



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Valoració pronòstica de les síndromes mielodisplàstiques i de la leucèmia mielomonocítica crònica

Xavier Calvo González



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

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

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

Departament de Medicina



Facultat de Medicina

Universitat de Barcelona

**Valoració pronòstica de les síndromes
mielodisplàstiques i de la leucèmia
mielomonocítica crònica**

Memòria presentada per

Xavier Calvo González

per optar al Grau de

Doctor en Medicina

Tesi realitzada sota la direcció del doctor **Benet Nomdedeu Tobella**

Xavier Calvo González

Benet Nomdedeu Tobella

Barcelona, 2018

El Dr. Benet Nomdedeu Tobella, professor titular de Medicina de la Universitat de Barcelona. Metge consultor del servei d'Hematologia de l'Hospital Clínic de Barcelona.

CERTIFICA

Que la tesi doctoral titulada “Valoració pronòstica de les síndromes mielodisplàstiques i de la leucèmia mielomonocítica crònica”, presentada per Xavier Calvo González per a accedir al títol de Doctor en Medicina, ha estat realitzada sota la seva direcció i compleix els requisits formals i científics per a ser defensada davant del tribunal corresponent.

Barcelona, 2018

Dr. Benet Nomdedeu Tobella

Al Paco, el meu pare, el meu mestre

A la mare, la Mireia, la Minerva i la Mar, els pilars de la meva vida

Malgrat que és costum donar peu a la secció d'agraïments citant algun filòsof, científic o escriptor, no goso fer-ho per pudor i ignorància. Això sí, parafrasejaré a una companya de l'Hospital Clínic, "Xavi, lo bueno de las guardias es que siempre se acaban". Darrera d'aquest axioma aparentment senzill i evident, sempre vaig trobar un bri d'esperança. És l'essència de l'estoïcisme constructiu, una mena de "mode espora" proactiu. Sempre he envejat aquells companys que ja sigui per ferma autoconvicció o per una mena d'hedonisme vocacional et deien amb un somriure a la cara: "doncs a mi m'agraden les guàrdies" o "les guàrdies són molt necessàries, s'hi aprèn molt". Bé, davant la consecució d'un èxit hom hauria de sentir-se eufòric, però viscut des de l'estoïcisme, més aviat se sent alleujat. Quan s'albira la meta després d'una carrera de fons és el moment de reflexionar i el més important, preguntar-se si l'esforç ha valgut la pena. Suposadament, l'assoliment de les fites marcades és motiu suficient per concloure que l'afany ha valgut la pena, però sota el meu punt de vista, només té un sentit vertader si s'ha gaudit del camí. Tal i com funciona el món acadèmic i les carreres professionals en medicina, no crec que tinguem el luxe de poder-nos-ho plantejar. Crec que per poder contestar de forma positiva a la pregunta és necessari defugir d'una idea purament finalista. L'important d'una tesi no hauria d'ésser simplement tenir-la. Tal i com ho veig, la generació d'una tesi ens ofereix el privilegi de poder expressar-nos. És una porta oberta a emetre reflexions, transgressions, aplaudiments i enuigs. Bàsicament és una porta oberta a l'expressió del pensament crític, que en essència és el vertader motor del creixement personal.

Òbviament, la secció d'agraïments serveix per dedicar unes paraules als mestres i companys que han contribuït d'alguna manera al nostre aprenentatge. No em veig capaç de ser just en anomenar uns companys i inevitablement deixar-me uns altres. No sé on és correcte retallar. Així que malgrat ésser una atípia no faré mencions específiques. Prefereixo agrair globalment als meus companys i mentors de l'Hospital Clínic i de l'Hospital del Mar per haver-me transmès coneixements i sobretot, per permetre'm gaudir de la seva faceta humana. Aquí em permeto una excepció per dedicar unes paraules al meu director, el Benet Nomdedeu. Vull agrair-te la confiança que vas dipositar en mi i que sempre em donessis suport i

autonomia. Gràcies per introduir-me al món de les SMD i per transmetre'm rigor i entusiasme.

A la meva família, dir-vos que us admiro. Gràcies per recolzar-me sempre.

Xavier Calvo González

Barcelona, novembre 2018

ÍNDEX

Índex	I
Abreviatures	V
Taules i figures	XI
I. INTRODUCCIÓ	1
1. Introducció a les neoplàsies mieloides	3
2. Definició de les síndromes mielodislàstiques i de la leucèmia mielomonocítica crònica	4
3. Aproximació històrica a la nosologia de les síndromes mielodislàstiques i de la leucèmia mielomonocítica crònica. Justificació de l'estudi conjunt d'ambdues entitats en una única tesi doctoral.	5
4. Epidemiologia	8
4.1 Síndromes mielodislàstiques	8
4.2 Leucèmia mielomonocítica crònica	8
5. Etiologia	9
5.1 Síndromes mielodislàstiques	9
5.2 Leucèmia mielomonocítica crònica	10
6. Patogènia	10
6.1 Patogènia de les síndromes mielodislàstiques	10
6.2 Patogènia de la leucèmia mielomonocítica crònica	17
7. Manifestacions clíniques	19
8. Diagnòstic i classificació de les síndromes mielodislàstiques i de la leucèmia mielomonocítica crònica	20
8.1 Diagnòstic i classificació de les síndromes mielodislàstiques	21
8.1.1 Criteris mínims pel diagnòstic de les síndromes mielodislàstiques	23
8.1.2 Classificació de les síndromes mielodislàstiques	25
8.1.2.1 Classificació FAB	25
8.1.2.2 Classificació OMS 2001	26
8.1.2.3 Classificació OMS 2008	28
8.1.2.3.1 Formes especials de síndromes mielodislàstiques	30
8.1.2.3.1.1 Síndromes mielodislàstiques amb increment de la sèrie eritroide i eritroleucèmia: controvèrsies sobre el recompte medul·lar de blasts	31
8.1.2.4 Revisió 2017 de la classificació de l'OMS	34
8.1.3 Paper de la citogenètica en el diagnòstic de les síndromes mielodislàstiques	36
8.1.4 Paper de la biologia molecular en el diagnòstic de les síndromes mielodislàstiques. Tècniques de seqüenciació massiva del genoma	38
8.1.5 Paper de la citometria de flux en el diagnòstic de les síndromes mielodislàstiques	47
8.2 Diagnòstic i classificació de la leucèmia mielomonocítica crònica	48
8.2.1 Criteris diagnòstics actuals de la leucèmia mielomonocítica crònica	49
8.2.2 Classificació de la leucèmia mielomonocítica crònica	51
8.2.3 Paper de la citogenètica en el diagnòstic de la leucèmia mielomonocítica crònica	52
8.2.4 Paper de la biologia molecular en el diagnòstic de la leucèmia mielomonocítica crònica	53
8.2.5 Paper de la citometria de flux en el diagnòstic de la leucèmia mielomonocítica crònica	55
9. Valoració pronòstica de les síndromes mielodislàstiques i de la leucèmia mielomonocítica crònica	58
9.1 Valoració pronòstica de les síndromes mielodislàstiques	58
9.1.1 Valor pronòstic de la morfologia: displàsia multilínia i percentatge de blasts	61

9.1.2 Valor pronòstic de la citogenètica	62
9.1.3 Valor pronòstic de les mutacions	64
9.1.4 Valor pronòstic de la metilació de l'ADN	68
9.1.5 Índexs pronòstics	71
9.1.5.1 <i>International prognostic scoring system</i> (IPSS)	71
9.1.5.2 <i>Revised International prognostic scoring system</i> (IPSS-R)	73
9.1.5.3 <i>WHO classification-based prognostic scoring system</i> (WPSS)	74
9.1.5.4 <i>MD Anderson global prognostic scoring system</i> (MPSS) i <i>Low-risk prognostic scoring system</i> (LR-PSS)	75
9.1.6 Recomanacions del GESMD per a l'estratificació pronòstica de les síndromes mielodisplàstiques	76
9.2 Valoració pronòstica de la leucèmia mielomonocítica crònica	77
9.2.1 <i>MD Anderson prognostic scoring system</i> (MDAPS)	79
9.2.2 <i>CMML-specific prognostic scoring system</i> (CPSS)	80
9.2.3 <i>Groupe Français des Myélodysplasies</i> (GFM) <i>prognostic score</i> (GFM score)	81
9.2.4 <i>Mayo prognostic model</i> (Mayo model)	81
9.2.5 Mayo molecular model (MMM)	82
9.2.6 <i>Molecular CMML-specific prognostic scoring system</i> (CPSS-Mol)	82
10. Tractament de les síndromes mielodisplàstiques i de la leucèmia mielomonocítica crònica	83
10.1 Tractament de les síndromes mielodisplàstiques	83
10.2 Tractament de la leucèmia mielomonocítica crònica	85
II. HIPÒTESIS I OBJECTIUS	89
III. MÈTODES I RESULTATS	97
Primer treball	101
Segon treball	111
Tercer treball	131
Quart treball	145
Cinquè treball	161
IV. DISCUSSIÓ	171
Primer treball	174
Segon treball	177
Tercer treball	183
Quart treball	186
Cinquè treball	189
V. CONCLUSIONS	193
VI. BIBLIOGRAFIA	199
VII. ANNEX	237

