluación de los rasgos de dismegacariopoyesis y disgranulopoyesis es moderado, pero es pobre para la displasia de la serie eritroide.
  - 1.6. Elevar el umbral del 10% al 40% para considerar una línea como displásica mejora el grado de acuerdo en la línea megacariocítica y en la granulocítica, pero no en la eritroide.
  - 1.7. Es necesaria una mejor definición de los signos de displasia.
  
2. En el estudio de los SMD con incremento de la serie eritroide observamos que:
  - 2.1. Aproximadamente un 15% de los SMD presenta incremento de la serie eritroide. Éstos presentan características citogenéticas y clínicas similares al resto de SMD.
  - 2.2. Contar los blastos de médula ósea de la celularidad no eritroide, en lugar de en la totalidad celular, mejora la evaluación pronóstica de los SMD con incremento de serie eritroide ( $\geq 50\%$  eritroblastos) tanto al aplicar la clasificación OMS 2008 como el IPSS.
  - 2.3. Contar los blastos de médula ósea de la celularidad no eritroide, en lugar de en la totalidad celular, mejora la evaluación pronóstica de todos los SMD al aplicar la clasificación OMS 2008 y el IPSS.

3. El estudio de SNP *arrays* en SMD en los que no se obtuvieron metafases en el estudio citogenético convencional muestra que:
  - 3.1. La aplicación de *arrays* de SNP en estos pacientes permitió la detección alteraciones en un 50% de los mismos. Esto supone una importante herramienta diagnóstica.
  - 3.2. Los *arrays* de SNP pueden aplicarse con éxito tanto en muestras de médula ósea como de sangre periférica en pacientes con SMD. No se observan diferencias en el número y tipo de alteraciones detectadas mediante SNP *arrays* en muestras de médula ósea y sangre periférica.
  - 3.3. La detección de CNA mediante SNP *arrays* se asocia a una peor supervivencia global en nuestra serie.
  - 3.4. Los resultados de CNA obtenidos mediante SNP *arrays* pueden ser empleados para establecer el grupo de riesgo citogenético del IPSS e IPSS-R en los pacientes en los que no se dispone de un cultivo citogenético convencional.
  - 3.5. Las CN-LOH son alteraciones frecuentes en los SMD. Su valor pronóstico debe ser evaluado en series más amplias.





## **VI. BIBLIOGRAFÍA**



1. Swerdlow S, Campos E, Lee Harris N et al., editor. No Title. In: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press; 2008. p. 87–107.
2. Germing U, Strupp C, Kündgen A, Bowen D, Aul C, Haas R, et al. No increase in age-specific incidence of myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2004 Aug;89(8):905–10.
3. Rollison DE, Howlader N, Smith MT, Strom SS, Merritt WD, Ries LA, et al. Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States , 2001-2004 , using data from the NAACCR and SEER programs Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the Un. Program. 2008;112(1):45–52.
4. Cogle CR, Craig BM, Rollison DE, List AF. Incidence of the myelodysplastic syndromes using a novel claims-based algorithm: High number of uncaptured cases by cancer registries. *Blood*. 2011;117(26):7121–5.
5. Xiaomei M. Epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Am J Med*. 2012;125(Supplement):S2-5.
6. Visser O, Trama A, Maynadié M, Stiller C, Marcos-Gragera R, De Angelis R, et al. Incidence, survival and prevalence of myeloid malignancies in Europe. *Eur J Cancer*. 2012;48(17):3257–66.
7. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Borowitz MJ, Beau MM Le, Bloomfield CD, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391–406.
8. Ertz-Archambault N, Kosiorek H, GE T, al et. Association of therapy for autoimmune disease with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *JAMA Oncol*. 2017 Jul 1;3(7):936-943.
9. Bensefa-Colas L, Telle-Lamberton M, Paris C, Faye S, Stocks SJ, Luc A, et al. Occupational allergic contact dermatitis and major allergens in France: Temporal trends for the period 2001-2010. *Br J Dermatol*. 2014;171(6):1375–85.
10. Strom SS, Gu Y, Gruschkus SK, Pierce SA, Estey EH. Risk factors of myelodysplastic syndromes: a case–control study. *Leukemia*. 2005;19(11):1912–8.
11. West AH, Godley LA, Churpek JE. Familial myelodysplastic syndrome/acute leukemia syndromes: A review and utility for translational investigations. *Ann N Y Acad Sci*. 2014;1310(1):111–8.
12. Yoshida K, Toki T, Okuno Y, Kanazaki R, Shiraishi Y, Sato-Otsubo A, et al. The landscape of somatic mutations in Down syndrome–related myeloid disorders. *Nat Genet*. 2013;45(11):1293–9.
13. Alter BP, Giri N, Savage SA, Peters JA, Loud JT, Leathwood L, et al. Malignancies and survival patterns in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndromes cohort study. *Br J Haematol*. 2010;150(2):179–88.
14. Gerritsen BWR, Donohue J, Bauman J, Jhanwar SC, Kernan NA, Castro-malaspina H, et al. Clonal analysis of myelodysplastic syndrome: monosomy 7 is expressed in the myeloid lineage, but not in the lymphoid lineage as detected by fluorescent in situ



- hybridization. *Blood*. 1992 Jul 1;80(1):217-24.
15. Woll PS, Kjällquist U, Chowdhury O, Doolittle H, Wedge DC, Thongjuea S, et al. Myelodysplastic syndromes are propagated by rare and distinct human cancer stem cells in vivo. *Cancer Cell*. 2014;25(6):794–808.
  16. Raza A, Galili N. The genetic basis of phenotypic heterogeneity in myelodysplastic syndromes. *Nat Rev Cancer*. Nature Publishing Group; 2012;12(12):849–59.
  17. Anastasi J, Feng J, Le Beau MM, Larson R a, Rowley JD, Vardiman JW. Cytogenetic clonality in myelodysplastic syndromes studied with fluorescence in situ hybridization: lineage, response to growth factor therapy, and clone expansion. *Blood*. 1993;81(6):1580–5.
  18. Raza A, Mundle S, Iftikhar A, Gregory S, Marcus B, Khan Z, et al. Simultaneous assessment of cell kinetics and programmed cell death in bone marrow biopsies of myelodysplastics reveals extensive apoptosis as the probable basis for ineffective hematopoiesis. *Am J Hematol*. 1995 Mar;48(3):143–54.
  19. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman P V., Mar BG, et al. Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *N Engl J Med*. 2014;371(26):2488–98.
  20. Busque L1, Patel JP, Figueroa ME, Vasanthakumar A, Provost S, Hamilou Z, et al. Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. *Nat Genet*. 2012;44(11):1179-81.
  21. Xie M, Lu C, Wang J, McLellan MD, Johnson KJ, Wendl MC, et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med*. 2014;20(12):1472–8.
  22. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, et al. Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence. *N Engl J Med*. 2014;371(26):2477–87.
  23. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, Lindsley RC, Sekeres MA, Hasserjian RP, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2015;126(1):9–16.
  24. Itzykson R, Fenaux P. Epigenetics of myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2014;28(3):497–506.
  25. Bulycheva E, Rauner M, Medyouf H, Theurl I, Bornhäuser M, Hofbauer LC, et al. Myelodysplasia is in the niche: novel concepts and emerging therapies. *Leukemia*. 2015;29(2):259–68.
  26. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, Tauro S, Gundem G, Loo P Van, et al. CME Article Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2013;122(22):3616–27.
  27. Bejar R, Stevenson KE, Caughey BA, Abdel-Wahab O, Steensma DP, Galili N, et al. Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2012;30(27):3376–82.
  28. Mossner M, Jann JC, Wittig J, Nolte F, Fey S, Nowak V, et al. Mutational hierarchies in

- myelodysplastic syndromes dynamically adapt and evolve upon therapy response and failure. *Blood*. 2016;128(9):1246–9.
29. Malcovati L, Karimi M, Papaemmanuil E, Ambaglio I, Jädersten M, Jansson M, et al. SF3B1 mutation identifies a distinct subset of myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts. *Blood*. 2015;126(2):233–41.
  30. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. Nature Publishing Group; 2011;478(7367):64–9.
  31. Papaemmanuil E, Cazzola M, Boultonwood J, Malcovati L, Vyas P, Bowen D, et al. Somatic SF3B1 Mutation in Myelodysplasia with Ring Sideroblasts. *N Engl J Med*. 2011;365(15):1384–95.
  32. Takahashi K, Jabbour E, Wang X, Luthra R, Bueso-Ramos C, Patel K, et al. Dynamic acquisition of FLT3 or RAS alterations drive a subset of patients with lower risk MDS to secondary AML. *Leukemia*. 2013 Oct;27(10):2081-3.
  33. Lindsley RC, Mar BG, Mazzola E, Grauman P V, Shareef S, Allen SL, et al. Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. *Blood*. 2015;125(9):1367–77.
  34. Sperling AS, Gibson CJ, Ebert BL. The genetics of myelodysplastic. *Nat Publ Gr*; 2016;17(1):5–19.
  35. Bejar R. Myelodysplastic Syndromes Diagnosis: What Is the Role of Molecular Testing? *Curr Hematol Malig Rep*. 2015 Sep;10(3):282-91.
  36. Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos (GESMD); Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH): Guías españolas de diagnóstico y tratamiento de los síndromes mielodisplásicos y la leucemia mielomonocítica crónica. [http://gesmd.es/pdfs/guias\\_smd/Haematologia\\_Guias\\_SMD.pdf](http://gesmd.es/pdfs/guias_smd/Haematologia_Guias_SMD.pdf)
  37. Al-Kali A, Clinic Cancer Center Stefan Barta MK, P Fox Chase Cancer Center M, Bejar R, Bennett JM, Hetty Carraway C, et al. Myelodysplastic Syndromes NCCN Guidelines ® NCCN Myelodysplastic Syndromes Panel Members. 2017;15(1):60–87.
  38. Malcovati L, Hellstr E, Bowen D, Ad L, Cermak J, Can C, et al. Review Article Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults : recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood*. 2013;122(17):2943–64.
  39. Brunning RD, Bennett JM, Flandrin G, Matutes E, Head D, Vardiman JW et al. No Title. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H VJ, editor. World Health Organization classification of tumours Pathology&genetics Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press; 2001. p. 62–73.
  40. Valent P, Horny HP, Bennett JM, Fonatsch C, Germing U, Greenberg P, et al. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leuk Res*. 2007;31(6):727–36.
  41. Valent P, Jäger E, Mitterbauer-Hohendanner G, Müllauer L, Schwarzingler I, Sperr WR, et al. Idiopathic bone marrow dysplasia of unknown significance (IDUS): definition, pathogenesis, follow up, and prognosis. *Am J Cancer Res*. 2011;1(4):531–41.

42. Valent P, Bain BJ, Bennett JM, Wimazal F, Sperr WR, Mufti G, et al. Idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS) and idiopathic dysplasia of uncertain significance (IDUS), and their distinction from low risk MDS. *Leuk Res.* 2012;36(1):1–5.
43. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 1982 Jun [cited 2017 Aug 20];51(2):189–99.
44. Mufti GJ, Bennett JM, Goasguen J, Bain BJ, Baumann I, Brunning R, et al. Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome: International Working Group on Morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposals for the definition and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts. *Haematologica.* 2008;93(11):1712–7.
45. Balduini CL, Guarnone R, Pecci A, Centenara E, Ascari E. Multilineage dysplasia without increased blasts identifies a poor prognosis subset of myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* 1998;12(10):1655–6.
46. Germing U, Gattermann N, Strupp C, Aivado M, Aul C. Validation of the WHO proposals for a new classification of primary myelodysplastic syndromes: a retrospective analysis of 1600 patients. *Leuk Res;*24(12):983–92.
47. Verburgh E, Achten R, Louw VJ, Brusselmans C, Delforge M, Boogaerts M, et al. A new disease categorization of low-grade myelodysplastic syndromes based on the expression of cytopenia and dysplasia in one versus more than one lineage improves on the WHO classification. *Leukemia;*21(4):668–77.
48. Germing U, Strupp C, Kuendgen A, Isa S, Knipp S, Hildebrandt B, et al. Prospective validation of the WHO proposals for the classification of myelodysplastic syndromes. *Haematologica.* 2006;91(12):1596–604.
49. Acín P, Florensa L, Andreu LL, Woessner S. Cytoplasmic abnormalities of erythroblasts as a marker for ringed sideroblasts in myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol.* 1995;54(4):276–8.
50. Woessner S, Florensa L. *La citología óptica en el diagnóstico hematológico.* 5th ed. Madrid: Acción médica; 2006.
51. Van den Berghe H, Cassiman JJ, David G, Fryns JP, Michaux JL, Sokal G. Distinct haematological disorder with deletion of long arm of no. 5 chromosome. *Nature.* 1974;251:437–8.
52. Boultonwood J, Fidler C, Strickson AJ, Watkins F, Gama S, Kearney L, et al. Narrowing and genomic annotation of the commonly deleted region of the 5q- syndrome. *Blood.* 2002;99(12):4638–41.
53. Ebert BL, Pretz J, Bosco J, Chang CY, Tamayo P, Galili N, et al. Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature.* 2008 Jan 17;451(7176):335–9.
54. Dutt S, Narla A, Lin K, Mullally A, Abayasekara N, Megerdichian C, et al. Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. *Blood.* 2011 Mar 3;117(9):2567–76.
55. Starczynowski DT, Kuchenbauer F, Argiropoulos B, Sung S, Morin R, Muranyi A, et al.

- Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q- syndrome phenotype. *Nat Med.* 2010 Jan;16(1):49–58.
56. Schneider RK, Ademà V, Heckl D, Järås M, Mallo M, Lord AM, et al. Role of casein kinase 1A1 in the biology and targeted therapy of del(5q) MDS. *Cancer Cell.* 2014 Oct 13;26(4):509–20.
  57. Buesche G, Teoman H, Wilczak W, Ganser A, Hecker H, Wilkens L, et al. Marrow fibrosis predicts early fatal marrow failure in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*;22(2):313–22.
  58. Della Porta MG, Malcovati L, Boveri E, Travaglino E, Pietra D, Pascutto C, et al. Clinical relevance of bone marrow fibrosis and CD34-positive cell clusters in primary myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol.* 2009;27(5):754–62.
  59. Ramos F, Robledo C, Izquierdo-García FM, Suárez-Vilela D, Benito R, Fuertes M, et al. Bone marrow fibrosis in myelodysplastic syndromes: a prospective evaluation including mutational analysis. *Oncotarget.* 2016;7(21):30492–503.
  60. Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos (GESMD); Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH): Guías españolas de diagnóstico y tratamiento de los síndromes mielodisplásicos y la leucemia mielomonocítica crónica. [http://gesmd.es/pdfs/guias\\_smd/Haematologia\\_Guias\\_SMD.pdf](http://gesmd.es/pdfs/guias_smd/Haematologia_Guias_SMD.pdf)
  61. Greenberg PL, Stone RM, Al-Kali A, Barta SK, Bejar R, Bennett JM, et al. Myelodysplastic Syndromes, Version 2.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 2017;15(1):60–87.
  62. Malcovati L, Hellström-Lindberg E, Bowen D, Adès L, Cermak J, Del Cañizo C, et al. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood* 2013;122(17):2943–64.
  63. Hasserjian RP, Zuo Z, Garcia C, Tang G, Kasyan A, Luthra R, et al. Acute erythroid leukemia: a reassessment using criteria refined in the 2008 WHO classification. *Blood.* 2010;115(10):1985–92.
  64. Porwit A, Vardiman JW. Acute myeloid leukemia with expanded erythropoiesis. *Haematologica.* 2011;96(9):1241–3.
  65. Zuo Z, Medeiros LJ, Chen Z, Liu D, Bueso-Ramos CE, Luthra R, et al. Acute myeloid leukemia (AML) with erythroid predominance exhibits clinical and molecular characteristics that differ from other types of AML. *PLoS One.* 2012;7(7):e41485.
  66. Grossmann V, Bacher U, Haferlach C, Schnittger S, Pöttinger F, Weissmann S, et al. Acute erythroid leukemia (AEL) can be separated into distinct prognostic subsets based on cytogenetic and molecular genetic characteristics. *Leukemia.* 2013;27(9):1940–3.
  67. Wang SA, Hasserjian RP. Acute Erythroleukemias, Acute Megakaryoblastic Leukemias, and Reactive Mimics. *Am J Clin Pathol.* 2015;144(1):44–60.
  68. Mallo M, Cervera J, Schanz J, Such E, García-Manero G, Luño E, et al. Impact of adjunct cytogenetic abnormalities for prognostic stratification in patients with myelodysplastic syndrome and deletion 5q. *Leukemia.* 2011;25(1):110–20.
  69. Bennett JM. Morphological classification of the myelodysplastic syndromes: how much

- more education of diagnosticians is necessary? *Haematologica*. 2013;98(4):490–1.
70. Goasguen JE, Bennett JM, Bain BJ, Vallespi T, Brunning R, Mufti GJ. Morphological evaluation of monocytes and their precursors. *Haematologica*. 2009;94(7):994–7.
  71. Goasguen JE, Bennett JM, Bain BJ, Brunning R, Vallespi MT, Tomonaga M, et al. Proposal for refining the definition of dysgranulopoiesis in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2014;38(4):447–53.
  72. Goasguen JE, Bennett JM, Bain BJ, Brunning RD, Vallespi MT, Tomonaga M, et al. Quality control initiative on the evaluation of the dysmegakaryopoiesis in myeloid neoplasms: Difficulties in the assessment of dysplasia. *Leuk Res*. 2016;45:75–81.
  73. Parmentier S, Schetelig J, Lorenz K, Kramer M, Ireland R, Schuler U, et al. Assessment of dysplastic hematopoiesis: lessons from healthy bone marrow donors. *Haematologica*. 2012;97(5):723–30.
  74. Della Porta MG, Travaglino E, Boveri E, Ponzoni M, Malcovati L, Papaemmanuil E, et al. Minimal morphological criteria for defining bone marrow dysplasia: a basis for clinical implementation of WHO classification of myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2014;(April):1–10.
  75. Vallespi T, Imbert M, Mecucci C, Preudhomme C, Fenaux P. Diagnosis, classification, and cytogenetics of myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 1998;83(3):258–75.
  76. Solé F, Luño E, Sanzo C, Espinet B, Sanz GF, Cervera J, et al. Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2005;90(9):1168–78.
  77. 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.
  78. Schanz J, Steidl C, Fonatsch C, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Tuechler H, et al. Coalesced multicentric analysis of 2,351 patients with myelodysplastic syndromes indicates an underestimation of poor-risk cytogenetics of myelodysplastic syndromes in the international prognostic scoring system. *J Clin Oncol*. 2011;29(15):1963–70.
  79. Smith SM, Le Beau MM, Huo D, Karrison T, Sobecks RM, Anastasi J, et al. Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: the University of Chicago series. *Blood*. 2003;102(1):43–52.
  80. Olney HJ, Le Beau MM. Evaluation of recurring cytogenetic abnormalities in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2007;31(4):427–34.
  81. Nomdedeu M, Calvo X, Pereira A, Carrió A, Solé F, Luño E, et al. Prognostic impact of chromosomal translocations in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia patients. A study by the spanish group of myelodysplastic syndromes. *Genes, Chromosom Cancer* . 2016;55(4):322–7.
  82. Haase D. Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol*. 2008;87(7):515–26.
  83. Saumell S, Solé F, Arenillas L, Montoro J, Valcárcel D, Pedro C, et al. Trisomy 8, a Cytogenetic Abnormality in Myelodysplastic Syndromes, Is Constitutional or Not? *Mills*

- K, editor. PLoS One. 2015;10(6):e0129375.
84. Simons A, Shaffer LG, Hastings RJ. Cytogenetic nomenclature: Changes in the ISCN 2013 compared to the 2009 edition. *Cytogenet Genome Res.* 2013;141(1):1–6.
  85. Cervera J, Solé F, Haase D, Luño E, Such E, Nomdedeu B, et al. Prognostic impact on survival of an unsuccessful conventional cytogenetic study in patients with myelodysplastic syndromes. In: *Leukemia Research 2009; 33: Abstracts of the 10th International symposium on myelodysplastic syndromes, Patras (Greece) 6-9 May 2009.* Abstract number: P030.
  86. Jiang H, Xue Y, Wang Q, Pan J, Wu Y, Zhang J, et al. The utility of fluorescence in situ hybridization analysis in diagnosing myelodysplastic syndromes is limited to cases with karyotype failure. *Leuk Res;*36(4):448–52.
  87. Harper ME, Saunders GF. Localization of single copy DNA sequences of G-banded human chromosomes by in situ hybridization. *Chromosoma.* 1981;83(3):431–9.
  88. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science.* 1992;258(5083):818–21
  89. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Döhner H, et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer.* 1997;20(4):399–407.
  90. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet.* 1998;20(2):207–11.
  91. Mei R, Galipeau PC, Prass C, Berno A, Ghandour G, Patil N, et al. Genome-wide detection of allelic imbalance using human SNPs and high-density DNA arrays. *Genome Res.* 2000;10(8):1126–37.
  92. Makishima H, Maciejewski JP. Pathogenesis and consequences of uniparental disomy in cancer. *Clinical Cancer Research. Clin Cancer Res.* 2011 Jun 15;17(12):3913-23
  93. Keefe CO, Mcdevitt MA, Maciejewski JP. Review article Copy neutral loss of heterozygosity: a novel chromosomal lesion in myeloid malignancies. 2010;115(14):2731–9.
  94. Maciejewski JP, Mufti GJ. Whole genome scanning as a cytogenetic tool in hematologic malignancies. *Blood.* 2008;112(4):965–74.
  95. Maciejewski JP, Tiu R V, O’Keefe C. Application of array-based whole genome scanning technologies as a cytogenetic tool in haematological malignancies. *Br J Haematol.* 2009;146(5):479–88.
  96. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2010;363(25):2424–33.
  97. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, Tauro S, Gundem G, Van Loo P, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2013;122(22):3616–27; quiz 3699.

98. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Massé A, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*. 2009;360(22):2289–301.
99. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*. 2011;364(26):2496–506.
100. Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, Okuno Y, Bacher U, Nagae G, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2013;28(2):241–7.
101. Walter MJ, Ding L, Shen D, Shao J, Grillot M, Mclellan M, et al. Recurrent DNMT3A Mutations in Patients with Myelodysplastic Syndromes. *Leukemia*. 2011;25(7):1153–8.
102. Ward PS, Patel J, Wise DR, Abdel-Wahab O, Bennett BD, Collier HA, et al. The Common Feature of Leukemia-Associated IDH1 and IDH2 Mutations Is a Neomorphic Enzyme Activity Converting  $\alpha$ -Ketoglutarate to 2-Hydroxyglutarate. *Cancer Cell*. 2010;17(3):225–34.
103. Thota S, Viny AD, Makishima H, Spitzer B, Radivoyevitch T, Sekeres MA, et al. Genetic alterations of the cohesin complex genes in myeloid malignancies Genetic alterations of the cohesin complex genes in myeloid malignancies. *Blood*. 2014;124(11):1790–8.
104. Kon A, Shih L-Y, Minamino M, Sanada M, Shiraishi Y, Nagata Y, et al. Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms. *Nat Genet*. 2013;45(10):1232–7.
105. Ok CY, Patel KP, Garcia-Manero G, Routbort MJ, Peng J, Tang G, et al. TP53 mutation characteristics in therapy-related myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia is similar to de novo diseases. *J Hematol Oncol*. 2015;8:45.
106. Bejar R. Clinical and genetic predictors of prognosis in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2014;99(6):956–64.
107. Young AL, Challen GA, Birmann BM, Druley TE. Clonal haematopoiesis harbouring AML-associated mutations is ubiquitous in healthy adults. *Nat Commun*. 2016;7:12484.
108. Malcovati L, Papaemmanuil E, Ambaglio I, Elena C, Gallì A, Della Porta MG, et al. Driver somatic mutations identify distinct disease entities within myeloid neoplasms with myelodysplasia. *Blood*. 2014;124(9):1513–21.
109. Elghetany MT. Diagnostic utility of flow cytometric immunophenotyping in myelodysplastic syndrome To the editor: Diagnostic utility of flow cytometric immunophenotyping in myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2012;98(4):391–2.
110. Westers TM, Ireland R, Kern W, Alhan C, Balleisen JS, Bettelheim P, et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: a report from an international consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leukemia*. 2012;26(7):1730–41.
111. van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VHJ, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012;26(9):1908–75.

112. Kalina T, Flores-Montero J, Lecrevisse Q, Pedreira CE, van der Velden VHJ, Novakova M, et al. Quality assessment program for EuroFlow protocols: summary results of four-year (2010-2013) quality assurance rounds. *Cytometry A*. 2015;87(2):145–56.
113. Porwit a, van de Loosdrecht a a, Bettelheim P, Brodersen LE, Burbury K, Cremers E, et al. Revisiting guidelines for integration of flow cytometry results in the WHO classification of myelodysplastic syndromes-proposal from the International/European LeukemiaNet Working Group for Flow Cytometry in MDS. *Leukemia*. 2014;28(9):1793–8.
114. van de Loosdrecht AA, Westers TM, Westra AH, Drager AM, van der Velden VHJ, Ossenkoppele GJ. Identification of distinct prognostic subgroups in low- and intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes by flow cytometry. *Blood* 2007;111(3):1067–77.
115. Ogata K, Kishikawa Y, Satoh C, Tamura H, Dan K, Hayashi A. Diagnostic application of flow cytometric characteristics of CD34+ cells in low-grade myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2006;108(3):1037–44.
116. Ogata K, Della Porta MG, Malcovati L, Picone C, Yokose N, Matsuda A, et al. Diagnostic utility of flow cytometry in low-grade myelodysplastic syndromes: a prospective validation study. *Haematologica* 2009;94(8):1066–74.
117. Ogata K, Satoh C, Hyodo H, Tamura H, Dan K, Yoshida Y. Association between phenotypic features of blasts and the blast percentage in bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2004;28(11):1171–5.
118. De Wolf-Peeters C, Stessens R, Desmet V, Tricot G, Verwilghen RL. The histological characterization of ALIP in the myelodysplastic syndromes. *Pathol - Res Pract*. 1986;181(4):402–7.
119. Mangi MH, Salisbury JR, Mufti GJ. Abnormal localization of immature precursors (ALIP) in the bone marrow of myelodysplastic syndromes: current state of knowledge and future directions. *Leuk Res*. 1991;15(7):627–39.
120. 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.
121. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012;120(12):2454–65.
122. della Porta MG, Malcovati L, Strupp C, Ambaglio I, Kuendgen A, Zipperer E, et al. Risk stratification based on both disease status and extra-hematologic comorbidities in patients with myelodysplastic syndrome. *Haematologica*. 2011;96(3):441–9.
123. Breccia M, Federico V, Loglisci G, Salaroli A, Serrao A, Alimena G. Evaluation of overall survival according to myelodysplastic syndrome-specific comorbidity index in a large series of myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2011;96(10):41–2.
124. Zipperer E, Tanha N, Strupp C, Kündgen A, Nachtkamp K, Neukirchen J, et al. The myelodysplastic syndrome-comorbidity index provides additional prognostic information on patients stratified according to the revised international prognostic scoring system. *Haematologica*. 2014;99(3).



125. Ramos F, Robledo C, Pereira A, Pedro C, Benito R, de Paz R, et al. Multidimensional assessment of patient condition and mutational analysis in peripheral blood, as tools to improve outcome prediction in myelodysplastic syndromes: A prospective study of the Spanish MDS group. *Am J Hematol.* 2017;92(9):E534–41.
126. Pedersen-Bjergaard J, Andersen MK, Christiansen DH. Therapy-related acute myeloid leukemia and myelodysplasia after high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation. *Blood.* 2000;95(11):3273–9.
127. Singh ZN, Huo D, Anastasi J, Smith SM, Karrison T, Le Beau MM, et al. Therapy-related myelodysplastic syndrome: Morphologic subclassification may not be clinically relevant. *Am J Clin Pathol.* 2007;127(2):197–205.
128. Zeidan AM, Al Ali N, Barnard J, Padron E, Lancet JE, Sekeres MA, et al. Comparison of clinical outcomes and prognostic utility of risk stratification tools in patients with therapy-related vs de novo myelodysplastic syndromes: a report on behalf of the MDS Clinical Research Consortium. *Leukemia.* 2017;31(6):1391–7.
129. Germing U, Hildebrandt B, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Valent P, Fonatsch C, et al. 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.* 2005;19(12):2223–31.
130. Gatto S, Ball G, Onida F, Kantarjian HM, Estey EH, Beran M. Contribution of  $\beta_2$  microglobulin levels to the prognostic stratification of survival in patients with myelodysplastic syndrome (MDS). *Blood.* 2003;102(5):1622–5.
131. Wallvik J, Stenke L, Bernell P, Nordahl G, Hippe E, Hast R. Serum erythropoietin (EPO) levels correlate with survival and independently predict response to EPO treatment in patients with myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol.* 2002;68(3):180–5.
132. Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, Della Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, et al. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol.* 2007;25(23):3503–10.
133. Kao JM, McMillan A, Greenberg PL. International MDS risk analysis workshop (IMRAW)/IPSS reanalyzed: impact of cytopenias on clinical outcomes in myelodysplastic syndromes. *Am J Hematol [Internet].* 2008;83(10):765–70.
134. Malcovati L, Porta MG Della, Strupp C, Ambaglio I, Kuendgen A, Nachtkamp K, et al. 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.* 2011;96(10):1433–40.
135. Sanz GF, Sanz MA, Vallespí T, Cañizo MC, Torrabadella M, García S, et al. Two regression models and a scoring system for predicting survival and planning treatment in myelodysplastic syndromes: a multivariate analysis of prognostic factors in 370 patients. *Blood.* 1989 Jul 4;74(1):395–408.
136. Cordoba I, Gonzalez-Porrás JR, Such E, Nomdedeu B, Luño E, De Paz R, et al. The degree of neutropenia has a prognostic impact in low risk myelodysplastic syndrome. *Leuk Res.* 2012;36(3):287–92.
137. Gonzalez-Porrás JR, Cordoba I, Such E, Nomdedeu B, Vallespi T, Carbonell F, et al. Prognostic impact of severe thrombocytopenia in low-risk myelodysplastic syndrome.

- Cancer. 2011;117(24):5529–37.
138. Matsuda A, Germing U, Jinnai I, Iwanaga M, Misumi M, Kuendgen A, et al. Improvement of criteria for refractory cytopenia with multilineage dysplasia according to the WHO classification based on prognostic significance of morphological features in patients with refractory anemia according to the FAB classification. *Leukemia*. 2007;21(4):678–86.
  139. Xiong B, Nie Y, Tang Z, Xue M, Zuo X. Prognostic evaluation of ALIP and CD34 immunostaining in IPSS-R subgroups of myelodysplastic syndromes. *Pathology*. 2017;49(5):526–33.
  140. Knapp RH, Dewald GW, Pierre R V. Cytogenetic studies in 174 consecutive patients with preleukemic or myelodysplastic syndromes. *Mayo Clin Proc*. 1985;60(8):507–16.
  141. Morel P, Hebbar M, Lai JL, Duhamel A, Preudhomme C, Wattel E, et al. Cytogenetic analysis has strong independent prognostic value in de novo myelodysplastic syndromes and can be incorporated in a new scoring system: a report on 408 cases. *Leukemia*. 1993;7(9):1315–23.
  142. Toyama K, Ohyashiki K, Yoshida Y, Abe T, Asano S, Hirai H, et al. Clinical implications of chromosomal abnormalities in 401 patients with myelodysplastic syndromes: a multicentric study in Japan. *Leukemia*. 1993;7(4):499–508.
  143. Maassen A, Strupp C, Giagounidis A, Kuendgen A, Nachtkamp K, Hildebrandt B, et al. Validation and proposals for a refinement of the WHO 2008 classification of myelodysplastic syndromes without excess of blasts. *Leuk Res*. 2013;37(1):64–70.
  144. Dunkley SM, Manoharan A, Kwan YL. Myelodysplastic syndromes: prognostic significance of multilineage dysplasia in patients with refractory anemia or refractory anemia with ringed sideroblasts. *Blood*. 2002;99(10):3870–1.
  145. Schanz J, Tuechler H, Sole 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.
  146. Nowell PC, Besa EC, Stelmach T, Finan JB. Chromosome studies in preleukemic states. V. Prognostic significance of single versus multiple abnormalities. *Cancer*. 1986;58(12):2571–5.
  147. Nowell PC, Besa EC. Prognostic significance of single chromosome abnormalities in preleukemic states. *Cancer Genet Cytogenet*. 1989;42(1):1–7.
  148. Billström R, Thiede T, Hansen S, Heim S, Kristoffersson U, Mandahl N, et al. Bone marrow karyotype and prognosis in primary myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol*. 1988 Oct;41(4):341–6.
  149. Pierre R V, Catovsky D, Mufti GJ, Swansbury GJ, Mecucci C, Dewald GW, et al. Clinical-cytogenetic correlations in myelodysplasia (preleukemia). *Cancer Genet Cytogenet*. 1989;40(2):149–61.
  150. White AD, Hoy TG, Jacobs A. Extended cytogenetic follow-up and clinical progress in patients with myelodysplastic syndromes (MDS). *Leuk Lymphoma*. 1994;12(5–6):401–12.

151. Bernasconi P, Klersy C, Boni M, Cavigliano PM, Calatroni S, Giardini I, et al. World Health Organization classification in combination with cytogenetic markers improves the prognostic stratification of patients with de novo primary myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 2007;137(3):193–205.
152. Pozdnyakova O, Miron PM, Tang G, Walter O, Raza A, Woda B, et al. Cytogenetic abnormalities in a series of 1,029 patients with primary myelodysplastic syndromes: a report from the US with a focus on some undefined single chromosomal abnormalities. *Cancer.* 2008;113(12):3331–40.
153. Cherry AM, Brockman SR, Paternoster SF, Hicks GA, Neuberg D, Higgins RR, et al. Comparison of interphase FISH and metaphase cytogenetics to study myelodysplastic syndrome: an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) study. *Leuk Res.* 2003;27(12):1085–90.
154. Romeo M, Chauffaille M de L, Silva MRR, Bahia DMM, Kerbauy J. Comparison of cytogenetics with FISH in 40 myelodysplastic syndrome patients. *Leuk Res.* 2002;26(11):993–6.
155. Mohamedali A, Gäken J, Twine N a, Ingram W, Westwood N, Lea NC, et al. Prevalence and prognostic significance of allelic imbalance by single-nucleotide polymorphism analysis in low-risk myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2007;110(9):3365–73.
156. Gondek LP, Tiu R, O’Keefe CL, Sekeres M a, Theil KS, Maciejewski JP. Chromosomal lesions and uniparental disomy detected by SNP arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-derived AML. *Blood.* 2008;111(3):1534–42.
157. Tiu R V, Gondek LP, O’Keefe CL, Elson P, Huh J, Mohamedali A, et al. Prognostic impact of SNP array karyotyping in myelodysplastic syndromes and related myeloid malignancies. *Blood.* 2011;117(17):4552–60.
158. Jädersten M, Saft L, Smith A, Kulasekararaj A, Pomplun S, Göhring G, et al. *TP53* Mutations in Low-Risk Myelodysplastic Syndromes With del(5q) Predict Disease Progression. *J Clin Oncol* 2011;29(15):1971–9.
159. Mallo M, del Rey M, Ibáñez M, Calasanz MJ, Arenillas L, Larráyoiz MJ, et al. Response to lenalidomide in myelodysplastic syndromes with del(5q): influence of cytogenetics and mutations. *Br J Haematol.* 2013;162(1):74–86.
160. Gerstung M, Pellagatti A, Malcovati L, Giagounidis A, Porta MG Della, Jädersten M, et al. Combining gene mutation with gene expression data improves outcome prediction in myelodysplastic syndromes. *Nat Commun.* 2015;6:5901.
161. Wells DA, Benesch M, Loken MR, Vallejo C, Myerson D, Leisenring WM, et al. Myeloid and monocytic dyspoiesis as determined by flow cytometric scoring in myelodysplastic syndrome correlates with the IPSS and with outcome after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2003;102(1):394–403.
162. Scott BL, Wells DA, Loken MR, Myerson D, Leisenring WM, Deeg HJ. Validation of a flow cytometric scoring system as a prognostic indicator for posttransplantation outcome in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood.* 2008;112(7):2681–6.
163. Alhan C, Westers TM, Cremers EMP, Cali C, Witte BI, Ossenkoppele GJ, et al. The myelodysplastic syndromes flow cytometric score: a three-parameter prognostic flow cytometric scoring system. *Leukemia.* 2016;30(3):658–65.

164. Matarraz S, López A, Barrena S, Fernandez C, Jensen E, Flores J, et al. The immunophenotype of different immature, myeloid and B-cell lineage-committed CD34+ hematopoietic cells allows discrimination between normal/reactive and myelodysplastic syndrome precursors. *Leukemia*. 2008;22(6):1175–83.
165. Malcovati L, Porta MG Della, Pascutto C, Invernizzi R, Boni M, Travaglini E, et al. Prognostic Factors and Life Expectancy in Myelodysplastic Syndromes Classified According to WHO Criteria: A Basis for Clinical Decision Making. *J Clin Oncol*. 2005;23(30):7594–603.
166. Garcia-Manero G, Shan J, Faderl S, Cortes J, Ravandi F, Borthakur G, et al. A prognostic score for patients with lower risk myelodysplastic syndrome. *Leukemia*. 2008;22(3):538–43.
167. Lee J-H, Lee J-H, Lim S-N, Kim D-Y, Kim SH, Lee Y-S, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for myelodysplastic syndrome: prognostic significance of pre-transplant IPSS score and comorbidity. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45(3):450–7.
168. Lamarque M, Raynaud S, Itzykson R, Thepot S, Quesnel B, Dreyfus F, et al. The revised IPSS is a powerful tool to evaluate the outcome of MDS patients treated with azacitidine: the GFM experience. *Blood*. 2012;120(25):5084–5.
169. Della Porta MG, Alessandrino EP, Bacigalupo A, van Lint MT, Malcovati L, Pascutto C, et al. Predictive factors for the outcome of allogeneic transplantation in patients with MDS stratified according to the revised IPSS-R. *Blood*. 2014;123(15):2333–42.
170. Ok CY, Hasserjian RP, Fox PS, Stingo F, Zuo Z, Young KH, et al. Application of the International Prognostic Scoring System-Revised in therapy-related myelodysplastic syndromes and oligoblastic acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2014;28(1):185–9.
171. Voso MT, Fenu S, Latagliata R, Buccisano F, Piciocchi A, Aloe-Spiriti MA, et al. Revised International Prognostic Scoring System (IPSS) Predicts Survival and Leukemic Evolution of Myelodysplastic Syndromes Significantly Better Than IPSS and WHO Prognostic Scoring System: Validation by the Gruppo Romano Mielodisplasie Italian Regional Database. *J Clin Oncol*. 2013;31(21):2671–7.
172. Della Porta MG, Tuechler H, Malcovati L, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, et al. Validation of WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS) for myelodysplastic syndromes and comparison with the revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R). A study of the International Working Group for Prognosis in Myelodysplasia (IWG-PM). *Leukemia*. 2015;29(7):1502–13.
173. Pfeilstöcker M, Tuechler H, Sanz G, Schanz J, Garcia-Manero G, Solé F, et al. Time-dependent changes in mortality and transformation risk in MDS. *Blood* 2016;128(7):902–10.
174. Park MJ, Kim H-J, Kim S-H, Kim DH, Kim SJ, Jang JH, et al. Is International Prognostic Scoring System (IPSS) still standard in predicting prognosis in patients with myelodysplastic syndrome? External validation of the WHO Classification-Based Prognostic Scoring System (WPSS) and comparison with IPSS. *Eur J Haematol*. 2008;81(5):364–73.
175. Alessandrino EP, Della Porta MG, Bacigalupo A, Van Lint MT, Falda M, Onida F, et al. WHO classification and WPSS predict posttransplantation outcome in patients with

- myelodysplastic syndrome: a study from the Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo (GITMO). *Blood*. 2008;112(3):895–902.
176. Kantarjian H, O'Brien S, Ravandi F, Cortes J, Shan J, Bennett JM, et al. Proposal for a new risk model in myelodysplastic syndrome that accounts for events not considered in the original International Prognostic Scoring System. *Cancer*. 2008;113(6):1351–61.
  177. Komrokji RS, Corrales-Yepe M, Al Ali N, Kharfan-Dabaja M, Padron E, Fields T, et al. Validation of the MD Anderson Prognostic Risk Model for patients with myelodysplastic syndrome. *Cancer*. 2012 May 15;118(10):2659–64.
  178. Garcia-Manero G, Shan J, Faderl S, Cortes J, Ravandi F, Borthakur G, et al. A prognostic score for patients with lower risk myelodysplastic syndrome. *Leukemia*. 2008;22(3):538–43.
  179. Saber W, Horowitz MM. Transplantation for myelodysplastic syndromes: who, when, and which conditioning regimens. *Hematology*. 2016;2016(1):478–84.
  180. de Witte T, Bowen D, Robin M, Malcovati L, Niederwieser D, Yakoub-Agha I, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for MDS and CMML: recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129(13):1753–62.
  181. McGraw KO WS. Forming inferences about some intraclass correlation coefficients. *Psychol Methods*. 1996;1:30–46.
  182. Maciejewski JP, Tiu R V, O'Keefe C. Application of array-based whole genome scanning technologies as a cytogenetic tool in haematological malignancies. *Br J Haematol*. 2009;146(5):479–88.
  183. Goasguen JE, Bennett JM, Cox C, Hambley H, Mufti G, Flandrin G. Prognostic implication and characterization of the blast cell population in the myelodysplastic syndrome. *Leuk Res*. 1991;15(12):1159–65.
  184. Font P, Loscertales J, Soto C, Ricard P, Novas CM-, Martín-Clavero E, et al. Interobserver variance in myelodysplastic syndromes with less than 5 % bone marrow blasts: unilineage vs. multilineage dysplasia and reproducibility of the threshold of 2 % blasts. *Ann Hematol*. 2015;94(4):565–73.
  185. Knipp S, Strupp C, Gattermann N, Hildebrandt B, Schapira M, Giagounidis A, et al. Presence of peripheral blasts in refractory anemia and refractory cytopenia with multilineage dysplasia predicts an unfavourable outcome. *Leuk Res* 2008;32(1):33–7.
  186. Greenberg P, Anderson J, de Witte T, Estey E, Fenaux P, Gupta P, et al. Problematic WHO reclassification of myelodysplastic syndromes. Members of the International MDS Study Group. *J Clin Oncol*. 2000;18(19):3447–52.
  187. Nösslinger T, Reisner R, Koller E, Grüner H, Tüchler H, Nowotny H, et al. Myelodysplastic syndromes, from French-American-British to World Health Organization: comparison of classifications on 431 unselected patients from a single institution. *Blood* 2001;98(10):2935–41.
  188. Font P, Loscertales J, Benavente C, Bermejo a, Callejas M, Garcia-Alonso L, et al. Interobserver variance with the diagnosis of myelodysplastic syndromes (MDS) following the 2008 WHO classification. *Ann Hematol*. 2013 Jan;92(1):19-24.

189. Howe RB, Porwit-macdonald A, Wanat R, Tehranchi R, Hellstro E. The WHO classification of MDS does make a difference. 2004;103(9):3265–70.
190. Wong E, Juneja S. Acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndromes with 50% or greater erythroblasts: a diagnostic conundrum. *Pathology*. 2015;47(4):289–93.
191. Mazzella FM, Smith D, Horn P, Cotelingam JD, Rector JT, Shrit MA, et al. Prognostic Significance of Pronormoblasts in Erythrocyte Predominant Myelodysplastic Patients. 2006;491(September 2005):484–91.
192. Wang SA, Tang G, Fadare O, Hao S, Raza A, Woda BA, et al. Erythroid-predominant myelodysplastic syndromes: enumeration of blasts from nonerythroid rather than total marrow cells provides superior risk stratification. *Mod Pathol*. 2008;21142:1394–402.
193. Germing U, Neukirchen J, Strupp C, Bach K, Wulfert M, haas R. How to assess the medullary blast count in MDS? Pay attention to the proportion of erythroid cells!. *Leuk Res*. 2011; 35:S60-S61.
194. Bacher U, Haferlach C, Alpermann T, Kern W, Schnittger S, Haferlach T. Comparison of genetic and clinical aspects in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes all with more than 50% of bone marrow erythropoietic cells. *Haematologica*. 2011;96(9):1284–92.
195. Park S, Picard F, Guesnu M, Maloum K, Leblond V, Dreyfus F. Erythroleukaemia and RAEB-t: a same disease? *Leukemia*. 2004;18(4):888–90.
196. Calvo X, Arenillas L, Luño E, Senent L, Arnan M, Ramos F, et al. Erythroleukemia shares biological features and outcome with myelodysplastic syndromes with excess blasts: a rationale for its inclusion into future classifications of myelodysplastic syndromes. *Mod Pathol*. 2016;29(12):1541–51.
197. Valcárcel D, Sanz G, Ortega M, Nomdedeu B, Luño E, Diez-Campelo M, et al. Use of newer prognostic indices for patients with myelodysplastic syndromes in the low and intermediate-1 risk categories: a population-based study. *Lancet Haematol*. 2015;2(6):e260-6.
198. Calvo X, Arenillas L, Luño E, Senent L, Arnan M, Ramos F, et al. Enumerating bone marrow blasts from nonerythroid cellularity improves outcome prediction in myelodysplastic syndromes and permits a better definition of the intermediate risk category of the Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R). *Am J Hematol*. 2017;92(7):614–21.
199. Yu Y, Zhang T, Wang Q, Wu D, Pan J, Liang J, et al. Counting bone marrow blasts as a percentage of nonerythroid cells improves the prognostic evaluation of MDS with erythroid predominance. *Am J Hematol*. 2017;92(4):E55–7.
200. Bennett JM, Tuechler H, Aul C, Strupp C, Germing U. Dysplastic erythroid precursors in the myelodysplastic syndromes and the acute myeloid leukemias: Is there biologic significance? (How should blasts be counted?). *Leuk Res*. 2016;47:63–9.
201. Gönen M, Heller G. Concordance probability and discriminatory power in proportional hazards regression. *Biometrika*. 2005;92(4):965–70.
202. Merkerova MD, Bystricka D, Belickova M, Krejcik Z, Zemanova Z, Polak J, et al. From Cryptic Chromosomal Lesions to Pathologically Relevant Genes : Integration of SNP-

- Array with Gene Expression Profiling in Myelodysplastic Syndrome with Normal Karyotype. 2012;428:419–28.
203. Costa D, Muñoz C, Carrió A, Nomdedeu M, Calvo X, Solé F, et al. Reciprocal translocations in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemias: review of 5,654 patients with an evaluable karyotype. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013;52(8):753–63.
  204. Nomdedeu M, Calvo X, Pereira A, Carrió A, Solé F, Luño E, et al. Prognostic impact of chromosomal translocations in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia patients. A study by the spanish group of myelodysplastic syndromes. *Genes Chromosomes Cancer*. 2016;55(4):322–7.
  205. Costa D, Muñoz C, Carrió A, Arias A, Gómez C, Solé F, et al. Refining the Breakpoints of Three New Translocations Identified in Myelodysplastic Syndromes. *Acta Haematol*. 2016;135(2):94–100.
  206. Heinrichs S, Kulkarni R V, Bueso-Ramos CE, Levine RL, Loh ML, Li C, et al. Accurate detection of uniparental disomy and microdeletions by SNP array analysis in myelodysplastic syndromes with normal cytogenetics. *Leukemia*. 2009;23(9):1605–13.
  207. Mohamedali AM, Alkhatabi H, Kulasekararaj A, Shinde S, Mian S, Malik F, et al. Utility of peripheral blood for cytogenetic and mutation analysis in myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2013;122(4):567–70.
  208. Gondek LP, Tiu R, Haddad a S, O’Keefe CL, Sekeres M a, Theil KS, et al. Single nucleotide polymorphism arrays complement metaphase cytogenetics in detection of new chromosomal lesions in MDS. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund, UK*. 2007;21(9):2058–61.
  209. O’Keefe C, McDevitt MA, Maciejewski JP. Copy neutral loss of heterozygosity: a novel chromosomal lesion in myeloid malignancies. *Blood*. 2010;115(14):2731–9.
  210. Kralovics R, Guan Y, Prchal JT. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp Hematol*. 2002;30(3):229–36.
  211. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo S-S, Tiedt R, Passweg JR, et al. A Gain-of-Function Mutation of *JAK2* in Myeloproliferative Disorders. *N Engl J Med*. 2005 Apr 28;352(17):1779–90.
  212. Langemeijer SMC, Kuiper RP, Berends M, Knops R, Aslanyan MG, Massop M, et al. Acquired mutations in *TET2* are common in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet*. 2009;41(7):838–42.
  213. Heinrichs S, Li C, Look a T. SNP array analysis in hematologic malignancies: avoiding false discoveries. *Blood*. 2010;115(21):4157–61.
  214. Jasek M, Gondek LP, Bejanyan N, Tiu R, Huh J, Theil KS, et al. TP53 mutations in myeloid malignancies are either homozygous or hemizygous due to copy number-neutral loss of heterozygosity or deletion of 17p. *Leukemia*. 2010;24(1):216–9.
  215. Nikoloski G, Langemeijer SMC, Kuiper RP, Knops R, Massop M, Tönnissen ERLTM, et al. Somatic mutations of the histone methyltransferase gene *EZH2* in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet*. 2010;42(8):665–7.

## **VII. ANEXOS**





**ANEXO 1. Trabajos publicados por la doctoranda sobre la temática de la tesis doctoral pero no incluidos en ésta.**

**Arenillas L**, Calvo X, Sanz GF, Florensa L. Reply to M. A. Lichtman. *J Clin Oncol* 2017;35(12):1376-1377.

Calvo X\*, **Arenillas L**\*, Luño E, Senent L, Arnan M, Ramos F, Pedro C, Tormo M, Montoro J, Díez-Campelo M, Blanco ML, Arrizabalaga B, Xicoy B, Bonanad S, Jerez A, Nomdedeu M, Ferrer A, Sanz GF, Florensa L. Enumerating bone marrow blasts from nonerythroid cellularity improves outcome prediction in myelodysplastic syndromes and permits a better definition of the intermediate risk category of the Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R). *Am J Hematol.* 2017 Jul;92(7):614-621. doi: 10.1002/ajh.24732. Epub 2017 May 9. IF: 5.275

\* Contribución como primeros autores

Calvo X\*, **Arenillas L**\*, Luño E, Senent L, Arnan M, Ramos F, Ardanaz MT, Pedro C, Tormo M, Montoro J, Díez-Campelo M, Arrizabalaga B, Xicoy B, Bonanad S, Jerez A, Nomdedeu B, Ferrer A, Sanz GF, Florensa L. Erythroleukemia shares biological features and outcome with myelodysplastic syndromes with excess blasts: a rationale for its inclusion into future MDS classifications. *Mod Pathol.* 2016 Dec;29(12):1541-1551. IF: 6.187

\* Contribución como primeros autores



## Reply to M.A. Lichtman

Lichtman<sup>1</sup> provides valuable comments regarding our recent paper<sup>2</sup> about the utility of enumerating blasts from nonerythroid cellularity for prognostic assessment in patients who have been diagnosed with myelodysplastic syndromes (MDS). As Lichtman notes, the term erythroid hyperplasia describes the increase in the proportion of erythroblasts, although it would be erroneous for describing a cellular increase attributable to neoplasia. As well as our group, several other authors with extensive experience in the study of myeloid neoplasms used this terminology.<sup>3-7</sup> After reading the correspondence by Lichtman,<sup>1</sup> we agree that the term is not entirely correct and, likely, use of other expressions, such as MDS with erythroid predominance, MDS with expanded erythropoiesis, or MDS with marked erythroid proliferation, would be more adequate.

In agreement with another issue on which Lichtman comments, our group has recently published an article<sup>8</sup> in which we exposed some concerns about the disappearance of erythroleukemia (erythroid/myeloid), as recently proposed by the WHO committee on myeloid neoplasms.<sup>9</sup> In the new classification, the nonerythroid blast cell count rule has been eliminated and patients who fulfill erythroleukemia criteria will be classified into a suitable MDS category on the basis of their blast cell count from total nucleated cells. With this recommendation, most erythroleukemias will be considered MDS with excess blasts 2. As recently shown by our group and others, erythroleukemia shares biologic features and outcomes with myelodysplastic syndromes with excess blasts,<sup>8,10</sup> although we did not find differences in outcome between the uncommon low-blast count erythroleukemias, with 5% to 10% bone marrow blasts from total nucleated cells (future MDS with excess blasts 1), and remaining erythroleukemias (future MDS with excess blasts 2). On the basis of this finding, the best approach could be to consider erythroleukemia as a high-risk myelodysplastic syndrome to avoid underestimation of these cases with a higher percentage of bone marrow erythroblasts and a lower bone marrow blast count.

### Leonor Arenillas and Xavier Calvo

Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques, Hospital del Mar Research Institute, Barcelona, Spain

### Guillermo F. Sanz

Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain

### Lourdes Florensa

Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques, Hospital del Mar Research Institute, Barcelona, Spain

### ACKNOWLEDGMENT

Written on behalf of the Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos. Leonor Arenillas and Xavier Calvo contributed equally to this correspondence.

### AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Disclosures provided by the authors are available with this article at [jco.org](http://jco.org).

### REFERENCES

- Lichtman MA: Clonal cytopenias and oligoblastic myelogenous leukemia (myelodysplasia) have neoplastic, not hyperplastic, erythropoiesis. *J Clin Oncol* 35:1376, 2017
- Arenillas L, Calvo X, Luño E, et al: Considering bone marrow blasts from nonerythroid cellularity improves the prognostic evaluation of myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 34:3284-3292, 2016
- Wong E, Juneja S: Acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndromes with 50% or greater erythroblasts: A diagnostic conundrum. *Pathology* 47:289-293, 2015
- Grossmann V, Bacher U, Haferlach C, et al: Acute erythroid leukemia (AEL) can be separated into distinct prognostic subsets based on cytogenetic and molecular genetic characteristics. *Leukemia* 27:1940-1943, 2013
- Bacher U, Haferlach C, Alpermann T, et al: Comparison of genetic and clinical aspects in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes all with more than 50% of bone marrow erythropoietic cells. *Haematologica* 96:1284-1292, 2011
- Hasserjian RP, Zuo Z, Garcia C, et al: Acute erythroid leukemia: A reassessment using criteria refined in the 2008 WHO classification. *Blood* 115:1985-1992, 2010
- Wang SA, Tang G, Fadare O, et al: Erythroid-predominant myelodysplastic syndromes: Enumeration of blasts from nonerythroid rather than total marrow cells provides superior risk stratification. *Mod Pathol* 21:1394-1402, 2008
- Calvo X, Arenillas L, Luño E, et al: Erythroleukemia shares biological features and outcome with myelodysplastic syndromes with excess blasts: A rationale for its inclusion into future classifications of myelodysplastic syndromes. *Mod Pathol* 29:1541-1551, 2016
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al: The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 127:2391-2405, 2016
- Wang SA, Patel KP, Pozdnyakova O, et al: Acute erythroid leukemia with <20% bone marrow blasts is clinically and biologically similar to myelodysplastic syndrome with excess blasts. *Mod Pathol* 29:1221-1231, 2016

DOI: 10.1200/JCO.2016.71.3941; published at [jco.org](http://jco.org) on January 30, 2017.



## 1 | INTRODUCTION

A proper prognostic stratification of patients diagnosed with myelodysplastic syndrome (MDS) is of major clinical relevance, since the choice of treatment is risk-adapted. The correct enumeration of blasts is essential in the diagnostic and prognostic evaluation of MDS. Proportion of bone marrow (BM) blasts has been demonstrated as an independent prognostic factor in MDS and is included in the most widely used prognostic scores: the International Prognostic Scoring System (IPSS) and the revised IPSS (IPSS-R).<sup>1,2</sup> The IPSS-R has been recognized as the score with the best prognostic capability in MDS,<sup>2–4</sup> but some concerns exist about the real prognostic significance of the intermediate risk category.<sup>2</sup> Patients classified into this group showed an outcome closer to the expected in higher-risk MDS patients, presenting a median overall survival (OS) around 30 months in different studies.<sup>2–6</sup> In this regard, the Spanish Group of Myelodysplastic Syndromes (GESMD) considers as higher-risk patients those with an expected median OS inferior to 30 months.<sup>7,8</sup>

In MDS with erythroid predominance (MDS-E), that are defined by the presence of equal or greater than 50% erythroblasts in BM, there was no consensus on the best method for enumerating BM blasts—from total nucleated cells (TNCs) or from nonerythroid cellularity (NECs). Despite the lack of agreement, WHO 2008 recommendation was to consider blasts from TNCs once the diagnosis of erythroleukemia (presence of equal or greater than 20% BM blasts from NECs) was ruled out.<sup>9</sup> In the 2016 revision to the WHO classification of myeloid neoplasms, the nonerythroid blast cell count rule was eliminated.<sup>10</sup> Despite this recommendation, as shown in our recent study by Arenillas et al.,<sup>11</sup> considering BM blasts from NECs improves the prognostic evaluation of MDS when applying IPSS and WHO classification, not only in patients with MDS-E but also in all patients with MDS. Some controversies have been generated about the convenience of applying this method, as this would imply an important change in the global paradigm of prognostication in MDS. In this regard, in a recent publication, Bennett et al did not find any advantage on applying this new approach even when this was assessed in the context of IPSS-R.<sup>12</sup> After the publication of these works showing contradictory findings, MDS experts claim for an unequivocal criterion in the way of counting BM blasts, as it is crucial for giving the best risk-adapted therapeutic option to patients diagnosed with MDS.<sup>13</sup> Due to this controversial data, evaluating the appropriateness of calculating IPSS-R by considering BM blasts from NECs is imperative. Currently, our group has complete information of the IPSS-R distribution on 3924 MDS patients. Our main aim was to evaluate whether considering BM blasts from NECs rather than from TNCs, as currently recommended, improves outcome prediction in MDS also in the context of IPSS-R, focusing on prognostication of patients classified into the intermediate risk category.