ABREVIATURES

ADN	Àcid desoxiribonucleic
AEE	Agents estimulants de l'eritropoesi
ALIP	<i>Atypical localization of immature precursors</i>
ALO-TPH	Transplantament al·logènic de progenitors hematopoètics
AR	Anèmia refractària
AREB	Anèmia refractària amb excés de blasts
AREB-T	Anèmia refractària amb excés de blasts en transformació
ARN	Àcid ribonucleic
ARNm	ARN missatger
ARSA	Anèmia refractària amb sideroblasts en anell
AZA	Azacitidina
CCUS	<i>Clonal cytopenia of undetermined significance</i>
CGH	<i>Comparative genomic hybridization</i>
CHIP	<i>Clonal hematopoiesis of indeterminate potential</i>
CNE	Cel·lularitat no eritroide
CPE	<i>Concordance probability estimate</i>
CPSS	<i>CMML-specific prognostic scoring system</i>
CPSS-Mol	<i>Molecular CMML-specific Prognostic Scoring System</i>
CRDM	Citopènia refractària amb displàsia multilínia
CRDM-SA	CRDM amb sideroblasts en anell
ELN	<i>European Leukemia Net</i>
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>

FAB	Francès-Americà-Britànic
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
G-CSF	Factor estimulant de colònies granulocítiques
GESMD	Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos
GFM	<i>Groupe Français des Myélodysplasies</i>
HR	<i>Hazard Ratio</i>
ICUS	<i>Idiopathic cytopenia of undetermined significance</i>
IDUS	<i>Idiopathic dysplasia of undetermined significance</i>
IWG	<i>International Working Group</i>
IWGM-MDS	<i>IWG on Morphology of Myelodysplastic Syndrome</i>
IPSS	<i>International Prognostic Scoring System</i>
IPSS-R	<i>Revised International Prognostic Scoring System</i>
LMA	Leucèmia mieloide aguda
LMMC	Leucèmia mielomonocítica crònica
LMMC-MD	Leucèmia mielomonocítica crònica, variant displàstica
LMMC-MP	Leucèmia mielomonocítica crònica, variant proliferativa
LR-PSS	<i>Low-Risk Prognostic Scoring System</i>
MDAPS	<i>MD Anderson Prognostic Scoring System</i>
MMM	<i>Mayo Molecular Model</i>
MO	Medul·la òssia
MPSS	<i>MD Anderson Global Prognostic Scoring System</i>
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>

NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NMP	Neoplàsia mieloproliferativa
OMS	Organització Mundial de la Salut
PAS	<i>Periodic acid-Schiff</i>
PMO	Punció de moll d'os
QT	Quimioteràpia
SG	Supervivència global
SMD	Síndrome mielodislàstica
SMD-DU	Síndrome mielodislàstica amb displàsia unilínia
SMD-DM	Síndrome mielodislàstica amb displàsia multilínia
SMD-E	Síndrome mielodislàstica amb predominança eritroide
SMD-EB	Síndrome mielodislàstica amb excés de blasts
SMD-EB-1	Síndrome mielodislàstica amb excés de blasts 1
SMD-EB-2	Síndrome mielodislàstica amb excés de blasts 2
SMD/NMP	Neoplàsia mielodislàstica/mieloproliferativa
SMD-SA	Síndrome mielodislàstica amb sideroblasts en anell
SMD-SA-DU	SMD-SA i displàsia unilínia
SMD-SA-DM	SMD-SA i displàsia multilínia
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SP	Sang perifèrica
TC	Totalitat cel·lular
TIS	Tractament immunosupressor

TPH	Transplantament de progenitors hematopoètics
WHO	World Health Organization
WPSS	<i>WHO classification-based prognostic scoring system</i>

TAULES I FIGURES

TAULES

Taula 1. Classificació FAB de les SMD.

Taula 2. Classificació OMS 2001 de les SMD.

Taula 3. Classificació OMS 2008 de les SMD.

Taula 4. Característiques morfològiques de les neoplàsies mieloides que cursen amb $\geq 50\%$ d'eritroblasts a moll d'os (OMS 2008).

Taula 5. Revisió 2017 de la classificació de l'OMS.

Taula 6. Alteracions citogenètiques associades a SMD segons l'OMS 2017.

Taula 7. Sistema de puntuació de l'IPSS.

Taula 8. Sistema de puntuació de l'IPSS-R.

Taula 9. Sistema de puntuació del WPSS.

FIGURES

Figura 1. Evolució històrica de les diferents classificacions de les síndromes mielodisplàstiques (FAB 1976, FAB 1982, OMS 2001 i OMS 2008).

Figura 2. Diagnòstic diferencial entre les SMD i altres causes de citopènies clonals o no clonals amb o sense displàsia.

Figura 3. Freqüència de les mutacions somàtiques i principals anomalies citogenètiques en les SMD i distribució d'aquestes per subtipus. S'inclouen la LMMC, altres subtipus de neoplàsies mielodisplàstiques/mieloproliferatives i LMA amb 20-30% blasts a MO (AREB-T de la FAB).

Figura 4. Relacions entre genotip i fenotip en les SMD, LMMC, altres neoplàsies mielodisplàstiques/mieloproliferatives (ARSA amb trombocitosi i leucèmia mieloide crònica atípica) i la leucèmia neutrofílica crònica.

Figura 5. Associacions entre mutacions i alteracions citogenètiques amb subtipus concrets de SMD, LMMC, altres subtipus de SMD/NMP i LMA amb 20-<30% blasts a MO (AREB-T de la FAB).

Figura 6. Distribució de les principals mutacions somàtiques recurrents en les SMD.

Figura 7. Freqüència de les principals mutacions somàtiques recurrents en la LMMC. Comparació de la seva freqüència entre les LMMC displàstiques i proliferatives.

Figura 8. Mutacions i vies funcionals afectades en la LMMC.

Figura 9. Patró maduratiu immunofenotípic normal dels diferents elements de la sèrie monocítica a moll d'os.

Figura 10. Distribució de les poblacions monocitàries a SP per citometria de flux.

Figura 11. Algoritme diagnòstic de la LMMC en què s'integra l'estudi de la distribució de les poblacions monocitàries per citometria de flux.

Figura 12. Relació entre la supervivència global i el nombre de mutacions en les SMD.

Figura 13. La presència de mutacions de *TP53* confereix un pronòstic advers a les SMD amb cariotip complex.

Figura 14a. Freqüència i implicació pronòstica de les principals mutacions somàtiques recurrents en SMD sense excés de blasts.

Figura 14b. Freqüència i implicació pronòstica de les principals mutacions somàtiques recurrents en SMD amb excés de blasts i LMA amb 20-<30% blasts.

Figura 15. Algoritme de tractament per a les SMD de baix risc proposat pel GESMD.

Figura 16. Algoritme de tractament per a les SMD d'alt risc proposat pel GESMD.

Figura 17. Algoritme de tractament per a la LMMC proposat pel GESMD.

I. INTRODUCCIÓ

1. Introducció a les neoplàsies mieloides

Denominem neoplàsies mieloides al conjunt de neoplàsies derivades d'un progenitor mioide. A partir d'un cèl·lula mare totipotent anomenada cèl·lula mare limfomioide (CFU-LM), amb capacitat de proliferació, diferenciació i autorenovació sorgeixen la cèl·lula germinal limfoide (CFU-L) i la cèl·lula germinal mioide (CFU-M) (Ogawa, 1993; Ploemacher, 1999). Aquesta última és capaç de donar lloc a poblacions compromeses cap a la diferenciació en alguna de les línies mieloides. Segons la classificació de l'Organització Mundial de la Salut (OMS), la sèrie mioide engloba a les línies granulocítica (neutròfils, eosinòfils i basòfils), monocítica/macrofàgica, eritroide, megacariocítica i mastocítica (Jaffe *et al*, 2001; Swerdlow *et al*, 2008, 2017). L'espectre clínic-biològic de les diferents neoplàsies mieloides dependrà de si es produeix un excés de proliferació d'una o més línies mieloides, per l'absència o alteració de la maduració dels precursors mieloides o bé si es produeix una mielopoesi inefectiva i/o disfuncional. Així, si els precursors mieloides tenen defectes en la maduració amb o sense avantatges proliferatius donaran lloc a una leucèmia aguda mioide (LMA). Per contra, si els precursors mieloides maduren de manera efectiva es desenvoluparan les neoplàsies mieloproliferatives cròniques (NMP) i si aquests maduren de forma ineficaç o disfuncional donaran lloc a les síndromes mielodisplàstiques (SMD). Finalment, les neoplàsies mieloides que presenten trets propis de les SMD (displàsia morfològica, citopènies, risc d'evolució a LMA) i de les NMP (leucocitosi, trombocitosi, visceromegàlies) configuren el grup de les neoplàsies mielodisplàstiques/mieloproliferatives.

La classificació de l'OMS 2017 (Swerdlow *et al*, 2017) de les neoplàsies mieloides inclou nou categories:

- Neoplàsies mieloproliferatives
- Mastocitosis
- Neoplàsies mieloides i limfoides amb eosinofília i reordenament dels gens *PDGFRA*, *PDGFRB*, *FGFR1* i *PCM1-JAK2*
- Neoplàsies mielodisplàstiques/mieloproliferatives

o Leucèmia mielomonocítica crònica

- o Leucèmia mieloide crònica atípica, *BCR-ABL1*-negativa
- o Leucèmia mielomonocítica juvenil
- o Neoplàsia mielodisplàstica/mieloproliferativa amb sideroblasts en anell i trombocitosi
- o Neoplàsia mielodisplàstica/mieloproliferativa, inclassificable
- **Síndromes mielodisplàstiques**
 - o Síndrome mielodisplàstica amb displàsia unilínia
 - o Síndrome mielodisplàstica amb sideroblasts en anell
 - o Síndrome mielodisplàstica amb displàsia multilínia
 - o Síndrome mielodisplàstica amb excés de blasts
 - Síndrome mielodisplàstica amb excés de blasts i predomini eritroide
 - Síndrome mielodisplàstica amb excés de blasts i fibrosi
 - o Síndrome mielodisplàstica amb displàsia unilínia
 - o Síndrome mielodisplàstica amb deleció (5q) aïllada
 - o Síndrome mielodisplàstica, inclassificable
 - o Síndrome mielodisplàstica de la infància
 - Citopènia refractària de la infància
- Neoplàsies mieloides amb predisposició a línia germinal
- Leucèmies agudes mieloides i neoplàsies de precursors relacionades
- Neoplàsia de cèl·lules dendrítiques plasmocitoides blàstiques
- Leucèmies agudes de llinatge ambigu (amb component mieloide)

2. Definició de les síndromes mielodisplàstiques i de la leucèmia mielomonocítica crònica

Les síndromes mielodisplàstiques (SMD) són un grup heterogeni de patologies clonals de la cèl·lula mare hematopoètica (Jaiswal & Ebert, 2014; Woll *et al*, 2014) caracteritzades per la presència de citopènies, displàsia en una o més sèries hematopoètiques, hematopoesi inefectiva i una inherent propensió a l'evolució a la LMA (Bennett *et al*, 1982; Cazzola & Malcovati, 2005; Tefferi & Vardiman, 2009). Habitualment presenten un moll d'os hipercel·lular o normocel·lular, malgrat que

pot ser hipocel·lular en aproximadament el 10-15% dels casos (Tuzuner *et al*, 1995; Bennett & Orazi, 2009).

La leucèmia mielomonocítica crònica (LMMC) és una patologia clonal originada en la cèl·lula mare hematopoètica amb característiques pròpies de les neoplàsies mieloproliferatives i de les síndromes mielodisplàstiques. La LMMC es caracteritza per la presència de monocitosi a sang perifèrica acompanyada de displàsia a medul·la òssia. Les citopènies, especialment anèmia i plaquetopènia, són freqüents i en alguns casos s'observa la presència d'hepato i/o esplenomegàlia. Tal i com succeeix amb les síndromes mielodisplàstiques presenten una propensió inherent a evolucionar a una LMA (Jaffe *et al*, 2001; Swerdlow *et al*, 2008, 2017).

3. Aproximació històrica a la nosologia de les síndromes mielodisplàstiques i de la leucèmia mielomonocítica crònica. Justificació de l'estudi conjunt d'ambdues entitats en una única tesi doctoral

Abans de la utilització sistemàtica del terme síndrome mielodisplàstica l'any 1982 (Bennett *et al*, 1982), aquest grup heterogeni de patologies van rebre diferents denominacions. L'any 1938, Rhoads i Barker varen utilitzar el terme anèmia refractària per descriure un subgrup d'anèmies d'etiologia desconeguda que no responien al tractament (Steensma, 2012). L'any 1949, Hamilton-Patterson utilitzaria la denominació d'anèmia preleucèmica per referir-se a alguns casos d'anèmia refractària que evolucionaven a una leucèmia aguda (Steensma, 2012). L'any 1956, Björkman definí l'anèmia refractària amb sideroblasts en anell. Posteriorment s'usaren diferents denominacions fent especial èmfasi al risc d'evolució leucèmica que presentaven aquestes patologies: preleucèmia (Block *et al*, 1953), leucèmia aguda quiescent (Rheingold *et al*, 1963) i síndrome preleucèmica (Saarni & Linman, 1973). L'any 1974, Sexauer i col·laboradors introduïren el concepte de leucèmia mielomonocítica subaguda i, el mateix any, Miescher i Farquet, el de leucèmia mielomonocítica crònica (Steensma, 2012).

L'any 1976 es va produir la reunió del grup Francès-Americà-Britànic (FAB) per a la classificació de les leucèmies agudes i es va introduir per primera vegada el terme de síndromes dismielopoietiques (Bennett *et al*, 1976). S'emprà per definir un grup

de patologies que presentaven trets comuns amb les leucèmies agudes però de curs més crònic i que es presentaven habitualment a la gent gran. Es va arribar al consens que el llindar de blasts a moll d'os que s'usaria per diferenciar les LMA de les SMD seria del 30%. Inicialment, es van reconèixer dos subtipus diferents: anèmia refractària amb excés de blasts i leucèmia mielomonocítica crònica (LMMC). Posteriorment, el grup cooperatiu FAB (Bennett *et al*, 1982) proposà una classificació més detallada d'aquestes entitats: anèmia refractària (AR), anèmia refractària amb sideroblasts en anell (ARSA), leucèmia mielomonocítica crònica (LMMC), anèmia refractària amb excés de blasts (AREB) i anèmia refractària amb excés de blasts en transformació (AREB-T). Posteriorment, les categories proposades foren novament revisades a les classificacions de l'OMS del 2001 (Jaffe *et al*, 2001), 2008 (Swerdlow *et al*, 2008) i 2017 (Swerdlow *et al*, 2017). Les principals diferències foren l'addició de la citopènia refractària amb displàsia multilínia (CRDM) i la síndrome mielodisplàstica amb del(5q) aïllada. D'altra banda, la LMMC fou integrada en una nova categoria anomenada neoplàsies mielodisplàstiques/mieloproliferatives basant-se en el fet que presentava característiques pròpies de les SMD (displàsia morfològica, citopènies, risc d'evolució a leucèmia) i de les neoplàsies mieloproliferatives (ocasionalment, leucocitosi, esplenomegàlia i/o trombocitosi). Les classificacions de la FAB i de l'OMS 2001, 2008 i 2017 seran revisades a l'apartat "diagnòstic i classificació de les síndromes mielodisplàstiques i de la leucèmia mielomonocítica crònica". A la figura 1 es resumeix l'evolució històrica de les diferents classificacions de les síndromes mielodisplàstiques.