## 2 | PATIENTS AND METHODS

### 2.1 | Patients

At the completion of this report, the database of GESMD contained complete cytomorphologic, clinical, and follow-up information on 3924

patients diagnosed with *de novo* MDS according to 2008 WHO criteria, 498 of whom were MDS with erythroid predominance (MDS-E). Patients with secondary MDS, chronic myelomonocytic leukemia, acute erythroid leukemia (erythroid-myeloid type and pure erythroid leukemia), or unclassified myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms were excluded. Those patients diagnosed initially by French–American–British classification criteria,<sup>14–17</sup> were reclassified according to the WHO proposals,<sup>9</sup> based on morphological, laboratory, and cytogenetic data. Information about percentage of BM blasts from TNCs and BM erythroblasts was available in all patients. Further, the BM blast percentage from NECs was calculated as follows: [%BM blasts from TNCs/(100–%BM erythroblasts)] × 100. This study was conducted according to the Declaration of Helsinki and was approved by the ethical committee of GESMD. Patient characteristics are summarized in Table 1.

### 2.2 | Morphological studies

At least, two bone marrow and one peripheral blood May–Grünwald–Giemsa-stained smears were used for conducting the morphologic analysis at the individual centers. In addition, a Prussian blue-stained bone marrow smear was used for assessing the percentage of ring sideroblasts. The WHO 2008 proposals for evaluating the morphological diagnosis of myelodysplastic syndrome were followed strictly. As recommended, peripheral blood and bone marrow differential counts were performed on at least 200 and 500 cells, respectively. Bone marrow blast counts were assessed from total bone marrow nucleated cells. Following the 2008 WHO recommendations, the threshold used for considering a myeloid cell line as dysplastic was the presence of ≥10% abnormal cells in the corresponding myeloid lineage. For the evaluation of dysplasia, at least 200 neutrophils, 200 erythroblasts, and 30 megakaryocytes were assessed in bone marrow. Multilineage dysplasia was defined by dysplasia involving two or more lineages. As currently recommended by the Spanish Guidelines for the diagnosis and treatment of myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia, bone marrow biopsy was conducted only in those cases where fibrosis, hypoplastic myelodysplastic syndromes, or idiopathic cytopenias of undetermined significance were suspected.

### 2.3 | Statistical methods

Categorical variables were described by frequencies and percentages; and continuous variables by medians and ranges. Comparison of proportions was performed by using chi-square. Survival curves were constructed by using the Kaplan–Meier method from the interval from diagnosis to last contact or death (overall survival [OS]) or progression to acute myeloid leukemia (time to AML) and compared using the log-rank test. Univariate and multivariate analysis were performed using Cox's proportional hazards model to estimate the hazard ratio (HR) with the lowest risk groups as the reference groups. Differences were considered statistically significant when *P* values were <.05 in a two-tailed test. Maximally Selected Rank Statistics (Maxstat) method<sup>18</sup> was used to determine the cutoff point of the IPSS-R with best capability

**TABLE 1** Main demographic, clinical, and biological characteristics at diagnosis of 3924 patients with *de novo* MDS

Characteristics	N = 3924
<b>Age, median (range), years</b>	75.3 (16-101)
<65 years, n (%)	764 (19.5)
≥65 years, n (%)	3160 (80.5)
<b>Male gender, n (%)</b>	2306 (58.8)
<b>Hemoglobin, median (range), g/L</b>	10 (2.9-16.5)
<b>Neutrophil count, median (range), ×10<sup>9</sup>/L</b>	2.1 (0.01-13.8)
<0.5 × 10 <sup>9</sup> /L, n (%)	261 (6.7)
≥0.5 × 10 <sup>9</sup> /L, n (%)	3663 (93.3)
<b>Platelet count, median (range), ×10<sup>9</sup>/L</b>	157 (1-1161)
<30 × 10 <sup>9</sup> /L, n (%)	188 (4.8)
≥30 × 10 <sup>9</sup> /L, n (%)	3736 (95.2)
<b>WHO categories, n (%)</b>	
RCUD	405 (10.3)
RARS	585 (14.9)
RCMD	1608 (41)
RAEB1	580 (14.8)
RAEB2	493 (12.6)
MDS-U	38 (1)
del(5q)	215 (5.5)
<b>Erythroblasts %, median, (range)</b>	33.4 (3.2-79)
<b>MDS with ≥50% BM erythroblasts, n (%)</b>	498 (12.7)
<b>MDS with &lt;50% BM erythroblasts, n (%)</b>	3426 (87.3)
<b>% Dyserythropoiesis, median (range)</b>	30 (0-100)
<b>% Dysgranulopoiesis, median (range),</b>	30 (0-100)
<b>% Dysthrombopoiesis, median (range)</b>	20 (0-100)
<b>% BM blasts from TNCs, median, (range)</b>	2 (0-19)
<b>% BM blasts from NECs, median (range)</b>	3.13 (0-34.7)
<b>LDH serum level u/L, median (range),</b>	320 (0-4502)
<b>Karyotype, abnormal (%)</b>	1319 (33.6)
<b>IPSS cytogenetic group, n (%)</b>	
Low	3129 (79.7)
Intermediate	460 (11.7)
High	327 (8.3)
<b>IPSS-R cytogenetic group, n (%)</b>	
Very Low	165 (4.2)
Low	3021 (77)
Intermediate	420 (10.7)
Poor	124 (3.2)
Very Poor	194 (4.9)
<b>Treatments, n (%)</b>	
Azacitidine	605 (15.4)
AML-like chemotherapy	182 (4.6)
Allo-SCT	127 (3.2)
AML-like chemotherapy and/or Allo-SCT	255 (6.5)
At least one of these treatments	764 (19)

Abbreviations: Allo-SCT: allogeneic stem cell transplantation; ; AML: acute myeloid leukemia; BM: bone marrow; del (5q): MDS with isolated del(5q); IPSS: International Prognostic Scoring System; IPSS-R: revised IPSS; LDH: lactate dehydrogenase; MDS: myelodysplastic syndromes; MDS-U: unclassifiable MDS; RAEB1: refractory anemia with excess blasts 1; NECs: non-erythroid cells; RAEB-2: refractory anemia with excess blasts 2; RARS: refractory anemia with ring sideroblasts; RCMD: refractory cytopenia with multilineage dysplasia; RCUD: refractory cytopenia with unilineage dysplasia; TNCs: total nucleated cells.

to significantly split our series into two groups with different OS and time to AML evolution. Finally, the concordance probability estimate (CPE) including ties was used to evaluate the discriminatory power and the predictive accuracy of IPSS and IPSS-R considering blasts from TNCs and from NECs (recoded IPSS and recoded IPSS-R) in terms of survival and time to AML transformation. The concordance probability estimate represents the pairwise probability of lower patient risk given longer survival time. This method is less biased than other C-statistics for censored data when a low even rate is present and has been validated for indexes with a discrete number of risk groups.<sup>19,20</sup> Statistical analyses were performed using the statistical package for the social sciences (SPSS) software version 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and the open source software R version 3.3.1.

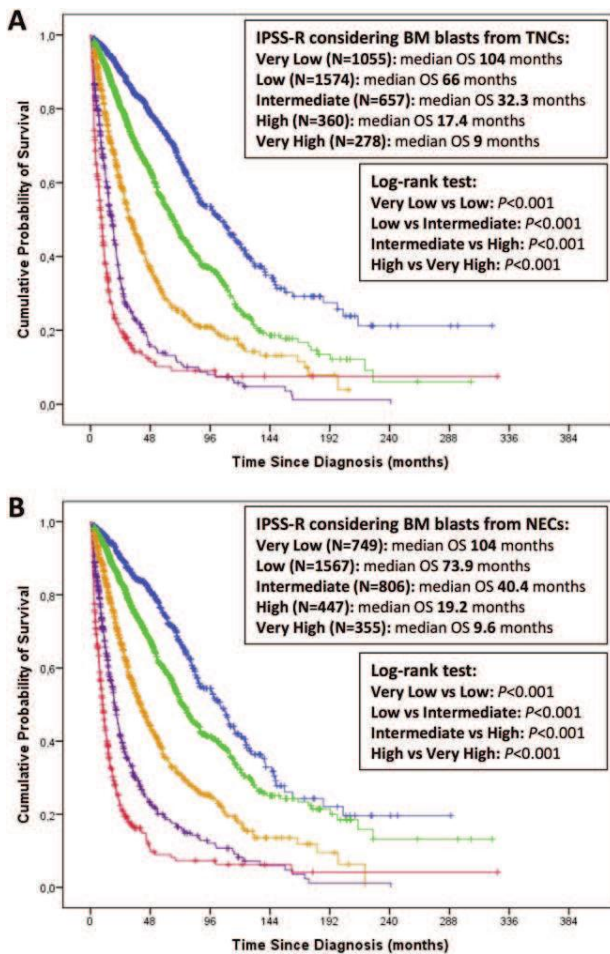
### 3 | RESULTS

Median age at diagnosis was 75 years (16-101), 59% were males. Estimated median follow-up calculated by reverse Kaplan-Meier method<sup>21</sup> was 46.5 months (95% CI, 43.9-49) and median OS was 56.97 months.

We assessed outcome predicted by IPSS-R considering BM blasts from TNCs and from NECs (recoded IPSS-R). Five groups with significant differences in OS and time to AML progression were observed by using both methods (Figure 1, Table 2). Remarkably, estimated median OS of patients classified into the intermediate risk group improved from 32.3 to 40.4 months by considering blasts from NECs instead of TNCs, whereas patients classified in high and very high risk categories showed almost the same outcome, even though the number of patients classified in these categories was increased in 25.7%. Therefore, by using this easy-applicable approach, lower-risk patients, including those classified into the intermediate risk category, show longer survivals than previously whereas higher-risk patients maintained the outcomes expected in this poor prognostic group, presenting an estimated median OS inferior to 20 months.

One hundred sixty-four out of 3286 patients (5%) classified into lower-risk IPSS-R categories (very low, low, intermediate) were reclassified into higher-risk categories (high, very high) when blasts were enumerated from NECs. OS and time to AML evolution of these upgraded patients was significantly shorter to those observed in patients who remained in the initial categories (median OS, 28.2 vs. 71.7 months,  $P < .001$ ; median time to AML evolution, 63 vs. not reached (NR) months,  $P < .001$ ) (Supporting Information Figure S1). As expected, the majority of the upgraded patients belonged to the intermediate risk category. Then, restricting the analysis to the IPSS-R intermediate risk group, 158 out of 657 patients (24%) were upgraded into higher-risk categories (high, very high) and showed a significantly shorter OS and time to AML transformation (median OS, 24.0 vs. 34.3 months,  $P = .012$ ; median time to AML evolution, 56.8 vs. 164.7 months,  $P = .005$ ). In the same line, the percentage of patients dying with leukemia was significantly higher in those intermediate patients who were upgraded into higher-risk categories when BM blasts were considered from NECs when compared to those that remained in the intermediate risk category: 42 died with AML/103 died (40.8%) vs. 82





**FIGURE 1** Overall survival (OS) by Kaplan-Meier analysis of patients with myelodysplastic syndromes (MDS) according to the Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R). (A) OS by IPSS-R risk groups enumerating blasts from total bone marrow cellularity. (B) OS by IPSS-R risk groups enumerating blasts from nonerythroid cells. OS was compared with two-sided log-rank test [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

died with AML/275 died (29.8%);  $P = .043$ . By using our approach instead of the currently recommended, the lower-risk categories, especially those patients classified into the recoded intermediate risk category, showed an inferior percentage of patients dying with AML, whereas the higher-risk categories showed a superior percentage of patients dying with leukemia than previously (Supporting Information Table S1). This finding reinforces the suitability of our method for detecting MDS patients with a higher propensity to develop AML. This is a nontrivial finding as AML transformation is closely related with disease evolution while survival could be influenced by several factors in this elderly population. Thus, by considering blasts from NECs we were able to detect a group of patients labeled at present as having lower-risk disease but who presented an outcome much closer to that of higher-risk patients. The worse outcome observed in these reclassified patients was mainly influenced by the difference in the weight of blasts when assessed from NECs, as other prognostic factors that could

explain this difference in outcome, as cytogenetics and depth of cytopenias, were adjusted by using IPSS-R.

Afterwards, IPSS and IPSS-R risk predictive accuracy for survival and time to AML evolution when considering blasts from TNCs or from NECs were evaluated. Interestingly, by using the CPE, the recoded scores showed higher values than their pairs calculated from TNCs (CPE, OS: 0.662 vs. 0.659 vs. 0.639 vs. 0.636; CPE, time to AML: 0.712 vs. 0.703 vs. 0.698 vs. 0.687; CPE values for recoded IPSS-R vs. IPSS-R vs. recoded IPSS vs. IPSS, respectively).

The weight of BM blasts into the new Cox model for OS (recoded IPSS-R) was similar to that observed in the original IPSS-R. The lowest category of each variable of the model was used as the reference group. The hazard ratio (HR) of every IPSS-R BM blast category was assessed taking the  $\leq 2\%$  BM blast category as reference ( $>2 < 5\%$ : 1.29, 5-10%: 1.71,  $>10\%$ : 2.34, for the IPSS-R;  $>2 < 5\%$ : 1.12, 5-10%: 1.43,  $>10\%$ : 2.08, for the recoded IPSS-R). For this reason, the established score for the different IPSS-R BM blast cutpoints was maintained for calculating the recoded IPSS-R.

In a recent publication, Pfeilstöcker et al suggested a reasonable division into lower- and higher-risk MDS based on the IPSS-R at a cutoff of 3.5 points.<sup>6</sup> Interestingly, by applying the Maxstat,<sup>18</sup> 3.5 points of the IPSS-R was also detected as the cutoff with the best capability to significantly split our series into two groups with different OS and time to AML evolution. By this approach, the majority of patients classified into the intermediate risk category were considered as higher-risk patients. Dichotomizing our patients by considering the cutoff of 3.5 points (IPSS-R  $> 3.5$  points) by calculating blasts from TNCs or from NECs, permitted to segregate two groups with significant different OS (median OS, 76 vs. 17 months,  $P < .001$ ; median OS, 79.1 vs. 21 months,  $P < .001$ ; from TNCs and from NECs respectively). The strength of this model was assessed again by applying the CPE. Interestingly, considering blasts from NECs permitted a better risk prediction accuracy of higher-risk patients in terms of OS and, especially, in time to AML evolution as shown by their higher CPE values in both outcomes (CPE, OS: 0.611 vs. 0.617; CPE, time to AML: 0.652 vs. 0.671; CPE considering BM blasts from TNCs vs. NECs, respectively).

Finally, we assessed the suitability of our approach restricting the analysis to 498 MDS with  $\geq 50\%$  BM erythroblasts (MDS-E) from our series, the largest cohort of MDS-E to date. Following 2008 WHO classification, MDS-E patients were diagnosed with: RCUD ( $n = 40$ , 8%), RARS ( $n = 145$ , 29.1%), RCMD ( $n = 228$ , 45.8%), isolated  $\text{del}(5q)$  ( $n = 15$ , 3%), MDS-U ( $n = 6$ , 1.2%), RAEB-1 ( $n = 62$ , 12.5%), and RAEB-2 ( $n = 2$ , 0.4%). Of note, as a flaw of 2008 WHO classification, RAEB-2 diagnosis is extremely rare in MDS-E, since patients with the minimum BM blast percentage to meet diagnosis criteria for RAEB-2 ( $\geq 10\%$  BM blasts from TNCs) having  $\geq 50\%$  BM erythroblasts would present always at least 20% BM blasts from NECs, fulfilling erythroleukemia criteria. The uncommon situation where RAEB-2 diagnosis could be established in MDS-E are those cases with less than 10% BM blasts from TNCs but with 5%– $<20\%$  blasts in peripheral blood (PB) or when Auer rods are present. Our 2 MDS-E patients diagnosed with RAEB-2 presented less than 10% BM blasts from TNCs but showed more than



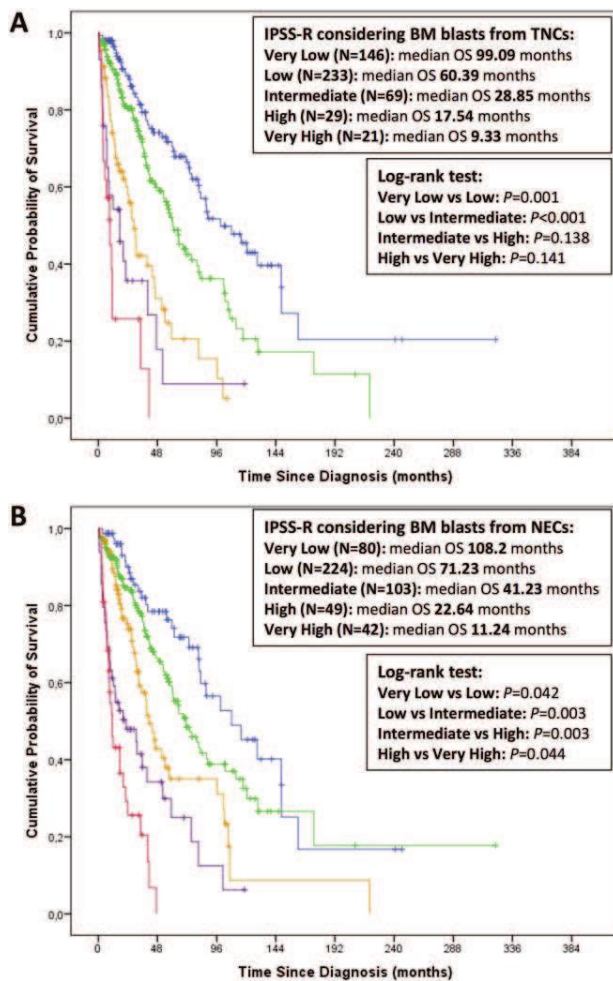
TABLE 2 Comparative analysis of prognostic indexes for MDS patients: IPSS, IPSS-R, recoded IPSS, and recoded IPSS-R

Survival			
	N (%)	Survival months, median (95% CI)	Hazard ratio (95% CI)
<b>Recoded IPSS-R</b>	<b>3924</b>		
Very low	749 (19.1)	104 (87.9-115.8)	-
Low	1567 (39.9)	73.9 (68.8-80.2)	1.45 (1.24-1.70)
Intermediate	806 (20.5)	40.4 (35.7-45.5)	2.67 (2.27-3.14)
High	447 (11.4)	19.2 (17.9-22.4)	4.99 (4.20-5.96)
Very High	355 (9.1)	9.6 (8.4-11.4)	8.93 (7.46-10.69)
<b>IPSS-R</b>	<b>3924</b>		
Very low	1055 (26.9)	104 (88.7-115.8)	-
Low	1574 (40.1)	66.1 (61.3-71.7)	1.69 (1.49-1.94)
Intermediate	657 (16.7)	32.3 (28.7-37.9)	3.21 (2.76-3.73)
High	360 (9.2)	17.4 (14.5-19.0)	6.08 (5.15-7.18)
Very High	278 (7.1)	9.0 (7.2-10.3)	9.61 (8.05-11.46)
<b>Recoded IPSS</b>	<b>3915</b>		
Low	1703 (43.5)	86.4 (78.1-94.7)	-
Intermediate-1	1308 (33.4)	53.1 (47.5-58.6)	1.78 (1.58-1.99)
Intermediate-2	566 (14.5)	22.3 (19-25.8)	3.67 (3.21-4.19)
High	338 (8.6)	10.9 (9.0-12.9)	6.40 (5.47-7.49)
<b>IPSS</b>	<b>3915</b>		
Low	1884 (48.1)	85.8 (77.7-94.0)	-
Intermediate-1	1398 (35.7)	45.1 (40.4-49.9)	2.01 (1.80-2.24)
Intermediate-2	480 (12.3)	15.7 (13.6-17.8)	4.54 (3.96-5.18)
High	153 (3.9)	8.4 (6.5-10.2)	7.87 (6.48-9.56)
Time to AML transformation			
	N (%)	AML evolution months, 25% (95% CI)	Hazard ratio (95% CI)
<b>Recoded IPSS-R</b>	<b>3912</b>		
Very low	748 (19.1)	NR (NR - NR)	-
Low	1565 (40.1)	195.1 (190.9 - NR)	1.58 (1.07-2.34)
Intermediate	803 (20.5)	46.5 (35.0-63.7)	5.96 (4.10-8.66)
High	443 (11.3)	16.0 (12.7-19.1)	14.15 (9.67-20.68)
Very High	353 (9.0)	8.8 (7.8-12.0)	20.73 (14.0-30.69)
<b>IPSS-R</b>	<b>3912</b>		
Very low	1053 (26.9)	NR (NR - NR)	-
Low	1573 (40.3)	134.5 (126.7 - NR)	2.17 (1.55-3.02)
Intermediate	654 (16.7)	27.6 (22.6-38.6)	8.20 (5.92-11.36)
High	355 (9.1)	15.6 (12.6-18.6)	15.99 (11.29-22.63)
Very High	277 (7.1)	8.0 (7.0-9.7)	23.36 (16.32-33.45)
<b>Recoded IPSS</b>	<b>3904</b>		
Low	1701 (43.6)	NR (190.9-NR)	-
Intermediate-1	1304 (33.4)	96.2 (71.2-NR)	3.40 (2.59-4.47)
Intermediate-2	565 (14.5)	16.3 (14.1-18.6)	12.97 (9.86-17.07)
High	334 (8.5)	9.5 (8.0-12.5)	19.64 (14.45-26.70)
<b>IPSS</b>	<b>3904</b>		
Low	1882 (48.2)	NR (190.9-NR)	-
Intermediate-1	1394 (35.7)	53.5 (44.8-74.5)	4.39 (3.43-5.61)
Intermediate-2	476 (12.2)	14.0 (12.0-16.7)	13.91 (10.63-18.19)
High	152 (3.9)	6.2 (5.0-8.7)	24.82 (17.73-34.74)

NR: not reached.