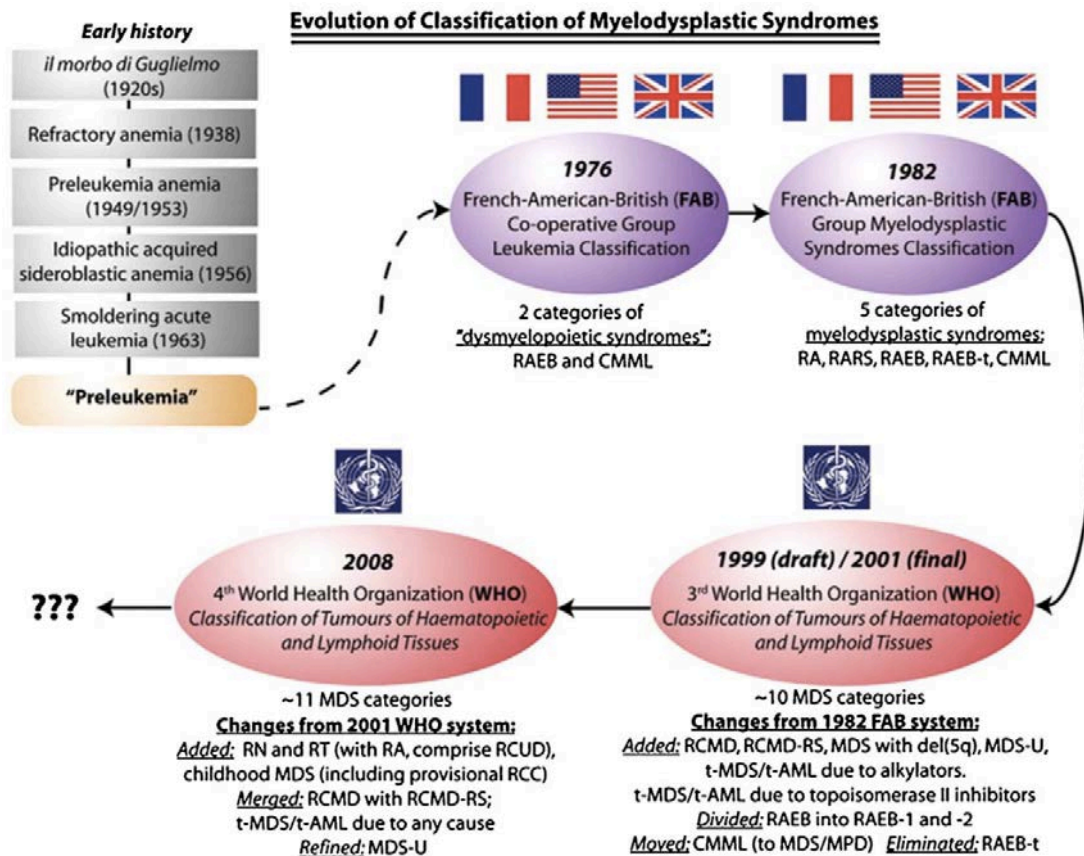


Figura 1. Evolució històrica de les diferents classificacions de les síndromes mielodisplàstiques (FAB 1976, FAB 1982, OMS 2001 i OMS 2008). Adaptat de (Steensma, 2012).

Tal i com s'ha exposat, com que la LMMC ha estat classificada històricament com un subtipus específic de SMD, els sistemes de valoració pronòstica han estat comuns en ambdues patologies. Malgrat que existien índex pronòstics específics per a la LMMC, aquests estaven basats en sèries curtes de pacients i el seu ús no estava prou estès entre la comunitat científica (Worsley *et al*, 1988; González-Medina *et al*, 2002; Aul *et al*, 1992). L'any 2002 es publicà el *MD Anderson prognostic scoring system* (MDAPS), el primer score basat en una sèrie llarga de 213 pacients amb LMMC, malgrat que el seu ús tampoc va ésser massa generalitzat (Onida *et al*, 2002; Beran *et al*, 2007). Des del 2013 han aparegut diversos índex pronòstics específics per a la LMMC, essent el *CMML-specific prognostic scoring system* (CPSS) l'score més àmpliament acceptat per a la valoració pronòstica específica de la LMMC (Such *et al*, 2013).

Per tot l'anterior, malgrat que les classificacions actuals escindeixen la LMMC de les SMD i la classifiquen com un subtipus específic de neoplàsia mielodisplàstica/mieloproliferativa, les similituds clínico-biològiques d'ambdues fan que sigui lògic revisar-les de forma conjunta en el present projecte de tesi. D'altra banda, les seves particularitats específiques fan atractiva la valoració individualitzada d'ambdues, fent especial èmfasi en intentar establir millores en quant al seu abordatge pronòstic independent, objectiu fonamental de la present tesi doctoral.

4. Epidemiologia

4.1 Síndromes mielodisplàstiques

La mediana d'edat al diagnòstic es situa entre els 70-75 anys i es presenten més freqüentment en homes, en una proporció aproximada de 2:1 (Rollison *et al*, 2008). Donat que establir un diagnòstic de certesa pot resultar complex, la seva incidència exacta és difícil de determinar. La incidència estimada és de 3-5 casos per cada 100.000 habitants/any a la població general i d'almenys 20 casos per cada 100.000 habitants/any a la població de més de 70 anys. Aproximadament, uns 100.000 nous casos de SMD són diagnosticats anualment a Estats Units i uns 25.000 casos a Europa. L'envelliment progressiu de la població suposa que les SMD siguin una malaltia d'elevada rellevància a la pràctica clínica diària (Rollison *et al*, 2008; Germing *et al*, 2004b; Swerdlow *et al*, 2017).

4.2 Leucèmia mielomonocítica crònica

La mediana d'edat al diagnòstic es situa entre els 65-75 anys i es presenta més freqüentment en homes, en una proporció aproximada de 1,5-3:1 (Swerdlow *et al*, 2017). Hi ha poca informació fefaent respecte la incidència real de la LMMC. En alguns estudis epidemiològics ha estat agrupada amb les leucèmies mieloides cròniques i en d'altres s'ha considerat un subgrup de SMD (Swerdlow *et al*, 2017). En alguns estudis s'ha estimat que les LMMC suposen aproximadament el 30% de les SMD (Swerdlow *et al*, 2017). En un estudi recent del grup holandès de SMD, la incidència fou de 0,4 casos per cada 100.000 habitants/any a la població general i

de 3,8 casos per cada 100.000 habitants/any en la població de més de 80 anys (Dinmohamed *et al*, 2014).

5. Etiologia

5.1 Síndromes mielodisplàstiques

Les SMD primàries o *de novo* es desenvolupen sense una història coneguda d'exposició a radioteràpia i/o quimioteràpia. Si existís aquest antecedent d'exposició hauríem d'establir el diagnòstic de neoplàsia mieloide relacionada amb el tractament (subtipus SMD). Les possibles etiologies de les SMD *de novo* inclouen l'exposició a tòxics mediambientals (benzens, tabac, amoni, dissolvents, pesticides, etc.) i la presència d'antecedents familiars de neoplàsies hematopoètiques (Strom *et al*, 2005; Swerdlow *et al*, 2017). L'anèmia aplàstica adquirida també s'ha associat a un risc incrementat de desenvolupar una SMD (Bagby & Meyers, 2007, 2009). Finalment, existeixen síndromes familiars associades a mutacions en línia germinal que predisposen a desenvolupar una LMA o una SMD. A la nova classificació de l'OMS de 2017 es dedica un capítol sencer a aquestes entitats sota el títol de neoplàsies mieloides amb predisposició a línia germinal. De forma resumida podríem considerar tres grans grups de neoplàsies mieloides amb predisposició a línia germinal basant-nos en la mutació existent i la presència o absència de malalties o disfuncions orgàniques prèvies. El primer grup inclou les neoplàsies mieloides associades a mutacions en línia germinal de *CEBPA* o *DDX41*, caracteritzades per la presència d'una SMD o una LMA sense altres disfuncions orgàniques significatives ni malalties prèvies. El segon grup inclou les neoplàsies mieloides associades a mutacions en línia germinal de *RUNX1*, *ANKRD26* o *ETV6*, en què els pacients afectats presenten una història prèvia d'alteracions en el nombre i/o funció plaquetàries. El tercer grup inclou les neoplàsies mieloides associades a mutacions en línia germinal en què els pacients freqüentment exhibeixen anomalies o malalties no hematològiques addicionals. Les entitats que conformen aquest tercer grup són les neoplàsies mieloides amb mutacions en línia germinal de *GATA2* (síndrome de MonoMAC; deficiència de cèl·lules dendrítiques, monòcits, limfòcits B i NK associada a vulnerabilitat a les infeccions víriques; SMD/LMA

familiar, i síndrome de Emberger); les neoplàsies mieloides associades amb alteracions de la biologia dels telòmers (síndromes associats a mutacions germinals en els gens *TERC* o *TERT* i la disqueratosi congènita); les neoplàsies mieloides associades a síndromes de falla medul·lar (anèmia de Fanconi, neutropènia congènita severa, síndrome de Shwachman-Diamond i anèmia de Diamond-Blackfan), que acostumen a aparèixer durant la infantesa, i les neoplàsies mieloides associades a la síndrome de Down (mutacions germinals en el gen *GATA1*), neurofibromatosi (mutacions germinals en el gen *NF1*) i a la síndrome de Noonan (mutacions germinals en el gen *PTPN11*) (Swerdlow *et al*, 2017).

5.2 Leucèmia mielomonocítica crònica

L'etiologia de la LMMC és desconeguda, però s'accepta que tal i com succeeix amb les SMD, l'exposició a tòxics mediambientals (benzens, tabac, amoni, dissolvents, pesticides, ...) podria associar-se a un risc incrementat de desenvolupar una LMMC. Si existís l'antecedent d'exposició a radioteràpia i/o quimioteràpia hauríem d'establir el diagnòstic de neoplàsia mieloide relacionada amb el tractament (subtipus LMMC). Dintre del capítol de l'OMS 2017 de neoplàsies mieloides amb predisposició a línia germinal es discuteixen les associades a neurofibromatosi, per mutacions germinals en el gen *NF1*, i les associades a la síndrome de Noonan, per mutacions germinals en el gen *PTPN11*. Aquestes mutacions predisposen a desenvolupar una neoplàsia mieloide amb característiques properes a la LMMC anomenada leucèmia mielomonocítica juvenil (Swerdlow *et al*, 2017). Les mutacions somàtiques adquirides en aquests gens, al igual que altres mutacions conegudes d'altres gens integrants de la via del *RAS* (*NRAS*, *KRAS*, *CBL*) s'associen amb formes proliferatives de la LMMC (Itzykson *et al*, 2017, 2013a; Elena *et al*, 2016).

6. Patogènia

6.1 Patogènia de les síndromes mielodisplàstiques

Per tal de revisar la patogènia de les SMD partirem de la definició d'aquestes entitats, ja que aquesta ens aporta pistes sobre els mecanismes biològics

subjacents al seu desenvolupament. Tal i com hem esmentat prèviament, les SMD són un grup de patologies clonals de la cèl·lula mare hematopoètica caracteritzades per la presència de citopènies, displàsia en una o més sèries hematopoètiques, hematopoesi inefectiva i una inherent propensió a l'evolució a la LMA.

Malgrat que s'ha acceptat durant anys que les SMD s'originen a la cèl·lula mare hematopoètica o *hematopoietic stem cell* (HSC), la demostració formal d'aquesta afirmació a nivell genètic no ha aparegut fins fa pocs anys (Nilsson *et al*, 2000; Jaiswal & Ebert, 2014; Woll *et al*, 2014). A un interessant estudi de Nilsson i col·laboradors estudiaren específicament el grup de SMD amb deleció aïllada de (5q) per tal de trobar la cèl·lula d'origen. Dels 10 pacients estudiats, cap va presentar l'alteració genètica al compartiment de cèl·lules T i només un va presentar la deleció 5q (del 5q) a la població de cèl·lules B. Això permetria hipotetitzar que la cèl·lula d'origen podria ser un progenitor mieloide i no una cèl·lula limfo-mieloide pluripotent. Malgrat això, quan varen separar el compartiment de HSC CD34+/CD38-, almenys el 94% de les cèl·lules presentaven una del 5q analitzades per hibridació in situ fluorescent (FISH). A més, en tres de cinc pacients analitzats, varen detectar la del 5q per FISH al compartiment de cèl·lules pro-B CD34+/CD19+ (Nilsson *et al*, 2000).

Fins l'any 2014 no vàrem disposar d'una demostració formal a nivell molecular de que la HSC és la cèl·lula d'origen de les SMD. Woll i col·laboradors varen analitzar un conjunt de mutacions clàssicament descrites a les SMD tant al DNA extret de la cel·lularitat medul·lar total com al DNA extret del pool de HSC (Lin-/CD34+/CD38-/CD90+/CD45RA-). Totes les mutacions presents a la cel·lularitat medul·lar total foren detectades també a la població de HSC (Woll *et al*, 2014). Aquesta interessant troballa aporta una forta evidència sobre l'existència de la *stem cell mielodisplàstica*, cosa que podria obrir noves vies d'investigació a nivell terapèutic, i de que tal i com s'ha assumit durant anys, les SMD són un grup de neoplàsies de la cèl·lula mare hematopoètica (Jaiswal & Ebert, 2014). En aquest model, les HSC mutades presentarien avantatges competitives respecte de les HSC normals, fet que predisposaria a l'establiment d'una hematopoesi clonal. Encara que no existeixen evidències clares sobre la causa subjacent a la displàsia morfològica en

aquestes entitats, a diferència del que succeeix a la LMA, els precursors que derivarien d'aquestes HSC mutades presentarien la capacitat de madurar, malgrat que en ocasions la maduració podria establir-se d'una manera quelcom disfuncional i/o displàstica (Raza & Galili, 2012).

L'únic criteri diagnòstic mínim que s'ha d'acomplir per poder establir el diagnòstic de SMD és la presència d'almenys una citopènia. Podríem arribar a diagnosticar una SMD sense que es constates la presència de displàsia significativa en alguna de les tres sèries mieloides sempre que el pacient presentés una alteració citogenètica definitiva de SMD (Jaffe *et al*, 2001; Swerdlow *et al*, 2008, 2017). Les citopènies a les SMD solen associar-se a una hematopoesi inefectiva, o dit d'una altra manera, solen deure's a un increment de l'apoptosi (Raza *et al*, 1995; Parcharidou *et al*, 1999). Per exemple, en les SMD amb del 5q, el fenotip característic de la malaltia (anèmia macrocítica; megacariòcits monolobulats; hipoplàsia de la sèrie eritroide, i trombocitosi, o si més no, absència de plaquetopènia) sembla associar-se a un fenomen d'haploinsuficiència per pèrdua de la regió cromosòmica 5q32-33. En un interessant estudi d'Ebert i col·laboradors, en què s'utilitzà la tècnica de l'ARN d'interferència, es demostrà que el bloqueig del gen de la proteïna ribosomal *RPS14* provocava un bloqueig de la diferenciació de la sèrie eritroide (Ebert *et al*, 2008). La infraexpressió de *RPS14* s'associa amb un increment de la proteïna p53 al compartiment eritroide, el que ocasiona un increment de l'apoptosi i determinaria la clàssica hipoplàsia eritroide que s'observa en aquest subtipus de SMD (Dutt *et al*, 2011; Schneider *et al*, 2016). Malgrat que la hipoplàsia eritroide observada a les SMD amb del 5q suposa un elegant model per explicar l'increment de l'apoptosi observada a les SMD, la majoria de les SMD presenten un moll d'os hipercl·lular. Una possible explicació és que les cèl·lules clonals presenten una avantatge proliferativa respecte de les cèl·lules hematopoètiques no clonals però al mateix temps són més sensibles a patir processos d'apoptosi intramedul·lar (Raza & Galili, 2012). Cal remarcar, que en les SMD de baix risc o sense excés de blasts, els processos d'apoptosi determinen les citopènies, principal problema clínic d'aquest grup de pacients, que en general presenten una baixa freqüència d'evolució a LMA. Per contra, quan comencen a aparèixer mecanismes de resistència a l'apoptosi, les SMD presenten un risc incrementat de progressió a LMA. En aquest sentit,