5% blasts in PB. Median age at diagnosis was 74 years (27-94). Estimated median follow-up, as calculated by reverse Kaplan-Meier method,<sup>21</sup> was 54.08 months (95% CI, 47.2-61) and median OS was 59.7 months.

We assessed OS and time to AML evolution predicted by IPSS-R considering BM blasts from TNCs and from NECs. Five groups with significant differences in OS were observed only by applying the recoded IPSS-R (Figure 2). By using our approach, the median OS of



**FIGURE 2** Overall survival (OS) by Kaplan-Meier analysis of patients with myelodysplastic syndromes (MDS) with  $\geq 50\%$  BM erythroblasts (MDS-E) according to the Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R). (A) OS by IPSS-R risk groups enumerating blasts from total bone marrow cellularity. (B) OS by IPSS-R risk groups enumerating blasts from nonerythroid cells. OS was compared with two-sided log-rank test [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

intermediate group improved from 28.9 to 41.2 months whereas patients into higher-risk categories maintained the outcome expected in these poor prognostic categories. Forty-one out of 448 patients (9.2%) classified into lower-risk categories (very low, low, intermediate) were reclassified into higher-risk ones and showed a significantly shorter OS and time to AML evolution (median OS, 22.6 vs. 74.3 months,  $P<.001$ ; median time to AML, 74.6 vs. NR months,  $P<.001$ ) (Supporting Information Figure S2). Likewise, restricting the analysis to the IPSS-R intermediate risk group, 35 out of 69 patients (51%) were upgraded into higher-risk categories and showed a significantly shorter OS and time to AML transformation (median OS, 13.9 vs. 43.7 months,  $P=.029$ ; median time to AML, 74.6 vs. NR months,  $P=.048$ ). As well as in the whole series, the recoded IPSS-R showed a better capability for predicting OS and time to AML (CPE, OS: 0.654 vs. 0.645; CPE,

time to AML: 0.70 vs. 0.673; CPE values for recoded IPSS-R vs. IPSS-R, respectively).

## 4 | DISCUSSION

A proper prognostic stratification in MDS is essential for designing risk-adapted therapeutic strategies that can range from watchful waiting to allogeneic stem cell transplantation. The design of improvement strategies in prognostic evaluation of patients with MDS is essential to help clinicians in risk-adapted therapeutic decisions. In the 2016 revision to the WHO classification of myeloid neoplasms, the nonerythroid blast cell count rule was eliminated.<sup>10</sup> Our results based on 3924 patients, 498 of whom were MDS with erythroid predominance (MDS-E), are not in line with this statement and evidence that enumerating BM blasts from NECs rather than from TNCs improves risk stratification of MDS. This is the largest series of MDS patients with information on BM erythroid precursor percentage to date.

As showed in our recent work, considering BM blasts from NECs improved outcome prediction in MDS when applying IPSS and WHO classification.<sup>11</sup> Despite the robustness of those findings, assessing the appropriateness of considering BM blasts from NECs in the context of IPSS-R seems crucial, since IPSS-R has been accepted as the score with the best prognostic capability in MDS.

As previously shown, enumerating BM blasts from NECs permitted us to upgrade to higher-risk categories 24% of patients previously classified into the intermediate risk category of IPSS-R. These upgraded patients showed a median OS of 24 months. Therefore, by using this easy-applicable approach we were able to detect a group of patients labeled at present as having lower-risk disease but who presented an outcome much closer to that of higher-risk patients. In addition, our approach allowed a better distribution of patients, as lower-risk patients, including those classified into the intermediate risk category, showed longer survivals than previously whereas higher-risk patients maintained the outcomes expected in this poor prognostic group (estimated median OS inferior to 20 months). Of note, estimated median OS of patients classified into the intermediate risk group improved from 32.3 to 40.4 months when BM blasts were assessed from NECs instead of TNCs. In the same line, restricting the analysis to MDS-E, 51% of patients classified into the intermediate category were reclassified into higher-risk ones and showed shorter OS and time to AML evolution. As well as in the whole series, the estimated median OS of patients classified into the intermediate risk group improved from 28.9 to 41.2 months when BM blasts were assessed from NECs instead of TNCs. Hence, by applying our method, the estimated median OS of patients included into the recoded intermediate risk category was very similar to the observed for the intermediate-1 group of the original IPSS. Patients included into the intermediate-1 risk category of IPSS have shown a median OS around 40 months in several studies<sup>1-6</sup> and have been historically considered as lower-risk patients. Overall, the appropriateness of our method is evident, as patients upgraded into higher-risk categories performed worse than those remaining into lower ones, and patients remaining into lower-risk categories

performed better than previously because those patients with higher-risk features dropped out from this group.

Since the origin of IPSS-R some concerns have been generated about the real prognostic significance of the intermediate risk category. The authors stressed the need to establish the real prognostic significance of patients included into the intermediate risk category, but recommended to consider these patients as lower-risk better than higher-risk ones because the OS of this group appeared closer to the IPSS intermediate-1 group than it was to IPSS intermediate-2. Nevertheless, as the authors stated, the proportion of patients dying with AML for the IPSS-R intermediate category was closer to the observed in higher-risk categories (very low: 13%, low: 17%, intermediate: 26%, high risk: 33%, and very high risk: 31%; proportion of patients died with AML). The final recommendation of authors was to assess these patients within both lower- and higher-risk future treatment protocols to conveniently define the best risk-adapted strategy in this subset of patients.<sup>2</sup> Therefore, the authors left the door open to develop strategies to improve the prognostic evaluation of this subgroup of patients. In this regard, our method would allow a more certain identification of lower-risk patients, because patients included into the intermediate risk category now shows a clinical outcome comparable to the expected in lower-risk patients.

In clinical practice, the exercise of common sense tutored by scientific evidence should be the overriding strategy to establish the value of any prognostic method. As previously commented, although the IPSS-R emerged as a very useful prognostic tool, its arrival brought new concerns related with the accurate prognostication of patients classified into the intermediate risk category. This dilemma was not present in the IPSS era, since patients classified into IPSS low and intermediate-1 categories have historically been well-accepted as lower-risk patients whereas those classified into IPSS intermediate-2 and high have been considered as higher-risk ones. The inherent characteristics of MDS patients make them not entirely favorable for the use of concordance methods (C-statistics) for assessing the predictive value of MDS prognostic scores in terms of overall survival. Determining causes of death attributable to MDS, especially in lower-risk patients, is not an easy task.<sup>22</sup> AML transformation is closely related with the evolution of the disease while survival could be influenced by several factors in this elderly population with a high prevalence of comorbid conditions. C-statistics (C-index, Somer's *Dxy* rank correlation, concordance probability estimate, etc.) have been used to evaluate the discriminatory power and the predictive accuracy of statistical models. The C-index and its extension *Dxy*, which can be easily calculated with the formula  $2(C\text{-index}-0.5)$ , are based on a generalization of the area under the ROC curve. These methods are based on performing comparisons of outcomes of pairs of patients. For all possible pairs of patients with comparable event times (a noncomparable event, for example, is two censored patients or one patient who is censored before another's death time), a pair is concordant with the true outcomes if the patient with a higher predicted risk dies first.<sup>23</sup> The C-index is the ratio of the number of concordant predictions and the set of all possible pairs. In other words, if one patient is IPSS-R "low" and

another is "high," we would expect that the "low" lives longer than the "high." Therefore, taking into account the way that patients are compared, we can expect a high rate of mistakes when predicting overall survival in MDS. For example, a "discordant" pair would be generated if a "low" risk IPSS-R patient diagnosed at 87 years who died after 1 year of diagnosis due to an ischemic stroke was compared to an "intermediate" risk patient diagnosed at 55 years who died with AML after 2 years of diagnosis. In this regard, the accuracy of C-statistics in predicting AML evolution could give a better value of the outcome prediction of MDS prognostic scores, since AML evolution is the outcome more closely related with disease evolution. In this respect, our approach has been especially useful for the improvement in the detection of patients at risk of dying with AML. Nevertheless, it is not exempt of difficulties since this outcome is restricted to a limited number of patients. In its original description, the IPSS-R showed an evident improvement in prognostic power in terms of overall survival when compared to the IPSS, nevertheless the improvement in terms of AML prediction was slight, since 2% of patients were better predicted by using IPSS-R instead of IPSS (*Dxy*: 0.52 vs. 0.48, C-index: 0.76 vs. 0.74; IPSS-R vs. IPSS respectively).<sup>2</sup> For all these reasons, the results derived from C-statistics in MDS, although valuable, should be interpreted with caution and these never should overcome the clinical sense.

In conclusion, our method allowed a better risk stratification of patients, by permitting a more precise identification of lower- and higher-risk patients, the main aim of any MDS prognostic score. Our data strongly support the use of NEC as the denominator for BM blast percentage calculation.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank all investigators from the GESMD for their invaluable collaboration, especially Luis Benlloch and Ana Vicente for maintaining the GESMD database. Supported in part by Grant No. RD12/0036/0044 from Red Tematica de Investigación Cooperativa en Cáncer (FEDER) and Grant No. 2014/SGR585 from Agencia de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca of Generalitat de Catalunya.

## AUTHORSHIP CONTRIBUTION

Conception and design: XC, LA, GFS, LF. Collection and assembly of data: all authors. Data analysis and interpretation: XC, LA, LF. Manuscript writing: XC, LA, LF. Final approval of manuscript: all authors.

## CONFLICT-OF-INTEREST DISCLOSURE

The authors declare no competing financial interests.

## REFERENCES

- [1] Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997; 89:2079–2088.
- [2] Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012;120:2454–2465. :

- [3] Voso MT, Fenu S, Latagliata R, et al. Revised International Prognostic Scoring System (IPSS) predicts survival and leukemic evolution of myelodysplastic syndromes significantly better than IPSS and WHO Prognostic Scoring System: validation by the Gruppo Romano Mielodisplasie Italian Regional Database. *J Clin Oncol*. 2013;31:2671-2677.
- [4] Della Porta MG, Tuechler H, Malcovati L, et al. Validation of WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS) for myelodysplastic syndromes and comparison with the revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R). A study of the International Working Group for Prognosis in Myelodysplasia (IWG-PM). *Leukemia*. 2015;29:1502-1513.
- [5] Neukirchen J, Lauseker M, Blum S, et al. Validation of the revised international prognostic scoring system (IPSS-R) in patients with myelodysplastic syndrome: a multicenter study. *Leuk Res*. 2014;38:57-64.
- [6] Pfeilstöcker M, Tuechler H, Sanz G, et al. Time-dependent changes in mortality and transformation risk in MDS. *Blood*. 2016;128:902-910.
- [7] Valcarcel D, Sanz G, Ortega M, et al. Use of newer prognostic indices for patients with myelodysplastic syndromes in the low and intermediate-1 risk categories: a population-based study. *Lancet Haematol*. 2015;2:e260-e266.
- [8] Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos (GESMD); Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH): Guías españolas de diagnóstico y tratamiento de los síndromes mielodisplásicos y la leucemia mielomonocítica crónica. [http://gesmd.es/pdfs/guias\\_smd/Haematologia\\_Guias\\_SMD.pdf](http://gesmd.es/pdfs/guias_smd/Haematologia_Guias_SMD.pdf)
- [9] Brunning RD, Orazi A, Germing U, et al. Myelodysplastic syndromes. In: Swerdlow S, Campos E, Lee Harris N, eds. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, France: IARC Press, World Health Organization; 2008: 87-107.
- [10] Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127:2391-2405.
- [11] Arenillas L, Calvo X, Luño E, et al. Considering bone marrow blasts from nonerythroid cellularity improves the prognostic evaluation of myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2016;34(27):3284-3292.
- [12] Bennett JM, Tuechler H, Aul C, Strupp C, Germing U. Dysplastic erythroid precursors in the myelodysplastic syndromes and the acute myeloid leukemias: Is there biologic significance? (How should blasts be counted?). *Leuk Res*. 2016;47:63-69. Aug
- [13] Zeidan AM, Xu M, Steensma DP. The importance of erythroblast enumeration in myeloid neoplasia. *Ann Hematol*. 2017;96(2):329-330. Feb
- [14] Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukemias. *Br J Haematol*. 1976;33:451-458.
- [15] Bennett JM, Begg CB. Easter cooperative Oncology Group study off the cytochemistry of adult acute leukemia by correlations of subtypes with response and survival. *Cancer Res*. 1981;41:4833-4837.
- [16] Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 1982;51:189-199.
- [17] Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med*. 1985;103:620-625.
- [18] Hothorn T, Zeileis A. Generalized maximally selected statistics. *Biometrics*. 2008;64(4):1263-1269. Dec
- [19] Gonen M, Heller G. Concordance probability and discriminatory power in proportional hazards regression. *Biometrika*. 2005;92:965-970.
- [20] Heller G, Mo Q. Estimating the concordance probability in a survival analysis with a discrete number of risk groups. *Lifetime Data Anal*. 2016;22(2):263-279.
- [21] Schemper M, Smith TL. A note on quantifying follow-up in studies of failure time. *Control Clin Trials*. 1996;17:343-346.
- [22] Nomdedeu M, Pereira A, Ramos F, et al. Excess mortality in the myelodysplastic syndromes. *Am J Hematol*. 2017;92(2):149-154. Feb
- [23] Katzman J, Shaham U, Cloninger A, et al. Deep survival: A deep Cox proportional hazards network. 2016.arXiv preprint arXiv:1606.00931.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

**How to cite this article:** Calvo X, Arenillas L, Luño E, et al. Enumerating bone marrow blasts from nonerythroid cellularity improves outcome prediction in myelodysplastic syndromes and permits a better definition of the intermediate risk category of the Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R). *Am J Hematol*. 2017;00:1-8. <https://doi.org/10.1002/ajh.24732>



# Erythroleukemia shares biological features and outcome with myelodysplastic syndromes with excess blasts: a rationale for its inclusion into future classifications of myelodysplastic syndromes

Xavier Calvo<sup>1,16</sup>, Leonor Arenillas<sup>1,16</sup>, Elisa Luño<sup>2</sup>, Leonor Senent<sup>3</sup>, Montserrat Arnan<sup>4</sup>, Fernando Ramos<sup>5</sup>, María Teresa Ardanaz<sup>6</sup>, Carme Pedro<sup>7</sup>, Mar Tormo<sup>8</sup>, Julia Montoro<sup>9</sup>, María Díez-Campelo<sup>10</sup>, Beatriz Arrizabalaga<sup>11</sup>, Blanca Xicoy<sup>12</sup>, Santiago Bonanad<sup>13</sup>, Andrés Jerez<sup>14</sup>, Benet Nomdedeu<sup>15</sup>, Ana Ferrer<sup>1</sup>, Guillermo F Sanz<sup>3</sup> and Lourdes Florensa<sup>1</sup>; on behalf of Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos (GESMD)

<sup>1</sup>Laboratorio Citología Hematológica. Servicio Patología, GRETNHE, IMIM Hospital del Mar Research Institute, Hospital del Mar, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Servicio Hematología, Hospital Universitario Central Asturias, Oviedo, Spain; <sup>3</sup>Servicio Hematología, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain; <sup>4</sup>Servicio Hematología, ICO-Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; <sup>5</sup>Servicio Hematología, Hospital Universitario de León, León, Spain; <sup>6</sup>Servicio Hematología, Hospital Universitario Txagorritxu, Vitoria, Spain; <sup>7</sup>Servicio Hematología, IMIM Hospital del Mar Research Institute, Barcelona, Spain; <sup>8</sup>Servicio Hematología, Hospital Clínico Universitario de Valencia, Valencia, Spain; <sup>9</sup>Servicio Hematología, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; <sup>10</sup>Servicio Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain; <sup>11</sup>Servicio Hematología, Hospital Universitario Cruces, Baracaldo, Spain; <sup>12</sup>Servicio Hematología, ICO-Badalona, Badalona, Spain; <sup>13</sup>Servicio Hematología, Hospital La Ribera, Alzira, Spain; <sup>14</sup>Servicio Hematología y Oncología Médica, Hospital Morales Meseguer, IMIB-Arrixaca, Murcia, Spain and <sup>15</sup>Servicio Hematología, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

**Erythroleukemia was considered an acute myeloid leukemia in the 2008 World Health Organization (WHO) classification and is defined by the presence of  $\geq 50\%$  bone marrow erythroblasts, having  $< 20\%$  bone marrow blasts from total nucleated cells but  $\geq 20\%$  bone marrow myeloblasts from nonerythroid cells. Erythroleukemia shares clinicopathologic features with myelodysplastic syndromes, especially with erythroid-predominant myelodysplastic syndromes ( $\geq 50\%$  bone marrow erythroblasts). The upcoming WHO revision proposes to eliminate the nonerythroid blast cell count rule and to move erythroleukemia patients into the appropriate myelodysplastic syndrome category on the basis of the absolute blast cell count. We conducted a retrospective study of patients with *de novo* erythroleukemia and compared their clinico-biological features and outcome with those of *de novo* myelodysplastic syndromes, focusing on erythroid-predominant myelodysplastic syndromes. Median overall survival of 405 erythroid-predominant myelodysplastic syndromes without excess blasts was significantly longer than that observed in 57 erythroid-predominant refractory anemias with excess blasts-1 and in 59 erythroleukemias, but no significant difference was observed between erythroid-predominant refractory anemias with excess blasts-1 and erythroleukemias. In this subset of patients with  $\geq 50\%$  bone marrow erythroblasts and excess blasts, the presence of a high-risk karyotype defined by the International Prognostic Scoring System or by the Revised International Prognostic Scoring System was the main prognostic factor. In the**

Correspondence: Dr X Calvo, MD or L Arenillas, MD, Laboratorio Citología Hematológica. Servicio Patología, GRETNHE, IMIM Hospital del Mar Research Institute, Hospital del Mar, Paseo Marítimo, 25, Barcelona 08003, Spain.