l'augment de l'expressió de la proteïna antiapoptòtica BCL2 s'ha relacionat amb un disminució de l'apoptosi i un increment en el risc de transformació leucèmica (Parker *et al*, 2000; Shimazaki *et al*, 2000). La desregulació immune també es troba a la base de la patogènia de les SMD i es relaciona directament amb l'apoptosi que actuaria com un mecanisme efector final en molts casos. Aquesta hipòtesi es sustenta en la presència de fenòmens d'autoimmunitat en les SMD (Epperson *et al*, 2001; Voulgarelis *et al*, 2004; Giannouli *et al*, 2004, 2012; Pülhorn *et al*, 2012; Montoro *et al*, 2018); la milloria de les citopènies i de la hematopoesi després de que els pacients rebin tractaments immunosupressors, com per exemple la globulina antitimocítica (ATG) o la ciclosporina en SMD de baix risc (Yazji *et al*, 2003; Passweg *et al*, 2011), i la disfunció de múltiples compartiments immunes (Kordasti *et al*, 2007, 2009; Kotsianidis *et al*, 2009; Bouchliou *et al*, 2011; Kiladjian *et al*, 2006; Epling-Burnette *et al*, 2007; Chamuleau *et al*, 2009). Es creu que la naturalesa d'aquesta disfunció immune és molt diferent en comparar les SMD de baix i d'alt risc. En les SMD de baix risc, el sistema immune està en una fase "activada", en un estat proinflamatori que promou un increment de l'apoptosi dels progenitors hematopoètics. Per contra, a les SMD d'alt risc, el sistema immune està en una fase "gastada", en un estat d'immunosupressió on fracassen els mecanismes d'immunovigilància i la neoplàsia aconsegueix evadir el sistema immune (Kerkhoff *et al*, 2013). D'aquesta manera, a les SMD de baix risc observariem increments de la resposta Th17, cèl·lules NK i limfòcits T citotòxics CD8+, i disminucions de la resposta T reguladora (Treg) i del nombre i funcionalitat de les cèl·lules mieloides supressores (MDSC), que segons alguns estudis semblen regular la resposta Treg (Kittang *et al*, 2016). Per contra, a les SMD d'alt risc observariem disminucions en els components immunes amb activitat efectora com la resposta Th17, NK i T citotòxica, i increments en el components relacionats amb funcions d'evasió de la resposta immune com la resposta Treg i de les MDSC (Kerkhoff *et al*, 2013). Malgrat que existeixen poques dades sobre quins són els mecanismes subjacents a aquesta desregulació immune sembla que les cèl·lules dendrítiques (DCs) podrien tenir un rol cabdal (Kerkhoff *et al*, 2013). Existeixen quatre grans subtipus de DCs presents a sang perifèrica: les DCs plasmocitoides (pDCs) especialitzades en la secreció d'interferó de tipus I (alfa i beta), les DCs

mieloides de tipus 1 (mDC CD1c+) especialitzades en polaritzar la immunitat cap a la resposta immune Th1, les DCs mieloides de tipus 2 (mDC CD141+) especialitzades en orquestrar respostes immunes tipus Th2 i les Slan DCs o 6-sulfo LacNAc DCs encarregades de la producció de citocines proinflamatòries i IL-12. Aquestes últimes cèl·lules dendrítiques són considerades actualment un subtipus de monòcit (*patrolling monocytes*), en concret, un monòcit de fenotip no clàssic o Mo3, ja que en estudis d'expressió gènica presentaven un perfil més proper al dels monòcits que al de les cèl·lules dendrítiques mieloides (van Leeuwen-Kerkhoff *et al*, 2017). En diferents estudis s'han trobat alteracions en la funció i el nombre dels diferents subtipus de DCs. A més existeixen evidències sobre la naturalesa clonal de les pDCs i mDCs en les SMD. Ma i col·laboradors demostraren que les pDCs i mDCs circulants d'un grup de SMD compartien les alteracions citogenètiques prèviament observades a moll d'os (Ma *et al*, 2004). En alguns estudis s'ha observat una disminució del nombre de pDCs i mDCs a les SMD, especialment a les SMD d'alt risc (Saft *et al*, 2013). També s'han reportat alteracions en la maduració de les DCs, en la distribució d'alguns subtipus, en la secreció de citocines i en la inducció de la proliferació dels limfòcits T (Kerkhoff *et al*, 2013).

Tal i com hem vist fins ara, el desenvolupament de la malaltia obeeix a un procés multifactorial. En la última part de la definició s'incideix en què les SMD presenten un risc inherent d'evolució a la LMA. Les SMD parteixen, com hem esmentat anteriorment, d'una hematopoesi clonal iniciada en una HSC mutada que presenta avantatges competitius sobre el pool de HSC normals. Els pacients amb una SMD que finalment desenvolupen una LMA adquireixen noves mutacions que confereixen capacitat d'autorenovació i una avantatge proliferativa tant en el compartiment més immadur (*stem cell mielodisplàstica*) com en progenitors mieloides més madurs (Woll *et al*, 2014). Malgrat que la hipòtesi d'adquisició seqüencial de noves mutacions és un constructe elegant i senzill per entendre l'evolució de les SMD de baix risc a formes més agressives i finalment a la LMA (Steensma *et al*, 2015), noves dades indiquen que la majoria de les "noves" mutacions detectades en el moment del desenvolupament de la LMA mitjançant tècniques de *next generation sequencing* (NGS) convencionals, amb freqüències al·lèliques (VAF) d'entorn el 2%, ja estaven presents al moment del diagnòstic quan

s'utilitzen tècniques de NGS molt més sensibles (Duncavage *et al*, 2016). Això implicaria que en el moment de l'agudització es produiria una selecció i expansió d'una clona preexistent amb avantatges competitives respecte a la resta de clones existents. D'aquesta manera, podríem inferir que la jerarquia clonal inicial d'aquestes entitats és hipercomplexa i que s'allunya parcialment de la hipòtesi de l'adquisició seqüencial de mutacions. Malgrat això incidirem en aquesta última hipòtesi ja que és, actualment, la més acceptada. Estudis recents basats en la seqüenciació de l'exoma de més de 30.000 persones sense història coneguda d'hemopatia maligna mitjançant NGS amb sensibilitats de detecció de mutacions entorn al 2% demostraren la presència de mutacions somàtiques recurrents en gens associats a patologia mieloide en aproximadament el 10% de les persones de més de 65 anys i en més d'un 20% de les persones majors de 90 anys (Jaiswal *et al*, 2014; Genovese *et al*, 2014; Xie *et al*, 2014). A causa de la predominança d'aquestes mutacions en persones d'edat avançada s'usà el terme d'hematopoesi clonal associada a l'edat per descriure a aquest fenomen (Jaiswal *et al*, 2014; Xie *et al*, 2014). Les persones que presentaven aquesta hematopoesi clonal presentaven un marcat increment de risc per desenvolupar posteriorment una neoplàsia hematològica (aproximadament 11 vegades més risc que la població control que no presentava mutacions en els estudis esmentats). Conseqüentment al risc inherent de desenvolupar hemopaties, que en alguns estudis es situà entorn al 0,5-1% anual, es va endegar el concepte d'hematopoesi clonal de potencial indeterminat (*clonal hematopoiesis of indeterminate potential; CHIP*) (Steensma *et al*, 2015). Malgrat l'important increment de la freqüència relativa en el desenvolupament d'hemopaties que sembla associar-se al fet de presentar hematopoesi clonal, la freqüència absoluta de desenvolupament era molt baixa, de menys d'un 5% amb un seguiment de 5 anys. La majoria de les persones que presentaven mutacions solien presentar una única mutació, tant els que posteriorment acabarien desenvolupant neoplàsies hematològiques com els que no, però aquells que desenvolupaven hemopaties presentaven una càrrega mutacional significativament més elevada (VAF entorn al 25% al moment de la detecció) (Jaiswal *et al*, 2014). Com veurem posteriorment les SMD acostumen a presentar de mitjana 2,6 mutacions al moment del diagnòstic (Bejar, 2017a).

Aquestes dades apunten a què probablement les persones amb CHIP que acaben desenvolupant una SMD presenten una adquisició seqüencial de mutacions que determinen el fenotip final de la malaltia. Ens els estudis esmentats no es donaven dades de si en el moment de desenvolupar la neoplàsia hematològica presentaven una complexitat molecular més elevada que la observada al moment del diagnòstic, però és previsible que així fos. Els gens que es van trobar més freqüentment mutats foren *DNMT3A*, *TET2* i *ASXL1* (Jaiswal *et al*, 2014; Genovese *et al*, 2014). Malgrat que s'ha homogeneïtzat el valor de les diferents mutacions que engloba el concepte de CHIP com possible entitat precursora d'hemopatia, actualment existeixen controvèrsies sobre el valor diferencial de cada una d'aquestes mutacions (Jongen-Lavrencic *et al*, 2018). Per exemple és cridaner que la mutació de *DNMT3A* en persones sanes en els articles esmentats sigui unes 7 vegades superior que les mutacions que segueixen en freqüència d'aparició (*TET2* i *ASXL1*) (Jaiswal *et al*, 2014; Genovese *et al*, 2014). En un article recent es detectaren mutacions, especialment de *DNMT3A*, en el 95% de les infermeres d'un centre sanitari estatunidenc quan s'aplicaren tècniques de NGS amb sensibilitats d'entorn al 0,03% (Young *et al*, 2016). Aquestes noves metodologies d'*error-corrected sequencing* (ECS) permeten augmentar exponencialment la sensibilitat de detecció de mutacions mitjançant l'increment de la profunditat de lectura amb l'ajut de tècniques com el doble marcatge gènic amb fluorocroms (*barcoding*) que permeten reduir el nombre de falsos positius (Young *et al*, 2016, 2015; Wong *et al*, 2015). Aquesta capacitat de detectar mutacions amb tan baixa càrrega mutacional permetrà reconfigurar el coneixement actual sobre la jerarquia clonal de les diferents neoplàsies hematològiques. En alguns estudis recents s'ha postulat que les mutacions de *DNMT3A* apareixerien a la *stem cell* normal com a mecanisme facilitador de l'autorenovació i que inclús apareixerien en situacions fisiològiques després d'insults medul·lars per fomentar la recuperació del teixit hematopoètic (Challen *et al*, 2011; Jongen-Lavrencic *et al*, 2018). Per tot l'exposat, les mutacions de *DNMT3A* podrien tenir un paper "patogènic" molt diferent a la resta de mutacions detectades i que defineixen el concepte de CHIP.

En un apartat posterior revisarem de forma àmplia les mutacions habitualment observades en les SMD. Les tècniques de seqüenciació massiva basades en la

seqüenciació del genoma (*whole genome sequencing; WGS*), de l'exoma (*whole exome sequencing; WES*) o en l'estudi de panells dirigits a un número concret de gens (*panells mieloides*) ens ha permès detectar mutacions en aproximadament el 90% dels pacients amb SMD (Papaemmanuil *et al*, 2013; Haferlach *et al*, 2014; Haider *et al*, 2017; Bejar, 2017a; Bejar *et al*, 2011b, 2011a). Malgrat que el nombre de gens recurrentment mutats implicats en la patogènia de les SMD és molt ampli, aquests es poden agrupar en: mutacions en gens de la maquinària de *splicing* (*SF3B1, SRSF2, U2AF1, ZRSR2, PRPF8, LUC7L2*), mutacions en reguladors epigenètics (*TET2, DNMT3A, IDH1, IDH2, EZH2, ASXL1*), factors de transcripció (*RUNX1, BCOR, CUX1, ETV6, PHF6, GATA2*), cinases transductores de senyals (*NRAS, KRAS, JAK2, CBL, NF1, MPL*), cohesines (*STAG2, SMC3, RAD21*), gens implicats en la reparació de l'ADN (*TP53*) i gens relacionats amb la replicació de l'ADN (*SETBP1*).

Finalment, la desregulació dels mecanismes epigenètics també juga un paper fonamental en la patogènia d'aquestes entitats (Itzykson & Fenaux, 2014). De fet, dels grups de mutacions prèviament esmentats, aquelles relacionades amb els reguladors epigenètics i la maquinària de *splicing* són les més freqüentment observades en les SMD. Mentre que les mutacions dels gens del *splicing* són gairebé sempre mútuament excloents, la presència de varies mutacions en els gens reguladors epigenètics és un fet freqüent. Tot i així, les mutacions dels reguladors epigenètics que afecten a una mateixa via funcional acostumen a ésser també mútuament excloents, com per exemple les mutacions en *TET2* i *IDH1/IDH2* que regulen la via de la hidroximetilació (Figueroa *et al*, 2010). En un apartat posterior revisarem de forma àmplia el coneixement actual sobre els mecanismes epigenètics de la metilació i la hidroximetilació en les SMD incidint especialment en el seu impacte pronòstic.

6.2 Patogènia de la leucèmia mielomonocítica crònica

La patogènia de la LMMC és molt propera a la de les SMD i moltes de les evidències recollides en les SMD són aplicables a la LMMC. De la mateixa manera que succeeix amb les SMD es postula que s'origina en la HSC. En un article recent de Itzykson i col·laboradors es revisa de forma elegant la jerarquia clonal de la LMMC i es donen

evidències sòlides de que s'origina en una *stem cell* CD34+CD38-CD90+ que presenta mutacions iniciadores o *driver* que li confereixen avantatges competitives sobre les *stem cell* no clonals (Itzykson *et al*, 2013b). Sembla que la mutació de *TET2* podria tractar-se d'un esdeveniment iniciador en la LMMC i que determinaria la dominància clonal i l'expansió dels progenitors granulo-monocítics (Itzykson *et al*, 2013b; Itzykson & Solary, 2013). El model proposat es basaria bàsicament en l'adquisició lineal de mutacions, essent especialment freqüent l'adquisició precoç de mutacions en el gen *SRSF2*, que cooperaria amb les mutacions de *TET2* per desenvolupar una dominància clonal esbiaixada afavorint l'expansió dels progenitors granulo-monocítics. En aquest sentit, en altres treballs s'ha demostrat que els ratolins *knock out* pel gen *TET2* desenvolupen una hematopoesi amb una marcada expansió del component granulo-monocític (Li *et al*, 2011). Les co-mutacions de *TET2* i *SRSF2* podrien considerar-se com la *firma gènica* de la LMMC (Cazzola *et al*, 2013; Itzykson *et al*, 2017, 2013a, 2013b). L'adquisició d'altres mutacions en fases més tardanes en gens de la via de *RAS* com per exemple *KRAS*, *NRAS*, *CBL*, *NF1* o *PTPN11* permetria el desenvolupament de fenotips proliferatius de la malaltia basats en la hipersensibilitat al factor estimulant de colònies granulo-monocítiques (GM-CSF) (Itzykson & Solary, 2013). En aquesta línia, les LMMCs amb mutacions de la via de *RAS* no només presentarien una hipersensibilitat al GM-CSF sinó que a més presentarien un creixement autònom de cultius de colònies granulo-monocítiques, tret diferencial de les LMMCs proliferatives amb aquest subtipus de mutacions i que les diferencia de les variants displàstiques i de la resta de SMD (Geissler *et al*, 2016). Finalment, les mutacions d' *ASXL1* que es troben en aproximadament un 40% de les LMMCs tindrien un paper bimodal, fent funcions de mutacions iniciadores afavorint la diferenciació granulo-monocítica inclús en absència de mutacions en *TET2* i d'altra banda podrien afavorir l'evolució a formes més agressives i a la LMA (Itzykson *et al*, 2013b). Com posteriorment revisarem, el diagnòstic de LMMC pot ésser francament complicat ja que múltiples situacions reactives podrien justificar monocitosis persistents i a que les alteracions citogenètiques són infreqüents (entorn a un 25% dels casos) i per tant, pot ser difícil trobar marcadors de clonalitat. En aquest sentit l'estudi específic de mutacions en *TET2* (aproximadament 50% de les LMMC), *SRSF2* (aproximadament