E-mail: Xcalvo@parcdesalutmar.cat or Larenillas@parcdesalutmar.cat

<sup>16</sup>These authors contributed equally to this work.

Presented in part in the 13th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes (Washington, DC, USA, 29 April 2015 to 2 May 2015) and the 57th American Society of Hematology (ASH) annual meeting (Orlando, FL, USA, 5–8 December).

Received 6 April 2016; revised 27 June 2016; accepted 4 July 2016; published online 26 August 2016

same way, the survival of 459 refractory anemias with excess blasts-2, independently of having  $\geq 20\%$  bone marrow blasts from nonerythroid cells or not, was almost identical to the observed in 59 erythroleukemias. Interestingly, 11 low-blast count erythroleukemias with 5 to  $< 10\%$  bone marrow blasts from total nucleated cells showed similar survival than the rest of erythroleukemias. Our data suggest that *de novo* erythroleukemia is in the spectrum of myelodysplastic syndromes with excess blasts and support its inclusion into future classifications of myelodysplastic syndromes.

*Modern Pathology* advance online publication, 26 August 2016; doi:10.1038/modpathol.2016.146

Acute erythroid leukemias are characterized by a predominant erythroid population and represent less than 5% of cases of adult acute myeloid leukemias. The 2008 World Health Organization (WHO) recognizes two subtypes of acute erythroid leukemia based on the presence or absence of a significant myeloblastic component: erythroleukemia and pure erythroid leukemia. Erythroleukemia (erythroid/myeloid) is defined by the presence of equal or greater than 50% erythroid precursors in bone marrow and equal or greater than 20% myeloblasts in nonerythroid cells. Pure erythroid leukemia represents a neoplastic proliferation of erythroid precursors (equal or greater than 80% of bone marrow cells) with no evidence of a significant myeloblastic component.<sup>1,2</sup>

Erythroleukemia shares clinicopathologic features with myelodysplastic syndromes: multilineage dysplasia is common, presents a high rate of myelodysplastic syndrome-like cytogenetic abnormalities and shows a mutation profile that is closer to myelodysplastic syndromes than to *de novo* acute myeloid leukemia.<sup>3–10</sup> Those cases with equal or greater than 50% bone marrow erythroblasts but not fulfilling criteria for erythroleukemia due to a percentage of bone marrow myeloblasts lower than 20% from nonerythroid cells, are considered erythroid-predominant myelodysplastic syndromes and, following current WHO recommendation, their bone marrow blast percentage must be considered from total bone marrow nucleated cells.<sup>2,11–13</sup> Possible diagnoses when erythroid precursors are equal or greater than 50% of bone marrow nucleated cells are summarized in Supplementary Table S1.

Interestingly, as a flaw of current WHO recommendation, refractory anemia with excess blasts-2 diagnosis is extremely rare in myelodysplastic syndromes with erythroid predominance, as patients with the minimum percentage of bone marrow blasts to meet diagnosis criteria for refractory anemia with excess blasts-2 (equal or greater than 10% of bone marrow blasts from total nucleated cells) having  $\geq 50\%$  bone marrow erythroblasts would present always at least 20% bone marrow blasts from nonerythroid cells, fulfilling erythroleukemia criteria. Therefore, refractory anemia with excess blasts-1 is almost invariably the highest WHO risk category applicable in this subset of patients. The uncommon situation where refractory anemia with excess blasts-2 diagnosis could be established in erythroid-predominant myelodysplastic syndromes are those cases with less than 10% bone

marrow blasts from total nucleated cells but with 5% to less than 20% blasts in peripheral blood or when Auer rods are present. Hence, erythroleukemia would really represent the next-highest risk category of erythroid-predominant refractory anemia with excess blasts-1 if the former were considered a specific subtype of erythroid-predominant myelodysplastic syndrome. However, there are no data in the literature about a specific comparison between these two entities.

Few studies have compared clinical features and outcome of *de novo* erythroleukemia with those observed in erythroid-rich myelodysplastic syndromes. Furthermore, most of them also collected cases of therapy-related myeloid neoplasms and secondary erythroleukemias.<sup>6,8–10</sup>

A revision of the fourth edition of WHO Classification of myelodysplastic syndromes, originally published in 2008, is expected this year. As mentioned in a recent publication by Arber *et al*<sup>14,15</sup> that summarizes major changes in the upcoming WHO classification, the nonerythroid blast cell count rule will be eliminated and those patients that fulfilled erythroleukemia criteria will be considered myelodysplastic syndromes and will be moved into the appropriate myelodysplastic syndrome category based on the absolute blast cell count.

For all the above, an extensive comparison between *de novo* erythroleukemia and myelodysplastic syndromes, especially myelodysplastic syndromes with erythroid predominance, seems crucial to elucidate whether these entities should really be considered as a continuum instead of two different biological entities.

## Materials and methods

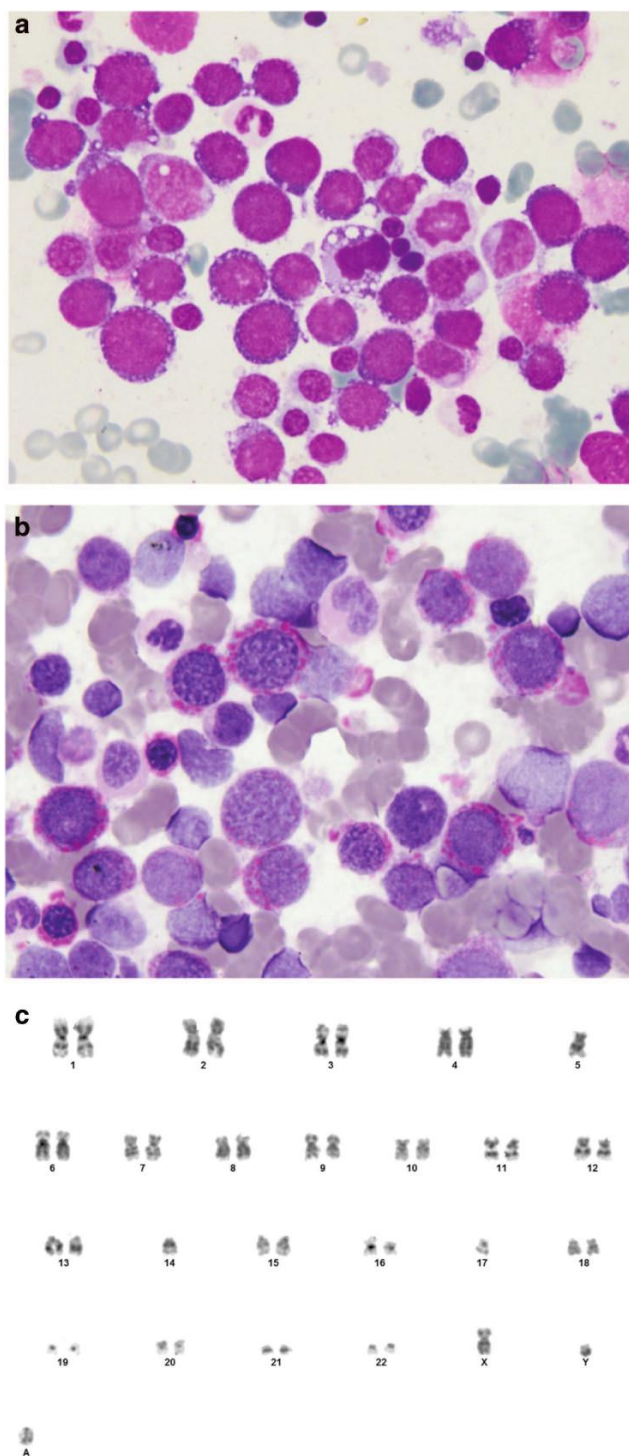
### Patients

From 1972 to 2015, we retrospectively collected clinical and laboratory data of 3687 *de novo* myelodysplastic syndromes included in the Spanish Registry of Myelodysplastic Syndromes, 462 of whom were erythroid-predominant myelodysplastic syndromes (42 refractory cytopenias with unilineage dysplasia, 139 refractory anemias with ring sideroblasts, 200 refractory cytopenias with multilineage dysplasia, 12 myelodysplastic syndromes with isolated del(5q), 12 myelodysplastic syndromes-unclassified, and 57 refractory anemias with excess blasts-1). We could not establish refractory anemia with excess blasts-2 diagnosis in any erythroid-predominant

myelodysplastic syndrome of our series. Moreover, 59 *de novo* erythroleukemias were collected in the same period. A typical case of erythroleukemia displaying a complex karyotype is shown in Figure 1. Morphology, laboratory characteristics, cytogenetics, and clinical follow-up were available for all the patients. Diagnosis of myelodysplastic syndromes and erythroleukemia was made according to the 2008 WHO classification proposals.<sup>2</sup> Those patients diagnosed initially by French–American–British classification criteria,<sup>16–19</sup> were reclassified according to the WHO proposals, based on morphological, laboratory, and cytogenetic data. Information about percentage of bone marrow blasts from total nucleated cells and bone marrow erythroblasts was available in all 3687 *de novo* myelodysplastic syndrome patients. Further, the bone marrow blast percentage from nonerythroid cells was calculated as follows: [% bone marrow blasts from total nucleated cells/(100-% bone marrow erythroblasts)] × 100. Distribution of patients among WHO categories is depicted in Supplementary Table S2. Patients diagnosed with secondary myelodysplastic syndrome (therapy-related myeloid neoplasm) or secondary erythroleukemia (therapy-related or evolved from primary myelodysplastic syndrome), pure erythroid leukemia, chronic myelomonocytic leukemia, and unclassified myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms were excluded from the present study. The study was conducted fulfilling the biomedical research guidelines of Declaration of Helsinki.

### Morphological Studies

At least, two bone marrow and one peripheral blood May–Grünwald–Giemsa-stained smears were used for conducting the morphological analysis at the individual centers. In addition, a Prussian blue-stained bone marrow smear was used for assessing the percentage of ring sideroblasts. The WHO 2008 proposals for evaluating the morphological diagnosis of myelodysplastic syndrome and erythroleukemia were followed strictly.<sup>2</sup> As recommended, peripheral blood and bone marrow differential counts were performed on at least 200 and 500 cells, respectively. Bone marrow blast counts were assessed from total bone marrow nucleated cells. Following the 2008 WHO recommendations, the threshold used for considering a myeloid cell line as dysplastic was the presence of ≥ 10% abnormal cells in the corresponding myeloid lineage. For the evaluation of dysplasia, at least 200 neutrophils, 200 erythroblasts, and 30 megakaryocytes were assessed in bone marrow. Multilineage dysplasia was defined by dysplasia involving two or more lineages. As currently recommended by the Spanish Guidelines for the diagnosis and treatment of myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia,<sup>20</sup> bone marrow biopsy was conducted only in those cases where fibrosis, hypoplastic myelodysplastic syndromes, or idiopathic cytopenias of undetermined significance were suspected.



**Figure 1** Morphologic features of *de novo* erythroleukemia. (a) Bone marrow smear shows immature erythroblasts with vacuolated cytoplasm (May–Grünwald–Giemsa). (b) Diffuse pattern in the cytoplasm of mature erythroblasts and granular and clumped pattern in earlier precursors by periodic acid–Schiff reaction (PAS) stain. (c) This patient presented a complex karyotype, a common finding in erythroleukemia: 44–45,XY, - 5, - 14, - 17, +mar, +r[cp10]/44–45,XY, - 5, add(10)(p15), - 14, - 17, +mar, +r[cp3]/44–45, XY, - 5, add(10)(p11), - 17, add(19)(q13), +mar[cp2]/46,XY[5].

## Conventional Cytogenetic Studies

Cytogenetic analyses were performed on G-banded chromosomes obtained from 24 h unstimulated bone marrow cultures at the individual centers. When possible, at least 20 metaphases per sample were studied. Karyotypes were described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature.<sup>21</sup>

## Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using the statistical package for the social sciences software version 22.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Categorical variables were described by frequencies and percentages; and continuous variables by medians and ranges. The assumption of normality was assessed by using the Shapiro–Wilk test. For categorical data, comparisons of proportions were evaluated by Chi-square test. For continuous variables, comparisons of medians, ranks and means were assessed by nonparametric (Mood's median or Mann–Whitney *U*-tests) or parametric tests (*t*-test) as appropriate according to the distribution of the studied variables. Mood's median test was selected instead of Mann–Whitney *U*-test, as a more robust method to compare those variables showing outlier values. Survival curves were constructed by Kaplan–Meier method using the interval from the date of diagnosis to the date of last contact or death (overall survival) and compared using the log-rank test. Patients undergoing hematopoietic allogeneic stem cell transplantation or intensive acute myeloid leukemia-type chemotherapy were censored at the date of starting chemotherapy or the date of transplant, whichever came first, except when the prognostic impact of allogeneic stem cell transplantation was assessed. Differences were considered statistically significant when *P*-values were < 0.05 in a two-tailed test. Multivariable analysis was performed using Cox's proportional hazards regression model to assess the independent prognostic impact of variables that showed significance in the univariable overall survival analysis. The assumption of proportional hazards over time was tested for all explanatory covariates by using a time-dependent covariate.

## Results

Clinical follow-up data were available for all the patients. The estimated median follow-up in the overall series, as calculated by the reverse Kaplan–Meier method was 42 months, 44 months, and 42 months for myelodysplastic syndromes with or without erythroid predominance, respectively. At the last follow-up, 1642 of 3687 patients (44.5%) had died. The estimated median follow-up for *de novo* erythroleukemia patients, as calculated by the reverse Kaplan–Meier method was 30 months. At the last follow-up, 43 of 59 patients (72.9%) had died.

## Erythroid-Predominant Refractory Anemia with Excess Blasts-1 and *De novo* Erythroleukemia Share Clinico-Biological Features and Outcome

Refractory anemia with excess blasts-1 was the highest WHO risk category applicable in erythroid-predominant myelodysplastic syndromes of our series, since patients with erythroid-predominant myelodysplastic syndrome with equal or greater than 10% bone marrow blasts from total nucleated cells, which would be classified as refractory anemia with excess blasts-2 if bone marrow erythroblasts were less than 50%, fulfilled erythroleukemia criteria. Thus, we wanted to compare clinical features, cytogenetics, and outcome of erythroid-predominant refractory anemia with excess blasts-1 with those of erythroleukemia, as this would represent the next-highest risk category if this were considered a specific subtype of myelodysplastic syndrome. Comparison of the main clinico-biological features between 59 *de novo* erythroleukemias and 57 erythroid-predominant refractory anemias with excess blasts-1 is depicted in Table 1. Interestingly, no significant differences were observed according to age, sex distribution, hemoglobin levels, neutrophil count, median percentage of bone marrow erythroblasts, median percentage of dysplasia of the different myeloid series, and the International Prognostic Scoring System<sup>22</sup> or Revised International Prognostic Scoring System<sup>23</sup> cytogenetic risk category distribution. Moreover, no significant differences were observed in the percentage of high-risk karyotypes defined by the International Prognostic Scoring System or by the Revised International Prognostic Scoring System (poor and very poor categories) between erythroid-predominant refractory anemia with excess blasts-1 and erythroleukemia (International Prognostic Scoring System, 28 vs 19%, *P*=0.230; Revised International Prognostic Scoring System, 28 vs 22%, *P*=0.453). Very few differences were observed: platelet count was significantly inferior in erythroleukemia and, as expected due to current definition of these entities, bone marrow blast percentage considered from total nucleated cells or from nonerythroid cells was significantly inferior in erythroid-predominant refractory anemia with excess blasts-1. No significant difference was observed between erythroleukemia and erythroid-predominant refractory anemia with excess blasts-1 in the proportion of patients receiving acute myeloid leukemia-type chemotherapy (18.6 vs 12.3%, *P*=0.344), allogeneic stem cell transplantation (18.6 vs 8.8%, *P*=0.123) or at least one of them (27.1 vs 17.5%, *P*=0.216). Azacitidine was approved in Spain in January 2009 for the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with 20–30% bone marrow blasts from total nucleated cells (previously considered refractory anemia with excess blasts in transformation). Although azacitidine is not currently approved for the treatment of erythroleukemia, its use is widely extended in this elderly group of patients usually



**Table 1** Comparisons for main demographic, clinical, and biological characteristics between 59 *de novo* erythroleukemias and 57 erythroid-predominant refractory anemias with excess blasts-1 ( $\geq 50\%$  bone marrow erythroblasts)

Characteristic	Erythroleukemia, N = 59	Erythroid-predominant RAEB-1, N = 57	P-values
Age, median (range), years	71.09 (26–88)	70.8 (31–93)	0.713
Male gender, n (%)	38 (64)	35 (61)	0.738
Hemoglobin, median (range), g/l	9.0 (4.8–14.7)	9.7 (6.1–14.1)	0.074
Neutrophil count, median (range), $\times 10^9/l$	0.84 (0.05–9.12)	0.88 (0.08–6.1)	0.780
Platelet count, median (range), $\times 10^9/l$	65 (12–394)	105 (14–381)	< <b>0.001</b>
Erythroblasts, median (range), %	58.6 (50–85)	55 (50–74)	0.063
BM blasts from TNCs, median (range), %	12 (5–19)	6 (5–9)	< <b>0.001</b>
BM blasts from NECs, median (range), %	30.2 (20–67.9)	15 (10–19.4)	< <b>0.001</b>
Dyserythropoiesis, median (range), %	40 (4–100)	30 (0–100)	0.165
Dysgranulopoiesis, median (range), %	20 (0–100)	24 (0–90)	0.674
Dysthrombopoiesis, median (range), %	25 (0–100)	30 (0–100)	0.793
Karyotype, abnormal/total cases (%)	24/59 (40.7)	31/57 (54.4)	0.139
<i>IPSS cytogenetic group, n (%)</i>			0.449
Low	38 (64)	31 (54)	
Intermediate	10 (17)	10 (18)	
Poor	11 (19) <sup>a</sup>	16 (28) <sup>a</sup>	
<i>IPSS-R cytogenetic group, n (%)</i>			0.313
Very low	0	1 (2)	
Low	40 (68)	31 (54)	
Intermediate	6 (10)	9 (16)	
Poor	2 (3)	6 (10)	
Very poor	11 (19) <sup>b</sup>	10 (18) <sup>b</sup>	

Abbreviations: BM, bone marrow; IPSS, International Prognostic Scoring System; IPSS-R, IPSS revised; NECs, nonerythroid cellularity; RAEB-1, refractory anemia with excess of blasts type 1; TNC, total nucleated cells.

<sup>a</sup>No significant differences were observed in the percentage of high-risk karyotypes defined by the IPSS between RAEB1-E and erythroleukemia (IPSS, 19 vs 28%,  $P=0.230$ ).

<sup>b</sup>No significant differences were observed in the percentage of high-risk karyotypes defined by the IPSS-R (poor and very poor) between RAEB1-E and erythroleukemia (22 vs 28%,  $P=0.453$ ).

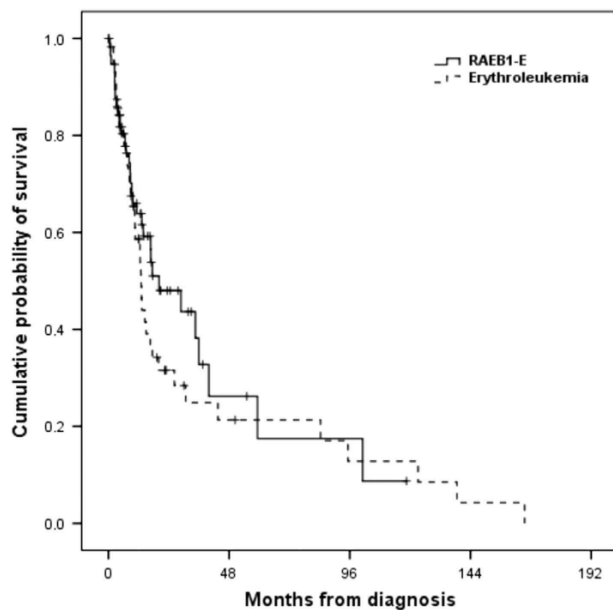
Statistical significance indicated in bold.

unfit to receive common acute myeloid leukemia-type treatments or not eligible for allogeneic stem cell transplantation. On assessing the patients diagnosed from 2009 onward, a higher trend was observed in the proportion of erythroleukemias receiving azacitidine compared with erythroid-predominant refractory anemias with excess blasts-1, although no significant difference was detected (53.3 vs 29.2%,  $P=0.074$ ).

Although overall survival of 405 erythroid-predominant myelodysplastic syndromes without excess of blasts (< 5% bone marrow blasts from total nucleated cells) was significantly longer than that observed in 57 erythroid-predominant refractory anemias with excess blasts-1 (5 to < 10% bone marrow blasts from total nucleated cells) and in 59 *de novo* erythroleukemias (10 to < 20% bone marrow blasts from total nucleated cells) (median overall survival, 71 vs 20 months,  $P < 0.001$ ; median overall survival, 71 vs 13 months,  $P < 0.001$ ; respectively), no significant difference in the overall survival was observed between 57 erythroid-predominant refractory anemias with excess blasts-1 and 59 *de novo* erythroleukemias (median overall survival, 20 vs 13 months;  $P=0.33$ ; Figure 2). Interestingly, erythroid-predominant refractory anemia with excess blasts-1 patients showed a significant shorter overall survival than 489 refractory anemia with excess blasts-1 with less than 50% bone marrow

erythroblasts (median overall survival, 20 vs 34 months;  $P=0.042$ ; Supplementary Figure S1). This could be explained, at least in part, by the difference in the median percentage of bone marrow blasts calculated from nonerythroid cells. Although the median percentage of bone marrow blasts from total nucleated cells was higher in refractory anemia with excess blasts-1 with less than 50% bone marrow erythroblasts than in erythroid-predominant refractory anemia with excess blasts-1 (6.8 vs 6%,  $P=0.044$ ), erythroid-predominant refractory anemia with excess blasts-1 displayed a significant higher median percentage of bone marrow blasts from nonerythroid cells (15 vs 9.38%,  $P < 0.001$ ). In the same way, erythroleukemia patients showed a significant shorter overall survival than 489 refractory anemia with excess blasts-1 with less than 50% bone marrow erythroblasts (median overall survival, 13 vs 34 months;  $P=0.001$ ).

Changes in the different standards applied to diagnosis and management of patients over time could exercise an influence on the survival analysis, especially on series collected during long time. To assess this potential bias in our study, we divided our series in three time periods: 1972 to < 2000, 2000 to < 2009, and 2009 to present. These thresholds were selected attending to the increased indication of allogeneic stem cell transplantation in

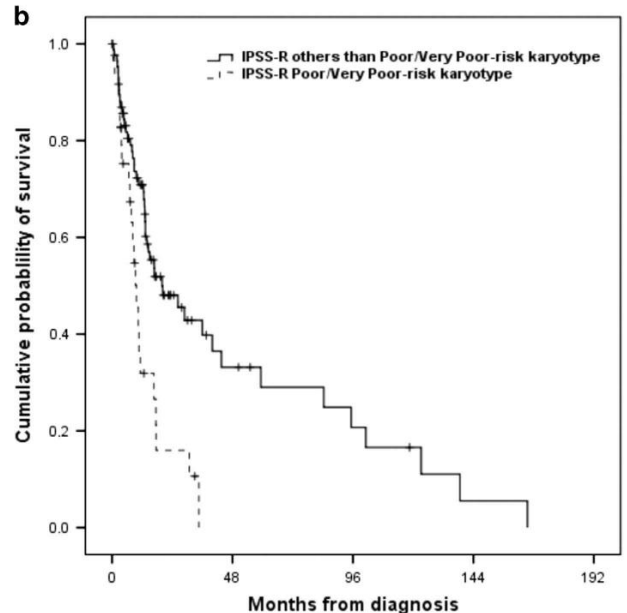
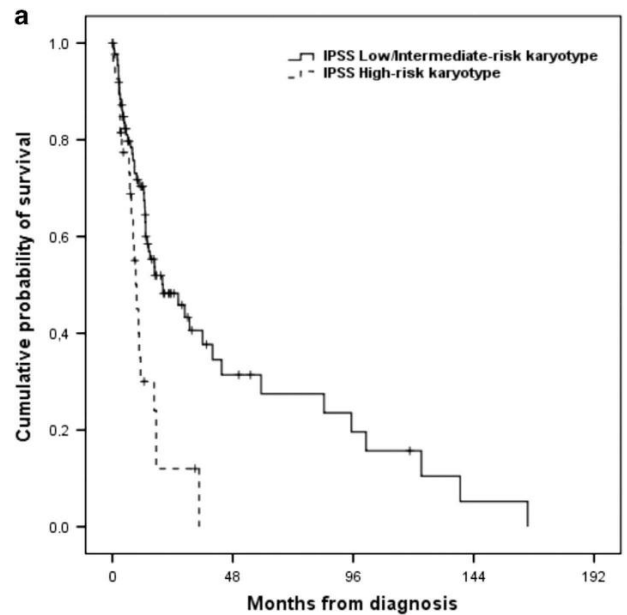


**Figure 2** Overall survival by Kaplan–Meier analysis of 57 refractory anemias with excess blasts-1 with  $\geq 50\%$  bone marrow erythroblasts (RAEB1-E) vs 59 *de novo* erythroleukemias. No significant difference in overall survival was observed (median overall survival, 20 vs 13 months; NS). Overall survival is indicated in months and was compared with the two-sided log-rank test.

the 2000 to < 2009 era and the use of azacitidine as a standard of care in Spain for higher-risk myelodysplastic syndromes since 2009. No significant difference was observed in the proportion of patients diagnosed with *de novo* erythroleukemia or with erythroid-predominant refractory anemia with excess blasts-1 in each one of these periods (15.3% of erythroleukemias vs 19.3% of erythroid-predominant refractory anemias with excess blasts-1 in the first period, 33.9% of erythroleukemias vs 38.6% of erythroid-predominant refractory anemias with excess blasts-1 in the second period, 50.8% of erythroleukemias vs 42.1% of erythroid-predominant refractory anemias with excess blasts-1 in the third period;  $P=0.629$ ).

The low incidence of these diseases makes difficult to perform studies with larger series. Nevertheless, our findings evidence that *de novo* erythroleukemia shares clinico-biological features and outcome with erythroid-predominant refractory anemia with excess blasts-1.

Then, we assessed International Prognostic Scoring System and Revised International Prognostic Scoring System cytogenetic risk classification in the subset of 116 patients with erythroid predominance and excess of blasts (erythroleukemia and erythroid-predominant refractory anemia with excess blasts-1). The presence of a high-risk karyotype according to both, International Prognostic Scoring System and Revised International Prognostic Scoring System, was capable to discriminate two risk groups with significant different overall survival (median overall



**Figure 3** Overall survival by Kaplan–Meier analysis. (a) Survival according to the presence of an International Prognostic Scoring System (IPSS) high-risk karyotype or not (median overall survival, 10 vs 20 months,  $P=0.001$ ). (b) Survival according to the presence of a Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R) high-risk karyotype (poor and very poor) or not (median overall survival, 10 vs 20 months,  $P=0.001$ ). Overall survival is indicated in months and was compared with the two-sided log-rank test.

survival, 20 vs 10 months,  $P=0.001$ ; median overall survival, 20 vs 10 months,  $P=0.001$ ; respectively; Figure 3). Moreover, other classical myelodysplastic syndrome prognostic factors were assessed and, surprisingly, only hemoglobin  $< 100$  g/l showed an impact (median overall survival, 36 vs 11 months;  $P=0.006$ ). Platelets  $< 100 \times 10^9/l$ , platelets  $< 50 \times 10^9/l$ , neutrophils  $< 500/mm^3$ , neutrophils  $< 800/mm^3$  showed no impact in terms of overall

**Table 2** Multivariable analysis for overall survival of 116 patients with erythroid predominance and excess blasts (erythroid-predominant refractory anemia with excess blasts-1 and erythroleukemia)

Variable	Multivariable		
	HR	95% CI	P-value
<i>a)</i>			
Age, years ≥ 60	1.38	0.73–2.63	NS
Hemoglobin, g/l < 100	1.63	0.95–2.80	NS
High-risk IPSS cytogenetic category	<b>2.10</b>	<b>1.19–3.71</b>	<b>0.011</b>
Allo-SCT	0.65	0.20–2.14	NS
<i>b)</i>			
Age, years ≥ 60	1.60	0.76–3.33	NS
Hemoglobin, g/l < 100	1.66	0.95–2.89	NS
High-risk IPSS-R cytogenetic group (poor and very poor categories)	<b>2.20</b>	<b>1.27–3.83</b>	<b>0.005</b>
Allo-SCT	0.71	0.22–2.37	NS

Abbreviations: Allo-SCT: allogeneic stem cell transplantation; CI: confidence interval; HR: hazard ratio; IPSS: International prognostic score system; IPSS-R: Revised International prognostic score system; NS: not significant; OS: overall survival.

(a) Including the variable: high-risk International Prognostic Scoring System cytogenetic category.

(b) Including the variable: high-risk Revised International Prognostic Scoring System cytogenetic group.

Statistically significance indicated in bold.

survival. Furthermore, the 10% bone marrow blast cutoff segregates a group of 48 *de novo* erythroleukemias that showed no significant differences in overall survival compared with the rest of the patients with erythroid predominance and excess of blasts (11 erythroleukemias with less than 10% bone marrow blasts from total nucleated cells and 57 erythroid-predominant refractory anemias with excess blasts-1; median overall survival, 13 vs 18 months;  $P=0.61$ ). In the same way, no significant difference in overall survival was observed between the 11 low-blast count erythroleukemias with less than 10% bone marrow blasts from total nucleated cells and the rest of erythroleukemias (median overall survival, 13 vs 13 months,  $P=0.518$ ). Moreover, the survival of these low-count erythroleukemias was similar to that observed in all 459 refractory anemia with excess blasts-2 (median overall survival, 13 vs 14 months,  $P=0.916$ ).

Afterwards, the prognostic impact of allogeneic stem cell transplantation in this subset of 116 patients with erythroid predominance and excess of blasts was assessed. The 16 patients who underwent an allogeneic stem cell transplantation showed a significant longer overall survival than those who did not (median overall survival, NR vs 17 months;  $P=0.017$ ).

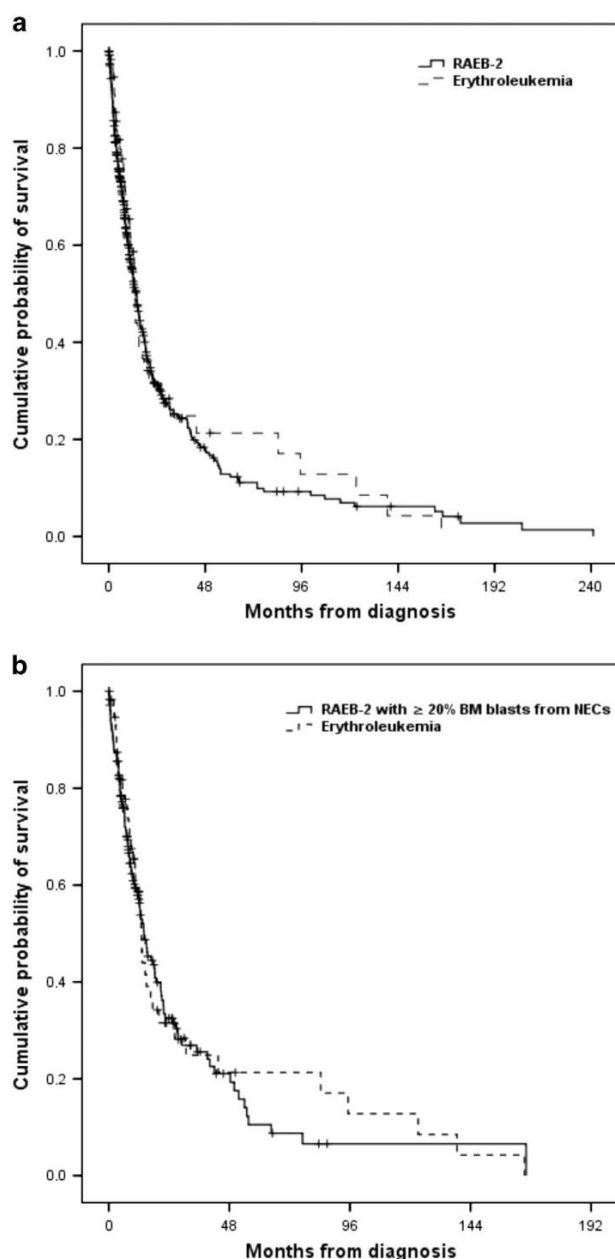
Finally, we carried out a multivariable analysis of overall survival by using Cox regression modeling including those variables that showed an impact on overall survival in the univariable survival analysis: age, high-risk International Prognostic Scoring System cytogenetic category, hemoglobin < 100 g/l, and allogeneic stem cell transplantation as a time-dependent variable. Only the high-risk International Prognostic Scoring System cytogenetic category retained its prognostic influence on overall survival

(Table 2a). Further, when the Cox regression model was carried out introducing the high-risk Revised International Prognostic Scoring System cytogenetic group (poor and very poor categories) instead of the high-risk International Prognostic Scoring System cytogenetic category, again, only the high-risk Revised International Prognostic Scoring System cytogenetic group retained its independent prognostic influence on overall survival (Table 2b).

#### Refractory Anemia with Excess Blasts-2 and *De novo* Erythroleukemia Showed a Similar Outcome

We compared the outcome of 59 *de novo* erythroleukemias with that of 459 patients diagnosed with refractory anemia with excess blasts-2 and no significant difference in overall survival was observed (median overall survival, 13 vs 14 months;  $P=0.65$ ; Figure 4a). Then, survival of erythroleukemia and myelodysplastic syndromes with less than 50% bone marrow erythroblasts that, as in erythroleukemia, presented equal or greater than 20% bone marrow blasts from nonerythroid cells was also compared. We detected 175 of 459 refractory anemias with excess blasts-2 (38%) meeting this requirement. These two groups of patients presented a similar overall survival (median overall survival, 13 vs 13 months;  $P=0.72$ ; Figure 4b). This finding underlines the arbitrariness of the established erythroblast cutoff to consider the diagnosis of erythroleukemia and the absence of prognostic impact *per se* of the erythroid predominance.

Afterwards, a comparison of the main clinicobiological features of *de novo* erythroleukemia and refractory anemia with excess blasts-2 was carried



**Figure 4** Overall survival by Kaplan–Meier analysis of (a) 59 *de novo* erythroleukemias vs 459 refractory anemias with excess blasts-2 (RAEB-2) (median overall survival, 13 vs 14 months; NS) and (b) 59 *de novo* erythroleukemias vs 175 refractory anemias with excess blasts-2 with equal or greater than 20% bone marrow blasts from nonerythroid cells (NECs) (median overall survival, 13 vs 13 months; NS). Overall survival is indicated in months and was compared with the two-sided log-rank test.

out and only significant differences in median percentage of bone marrow erythroblasts, median percentage of dysgranulopoiesis, and median percentage of bone marrow blasts from nonerythroid cells were detected. Interestingly, no significant differences were observed according to International Prognostic Scoring System or Revised International Prognostic Scoring System cytogenetic risk category distribution, median percentage of dysplasia of the

erythroid and megakaryocytic lineages, median percentage of bone marrow blasts from total nucleated cells, hemoglobin levels, neutrophil count, platelet count, age and sex distribution. All these comparisons are depicted in Table 3. Once again, these results point out that erythroleukemia is in the spectrum of myelodysplastic syndromes with excess blasts.

Finally, no significant difference was observed between erythroleukemia and refractory anemia with excess blasts-2 in the proportion of patients receiving acute myeloid leukemia-type chemotherapy (18.6 vs 17.4%,  $P=0.817$ ), but a significant higher percentage of erythroleukemia patients underwent an allogeneic stem cell transplantation (18.6 vs 9.6%,  $P=0.034$ ). Interestingly, when assessing patients diagnosed from 2009 onward, no significant difference was detected in the proportion of patients treated with azacitidine (53.3 vs 55%,  $P=0.863$ ).

As previously mentioned, to elucidate whether there was a bias on the survival analysis related to differences between groups in diagnosis dates, we compared the proportion of patients diagnosed with erythroleukemia with that diagnosed with refractory anemia with excess blasts-2 in each one of the periods anteriorly proposed (1972 to <2000, 2000 to <2009, and 2009 to present) and no difference was observed (15.3% of erythroleukemias vs 16.1% of refractory anemias with excess blasts-2 in the first period, 33.9% of erythroleukemias vs 35.9% of refractory anemias with excess blasts-2 in the second period, 50.8% of erythroleukemias vs 47.9% of refractory anemias with excess blasts-2 in the third period;  $P=0.915$ ).

## Discussion

Myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias with equal or greater than 50% erythroblasts in bone marrow represent up to 15% of myelodysplastic syndromes and around 5% of acute myeloid leukemias, respectively.<sup>11</sup> In the present study, the largest series of *de novo* erythroid-predominant myelodysplastic syndromes reported to date and an extensive group of *de novo* erythroleukemia defined by the WHO 2008 criteria were compared. Clinical, morphological, cytogenetic and molecular features of erythroleukemia have been described in several retrospective studies but most of those articles also collected cases of therapy-related myeloid neoplasms and secondary erythroleukemias.<sup>6–10</sup>

Classification of myeloid malignances with expanded erythropoiesis is often difficult and requires integration of clinical, morphological, and cytogenetic features. The definition and classification of erythroleukemia have been changed over the years.<sup>1–2,16–19</sup> The 2008 WHO classification recommended to enumerate bone marrow blasts from nonerythroid cells when bone marrow erythroblasts were equal or greater than 50%. In those instances,

**Table 3** Comparison for main demographic, clinical, and biological characteristics between 59 *de novo* erythroleukemias and 459 refractory anemia with excess blasts-2

Characteristic	Erythroleukemia, N = 59	RAEB-2, N = 459	P-values
Age, median (range), years	71.09 (26–88)	72.26 (20–96)	0.424
Male gender, n (%)	38 (64)	297 (64.7)	0.964
Hemoglobin, median (range), g/l	9.0 (4.8–14.7)	9.2 (4.6–16.1)	0.253
Neutrophil count, median (range), × 10 <sup>9</sup> /l	0.84 (0.05–9.12)	1.1 (0.04–21.7)	0.053
Platelet count, median (range), × 10 <sup>9</sup> /l	65 (12–394)	79 (3–440)	0.145
Erythroblasts, median (range), %	58.6 (50–85)	27 (6–49)	< <b>0.001</b>
BM blasts from TNCs, median (range), %	12 (5–19)	13 (3–19.2)	0.269
BM blasts from NECs, median (range), %	30.2 (20–67.9)	18.18 (4.8–34.7)	< <b>0.001</b>
Dyserythropoiesis, median (range), %	40 (4–100)	30 (0–100)	0.085
Dysgranulopoiesis, median (range), %	20 (0–100)	50 (0–100)	<b>0.038</b>
Dysthrombopoiesis, median (range), %	25 (0–100)	33 (0–100)	0.369
Karyotype, abnormal/total cases (%)	24/59 (40.7)	230/459 (50.1)	0.173
<i>IPSS cytogenetic group, n (%)</i>			0.387
Low	38 (64)	260 (56.8)	
Intermediate	10 (17)	75 (16.4)	
Poor	11 (19) <sup>a</sup>	123 (26.9) <sup>a</sup>	
<i>IPSS-R cytogenetic group, n (%)</i>			0.327
Very low	0	11 (2.6)	
Low	40 (68)	236 (54.9)	
Intermediate	6 (10)	65 (15.1)	
Poor	2 (3)	24 (5.6)	
Very poor	11 (19) <sup>b</sup>	94 (21.9) <sup>b</sup>	

Abbreviations: BM, bone marrow; ; IPSS, International Prognostic Scoring System; IPSS-R, IPSS revised; NECs, nonerythroid cellularity; RAEB-2, refractory anemia with excess of blasts type 2; TNC, total nucleated cells.

<sup>a</sup>No significant differences were observed in the percentage of high-risk karyotypes defined by the IPSS between refractory anemia with excess blasts -2 and erythroleukemia (IPSS, 26.9 vs 19%,  $P = 0.175$ ).

<sup>b</sup>No significant differences were observed in the percentage of high-risk karyotypes defined by the IPSS-R (poor and very poor) between refractory anemia with excess blasts-2 and erythroleukemia (27.4 vs 22%,  $P = 0.379$ ).

Statistically significance indicated in bold.

the disorder was classified as erythroleukemia when bone marrow blasts were equal or greater than 20% and as erythroid-predominant myelodysplastic syndrome when lower. In the latter, percentage of blasts must be considered from total nucleated cells.<sup>2</sup> A revision of that classification is expected this year and, as Arber *et al* mentioned in a recent paper, the elimination of the nonerythroid blast cell count rule will be recommended. Therefore, patients fulfilling erythroleukemia criteria will be now considered myelodysplastic syndromes and will be moved into the appropriate myelodysplastic syndrome category based on the blast cell count from total nucleated cells. Following this recommendation, the majority of patients will be reclassified as myelodysplastic syndromes with excess blasts-2, previously named refractory anemia with excess blasts-2, and a minority of them will be moved to categories with less than 10% bone marrow blasts, mostly myelodysplastic syndromes with excess blasts-1, prior refractory anemia with excess blasts-1.<sup>14,15</sup>

Although in the 2008 WHO classification erythroleukemia was included into acute myeloid leukemias,<sup>2</sup> our results strongly support the future WHO recommendation of considering erythroleukemia as a myelodysplastic syndrome,<sup>14,15</sup> but we have some concerns related to the disappearance of erythroleukemia as an entity. As it has been shown in our study, erythroleukemia usually presents

multilineage dysplasia, typical myelodysplastic syndrome cytogenetic aberrations, and an outcome similar to myelodysplastic syndromes with excess blasts. Moreover, recent studies suggest that cases of erythroleukemia have a molecular profile much closer to myelodysplastic syndromes than to acute myeloid leukemia without erythroid predominance.<sup>6,7,10</sup> Our results showed that erythroid-predominant refractory anemia with excess blasts-1 presented no significant difference in survival compared with *de novo* erythroleukemia and in this subset of patients, having erythroid predominance and excess blasts, the presence of a high-risk karyotype defined by the International Prognostic Scoring System or by the Revised International Prognostic Scoring System was the main prognostic factor. Survival of *de novo* erythroleukemia did not significantly differ from that observed in refractory anemia with excess blasts-2. Moreover, survival of those cases of refractory anemia with excess blasts-2 with, obviously, less than 50% bone marrow erythroblasts that, as in erythroleukemia, had equal or greater than 20% bone marrow blasts from nonerythroid cells was almost identical to *de novo* erythroleukemia. This finding underlines the arbitrariness of the established erythroblast cutoff to consider the diagnosis of erythroleukemia and the absence of prognostic impact *per se* of the erythroid predominance.

The upcoming revision of the WHO classification will consider erythroleukemias with equal or greater than 5% to less than 10% bone marrow blasts from total nucleated cells as myelodysplastic syndromes with excess blasts-1 and those with equal or greater than 10% to less than 20% bone marrow blasts from total nucleated cells as myelodysplastic syndromes with excess blasts-2.<sup>14,15</sup> In our study, we observed that *de novo* erythroleukemia patients with less than 10% bone marrow blasts from total nucleated cells (future myelodysplastic syndrome with excess blasts-1) presented a survival similar to patients with equal or greater than 10% to less than 20% bone marrow blasts from total nucleated cells (future myelodysplastic syndrome with excess blasts-2). Moreover, erythroid-predominant refractory anemia with excess blasts-1 showed a significant inferior overall survival than refractory anemia with excess blasts-1 with less than 50% bone marrow erythroblasts. This could be explained, at least in part, by the differences in the median percentage of bone marrow blasts calculated from nonerythroid cells. Although the median percentage of bone marrow blasts from total nucleated cells was higher in refractory anemia with excess blasts-1 with less than 50% bone marrow erythroblasts than in erythroid-predominant refractory anemia with excess blasts-1, the latter showed a significant higher median percentage of bone marrow blasts from nonerythroid cells. This finding highlights the importance of considering the percentage of bone marrow blasts from nonerythroid cells, especially in the subset of erythroid-rich myelodysplastic syndrome patients.<sup>11</sup> For all the above, the new proposal of including erythroleukemia patients with equal or greater than 5% to less than 10% bone marrow blasts from total nucleated cells in the myelodysplastic syndrome with excess blasts-1 category could underestimate the prognostic prediction of this group of low-blast count erythroleukemias. The elimination of the nonerythroid blast cell count rule implies the disappearance of erythroleukemia as an entity. In our opinion, considering *de novo* erythroleukemia as a 'high-risk' myelodysplastic syndrome subgroup could be a proper approach to avoid the underestimation of those cases with a higher percentage of bone marrow erythroblasts and lower bone marrow blast count from total nucleated cells.

In summary, our data suggest that erythroleukemia is in the spectrum of myelodysplastic syndromes with excess blasts and support its inclusion into future myelodysplastic syndrome classifications rather than in acute myeloid leukemia ones. Classifying these poor outcome patients, usually elderly and unfit to receive common acute myeloid leukemia-type treatments, into myelodysplastic syndrome categories could permit them to benefit from a myelodysplastic syndrome-oriented prognostic assessment and could serve for their inclusion in future myelodysplastic syndrome-specific clinical trials.

## Acknowledgments

We thank Luis Benlloch and Ana Vicente by the maintenance of the *Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos* database. Institutions and investigators from the *Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos* that participated in the present study are listed in the Supplementary Information. This work has been partially supported by the following grants: RD12/0036/0044 from Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC, FEDER); and 2014/SGR585 from Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca of Generalitat de Catalunya.

## Disclosure/conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- 1 Brunning RD, Bennett JM, Flandrin G, *et al*. Myelodysplastic syndromes: introduction. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H (eds). World Health Organization Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press, World Health Organization: Lyon, France, 2001, pp 1–351.
- 2 Brunning RD, Orazi A, Germing U, *et al*. Myelodysplastic syndromes. In: Swerdlow S, Campos E, Lee Harris N (eds). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC press, World Health Organization: Lyon, France, 2008, pp 87–107.
- 3 Lessard M, Struski S, Leymarie V, *et al*. Cytogenetic study of 75 erythroleukemias. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;163:113–122.
- 4 Park S, Picard F, Guesnu M, *et al*. Erythroleukemia and RAEB-t: a same disease? *Leukemia* 2004;18:888–890.
- 5 Cuneo A, van Orshoven A, Michaux JL, *et al*. Morphologic, immunologic and cytogenetic studies in erythroleukaemia: evidence for multilineage involvement and identification of two distinct cytogenetic-clinicopathological types. *Br J Haematol* 1990;75:346–354.
- 6 Bacher U, Haferlach C, Alpermann T *et al*. Comparison of genetic and clinical aspects in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes all with more than 50% of bone marrow erythropoietic cells. *Haematologica* 2011;96:1284–1292.
- 7 Grossmann V, Bacher U, Haferlach C, *et al*. Acute erythroid leukemia (AEL) can be separated into distinct prognostic subsets based on cytogenetic and molecular genetic characteristics. *Leukemia* 2013;27:1940–1943.
- 8 Hasserjian RP, Zuo Z, Garcia C, *et al*. Acute erythroid leukemia: a reassessment using criteria refined in the 2008 WHO classification. *Blood* 2010;115:1985–1992.
- 9 Santos FP, Faderl S, Garcia-Manero G, *et al*. Adult acute erythroleukemia: an analysis of 91 patients treated at a single institution. *Leukemia* 2009;23:2275–2280.
- 10 Zuo Z, Medeiros LJ, Chen Z, *et al*. Acute myeloid leukemia (AML) with erythroid predominance exhibits clinical and molecular characteristics that differ from other types of AML. *PLoS One* 2012;7:e41485.

- 11 Wang SA, Tang G, Fadare O, *et al*. Erythroid-predominant myelodysplastic syndromes: enumeration of blasts from nonerythroid rather than total marrow cells provides superior risk stratification. *Mod Pathol* 2008;21:1394–1402.
- 12 Wong E, Juneja S. Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes with 50% or greater erythroblasts: a diagnostic conundrum. *Pathology* 2015;47:289–293.
- 13 Mazzella FM, Smith D, Horn P, *et al*. Prognostic significance of pronormoblasts in erythrocyte predominant myelodysplastic patients. *Am J Haematol* 2006;81:484–491.
- 14 Arber DA, Hasserjian RP. Reclassifying myelodysplastic syndromes: what's where in the new WHO and why. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program* 2015;2015:294–298.
- 15 Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, *et al*. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016;127:2391–2405.
- 16 Bennett JM, Begg CB. Eastern cooperative Oncology Group study of the cytochemistry of adult acute leukemia by correlations of subtypes with response and survival. *Cancer Res* 1981;41:4833–4837.
- 17 Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, *et al*. Proposals for the classification of the acute leukemias. *Br J Haematol* 1976;33:451–458.
- 18 Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, *et al*. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1982;51:189–199.
- 19 Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, *et al*. Proposed revised criteria for the classification of acute leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 1985;103:620–625.
- 20 Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos (GESMD) and Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH). Guías españolas de diagnóstico y tratamiento de los síndromes mielodisplásicos y la leucemia mielomonocítica crónica. *Haematol Esp* 2012;97:11–14.
- 21 Shaffer L, Slovak M, Campbell L. ISCN2009: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Karger AG: Basel, Switzerland, 2009.
- 22 Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, *et al*. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997;89:2079–2088.
- 23 Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, *et al*. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* 2012;120:2454–2465.

Supplementary Information accompanies the paper on Modern Pathology website (<http://www.nature.com/modpathol>)

## ANEXO 2. HOJA DE RECOGIDA DE DATOS MORFOLÓGICOS DEL REGISTRO DEL GESMD.

# SMD

(Versión Febrero 2005)

Enviar a: **Fax: 607779227**

Data Manager: Luis E. Benlloch  
 Servicio de Hematología H. U. La Fe  
 Avda Campanar 21 46009 Valencia  
 e-mail: luisbenlloch@ya.com  
 Tel: 607380022

<b>Hospital</b> <input type="text"/>	<b>Nº Registro</b> <input type="text"/>	<b>Iniciales o Nombre (opcional)</b> <input type="text"/>	<input type="text"/>
<b>Sexo</b> <input type="checkbox"/> 1 = Hombre <input type="checkbox"/> 2 = Mujer	<b>Fecha de Nacimiento</b> <input type="text"/>	<b>Nº Historia</b> <input type="text"/>	<input type="text"/>

<b>Datos al diagnóstico</b>	<b>Fecha de diagnóstico</b> <input type="text"/>	<b>Hemoglobina (g/dl)</b> <input type="text"/>											
<b>Clasificación FAB</b> <input type="checkbox"/>	<b>Antecedentes</b> <b>SMD secundario a QT/RT</b> <input type="checkbox"/> 0 = No 1 = Si	<b>Plaquetas (10<sup>9</sup>/L)</b> <input type="text"/>											
<table style="font-size: x-small; border: 1px dashed black; padding: 2px;"> <tr><td>1 = AR</td><td>4 = AREB-T</td></tr> <tr><td>2 = ARS</td><td>5 = LMMC</td></tr> <tr><td>3 = AREB</td><td>9 = Otro (ir comentarios)</td></tr> </table>		1 = AR	4 = AREB-T	2 = ARS	5 = LMMC	3 = AREB	9 = Otro (ir comentarios)	<b>Leucocitos (10<sup>9</sup>/L)</b> <input type="text"/>					
1 = AR	4 = AREB-T												
2 = ARS	5 = LMMC												
3 = AREB	9 = Otro (ir comentarios)												
<b>Clasificación WHO</b> <input type="checkbox"/>	<b>Celularidad</b> <b>Aspirado MO</b> <input type="checkbox"/> 0 = No realizado 1 = Normal 2 = Hipocelular 3 = Hiper celular <b>Biopsia MO</b> <input type="checkbox"/>	<b>PMN (%)</b> <input type="text"/>											
<table style="font-size: x-small; border: 1px dashed black; padding: 2px;"> <tr><td>1 = AR</td><td>7 = SMD Inclasificable</td></tr> <tr><td>2 = ARS</td><td>8 = Síndrome Sq</td></tr> <tr><td>3 = CRDM</td><td>9 = SMD/SMPC LMMC</td></tr> <tr><td>4 = CRDM-SA</td><td>10 = SMD/SMPC no LMMC</td></tr> <tr><td>5 = AREB1</td><td>11 = LMA (&gt;20% Blastos)</td></tr> <tr><td>6 = AREB-2</td><td>99 = Otros (ir comentarios)</td></tr> </table>		1 = AR	7 = SMD Inclasificable	2 = ARS	8 = Síndrome Sq	3 = CRDM	9 = SMD/SMPC LMMC	4 = CRDM-SA	10 = SMD/SMPC no LMMC	5 = AREB1	11 = LMA (>20% Blastos)	6 = AREB-2	99 = Otros (ir comentarios)
1 = AR	7 = SMD Inclasificable												
2 = ARS	8 = Síndrome Sq												
3 = CRDM	9 = SMD/SMPC LMMC												
4 = CRDM-SA	10 = SMD/SMPC no LMMC												
5 = AREB1	11 = LMA (>20% Blastos)												
6 = AREB-2	99 = Otros (ir comentarios)												
<b>Citogenética</b> <input type="checkbox"/>	<b>Cariotipo desarrollado</b> <input type="checkbox"/>	<b>Blastos SP (%)</b> <input type="text"/>											
<table style="font-size: x-small; border: 1px dashed black; padding: 2px;"> <tr><td>0 = No hecha</td><td>1 = Normal</td><td>2 = Anormal</td><td>3 = No mitosis</td></tr> </table>	0 = No hecha	1 = Normal	2 = Anormal	3 = No mitosis	<b>Bastones de Auer</b> <input type="checkbox"/> 0 = No 1 = Si	<b>LDH (U/L)</b> <input type="text"/>							
0 = No hecha	1 = Normal	2 = Anormal	3 = No mitosis										
<b>Fibrosis</b> <input type="checkbox"/> 0 = No 1 = Si	<b>ALIP</b> <input type="checkbox"/> 0 = No 1 = Si	<b>Blastos MO (%)</b> <input type="text"/>											
<b>Beta-2-microglobulina</b> <input type="text"/> mg/L	<b>Niveles de EPO</b> <input type="text"/> U/L	<b>Serie eritroide MO (%)</b> <input type="text"/>											
<b>Micromegacariocitos</b> <input type="text"/> %	<b>Degranulación + Pelger</b> <input type="text"/> %	<b>Sideroblastos anillados (%)</b> <input type="text"/>											
<b>Datos de la evolución</b>	<b>Tipo FAB</b> <input type="checkbox"/>	<b>Transformación a LMA</b> <input type="checkbox"/> 0 = No 1 = Si											
	<table style="font-size: x-small; border: 1px dashed black; padding: 2px;"> <tr><td>1 = AR</td><td>4 = AREB-T</td></tr> <tr><td>2 = ARS</td><td>5 = LMMC</td></tr> <tr><td>3 = AREB</td><td>9 = Otro (ir comentarios)</td></tr> </table>	1 = AR	4 = AREB-T	2 = ARS	5 = LMMC	3 = AREB	9 = Otro (ir comentarios)	<b>Fecha de transformación</b> <input type="text"/>					
1 = AR	4 = AREB-T												
2 = ARS	5 = LMMC												
3 = AREB	9 = Otro (ir comentarios)												
	<b>Citogenética</b> <input type="checkbox"/>	<b>Fecha de transformación</b> <input type="text"/>											
	<table style="font-size: x-small; border: 1px dashed black; padding: 2px;"> <tr><td>0 = No hecha</td><td>1 = Normal</td><td>2 = Anormal</td><td>3 = No mitosis</td></tr> </table>	0 = No hecha	1 = Normal	2 = Anormal	3 = No mitosis	<b>Cariotipo desarrollado</b> <input type="checkbox"/>							
0 = No hecha	1 = Normal	2 = Anormal	3 = No mitosis										
<b>Valoración del estado actual</b>	<b>Estado</b> <input type="checkbox"/>	<b>Fecha de valoración</b> <input type="text"/>											
	<table style="font-size: x-small; border: 1px dashed black; padding: 2px;"> <tr><td>1 = Vivo</td><td>2 = Muerto</td><td>8 = Perdido</td></tr> </table>	1 = Vivo	2 = Muerto	8 = Perdido	<b>Causa de muerte</b> 1.- <input type="checkbox"/> 2.- <input type="checkbox"/>								
1 = Vivo	2 = Muerto	8 = Perdido											
	<table style="font-size: x-small; border: 1px dashed black; padding: 2px;"> <tr><td>1 = Hemorragia</td><td>2 = Infección</td><td>3 = Progresión</td><td>9 = Otra, ir a comentarios</td></tr> </table>	1 = Hemorragia	2 = Infección	3 = Progresión	9 = Otra, ir a comentarios	<b>Autopsia</b> <input type="checkbox"/>							
1 = Hemorragia	2 = Infección	3 = Progresión	9 = Otra, ir a comentarios										
		<table style="font-size: x-small; border: 1px dashed black; padding: 2px;"> <tr><td>0 = No</td><td>1 = Si</td><td>8 = Desconocido</td><td>9 = Otros</td></tr> </table>	0 = No	1 = Si	8 = Desconocido	9 = Otros							
0 = No	1 = Si	8 = Desconocido	9 = Otros										
<b>Comentarios</b>													