50% de les LMMC) i *ASXL1* (aproximadament 40% de les LMMC) és extraordinàriament rentable, ja que aproximadament el 90% de les LMMC presentaran mutacions en algun d'aquest tres gens (Meggendorfer *et al*, 2014; Itzykson *et al*, 2013a; Elena *et al*, 2016). Si a més ampliem l'estudi a l'anàlisi de les mutacions de la via del *RAS* (*KRAS*, *NRAS*, *CBL*, *NF1*, *PTPN11*) que es troben presents en aproximadament el 30% dels pacients, seríem capaços de detectar mutacions en pràcticament la totalitat de les LMMCs (Meggendorfer *et al*, 2014; Itzykson *et al*, 2013a; Elena *et al*, 2016). En un apartat posterior explicarem àmpliament el valor diagnòstic i pronòstic de les principals mutacions en la LMMC. De la mateixa manera que explicàvem prèviament en descriure la patogènia de les SMD, tant l'apoptosi (Marcondes *et al*, 2008; Invernizzi *et al*, 2006) com la desregulació immune (Peker *et al*, 2015; Hadjadj *et al*, 2014) juguen un paper fonamental per determinar el desenvolupament de la LMMC. Per últim, els mecanismes de regulació epigenètica, especialment la metilació de l'ADN juga un paper fonamental en la gènesi i evolució de la malaltia (Yamazaki *et al*, 2012; Palomo *et al*, 2018; Meldi *et al*, 2015).

7. Manifestacions clíniques

Malgrat que alguns pacients poden estar asimptomàtics i podrien ser diagnosticats d'una SMD o LMMC com a troballa incidental d'una citopènia lleu o d'una monocitosi en un hemograma, la majoria presenten símptomes derivats de les seves citopènies, especialment de l'anèmia que acostuma a ser el motiu de consulta més freqüent. Els pacients que presenten plaquetopènia o neutropènia poden presentar un risc incrementat de sagnat o infecció. Les visceromegàlies són molt infreqüents en les SMD però poden aparèixer amb certa freqüència en les LMMC, especialment en les variants proliferatives que es defineixen per la presència de ≥ 13.000 leucòcits/mm³ i que poden presentar infiltració en altres localitzacions: afectació cutània, hipertròfia gingival, adenopaties, etc. Durant l'evolució de la LMMC, els pacients poden presentar símptomes constitucionals (astènia, febre, pèrdua de pes, sudoració nocturna) (Swerdlow *et al*, 2008, 2017). Ocasionalment les SMD i més rarament les LMMC poden presentar una dermatosi neutrofílica febril aguda o síndrome de *Sweet*, caracteritzada per febre, neutrofília,

lesions eritematoses cutànies doloroses (pàpules, nòduls i plaques) i un infiltrat inflamatori difús constituït fonamentalment per polimorfonuclears neutròfils habitualment localitzats a la dermis superior (Avivi *et al*, 1999).

8. Diagnòstic i classificació de les síndromes mielodisplàstiques i de la leucèmia mielomonocítica crònica

La citologia constitueix la base del diagnòstic de les SMD i de la LMMC. La valoració quantitativa dels signes de displàsia es farà a les extensions de MO tenyides amb una tinció panòptica. A més és necessari valorar una extensió de MO tenyida amb la tinció de Perls per a avaluar els dipòsits de ferro del sistema mononuclear-fagocític i realitzar un recompte percentual de sideroblasts. Les extensions de SP també seran tenyides amb una tinció panòptica, cosa que permetrà realitzar una valoració qualitativa dels signes de displàsia i un recompte percentual de blasts. Segons la classificació de l'OMS es considera que una línia mioide (megacariocítica, eritroide o granulocítica) presenta displàsia significativa quan, a MO, el 10% o més de dels seus elements presenta displàsia. Per a l'avaluació de la displàsia es recomana la valoració de 30 megacariòcits, 200 neutròfils i 200 precursors de sèrie eritroide. Per tal d'establir el percentatge de blasts es recomana realitzar un recompte diferencial en 200 leucòcits a SP i 500 cèl·lules a MO (Jaffe *et al*, 2001; Swerdlow *et al*, 2008, 2017). Tant a la classificació de l'OMS com a diferents publicacions del *International Working Group on Morphology of Myelodysplastic Syndromes* (IWGM-MDS) es descriuen els següents trets displàstics (Mufti *et al*, 2008; Goasguen *et al*, 2014, 2016, 2009, 2018):

- Trets de diseritropoesi: ponts internuclears, irregularitats del contorn nuclear, cariorrexi, multinuclearitat, canvis megaloblàstics, PAS positivitat, vacuolització citoplasmàtica, sideroblasts en anell (sideroblasts amb presència de cinc o més grànuls d'hemosiderina en disposició perinuclear cobrint almenys un terç del contorn nuclear).
- Trets de disgranulopoesi: mida inusualment gran o petita, hipo o desgranulació citoplasmàtica, cossos de *Döhle*, hiposegmentació nuclear (pseudo *Pelger-Huët*), hipersegmentació nuclear, granulació pseudo

Chediak-Higashi, bastons d'Auer, nucli en anell, nucli en mirall, hipercondensació cromatínica tipus *clumping*.

- Trets de dismegacariopoesi: megacariòcits de nucli hipo o monolobulat, binucleats, de nuclis dispersos, micromegacariòcits.

8.1 Diagnòstic i classificació de les síndromes mielodisplàstiques

El criteri diagnòstic mínim necessari per establir un diagnòstic de SMD és la presència d'almenys una citopènia persistent (anèmia, plaquetopènia i/o neutropènia). La presència de displàsia en alguna de les tres sèries mieloides (granulocítica, megacariocítica i/o eritroide) és una troballa quasi ubiqua però no és imprescindible per establir-ne el diagnòstic. De fet, podem arribar-ne al diagnòstic amb la presència d'una citopènia associada a una alteració citogenètica definitiva de SMD (Jaffe *et al*, 2001; Swerdlow *et al*, 2008, 2017). En propers apartats revisarem el valor diagnòstic de la citogenètica en les SMD. Per tant, el diagnòstic de SMD requereix de la presència de citopènia/es persistent/s no justificables per causes secundàries en presència d'almenys displàsia significativa en una o més sèries mieloides i/o increment del percentatge de mieloblasts, i en absència d'aquestes troballes morfològiques, es requereix la presència d'anomalies citogenètiques clonals definitòries de SMD.

Les SMD són un grup de patologies amb presentacions clíniques heterogènies. La presència de displàsia amb o sense citopènies no és una troballa específica d'aquestes entitats i per això és fonamental descartar altres causes secundàries, clonals o no clonals, que puguin justificar-les (Figura 2) (Bejar, 2015). Per això, establir un diagnòstic de certesa de SMD pot ésser francament complicat i requerirà de la integració de dades clíniques (anamnesi dirigida i exploració física completa), de laboratori (hemograma i bioquímica complets fent especial èmfasi en: factors maduratus, nivells de coure, bioquímica fèrrica, funció hepàtica, funció tiroïdal, perfil autoimmunitari, proteïnograma i serologies víriques), dades morfològiques (estudi citològic a sang perifèrica i moll d'os, estudis citoquímics a moll d'os com la tinció de Perls), estudis immunofenotípics, que poden aportar informació de suport en casos de diagnòstic complex, i, per últim, estudis genètics (citogenètica i biologia molecular) (Malcovati *et al*, 2013; Greenberg *et al*, 2017;

Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos, 2012). El diagnòstic integrat així com el seguiment clínic serà especialment important en aquells casos de SMD de baix risc que no presentin un increment en el percentatge de blasts, que no mostrin anomalies citogenètiques i que presentin displàsia granulocítica o eritroide properes al llindar establert de significació sense displàsia megacariocítica, que és la displàsia més reproducible, i que no tinguin sideroblasts en anell a l'estudi del ferro medul·lar. Si a més són pacients pluripatològics, troballa habitual al diagnòstic de les SMD, ja que es diagnostiquen amb una mediana d'edat entorn als 75 anys, amb diferents causes que poden justificar la displàsia i la/es citopènia/es observades, que en ocasions poden ser molt lleus, establir un diagnòstic fefaent pot ésser una tasca quasi impossible.

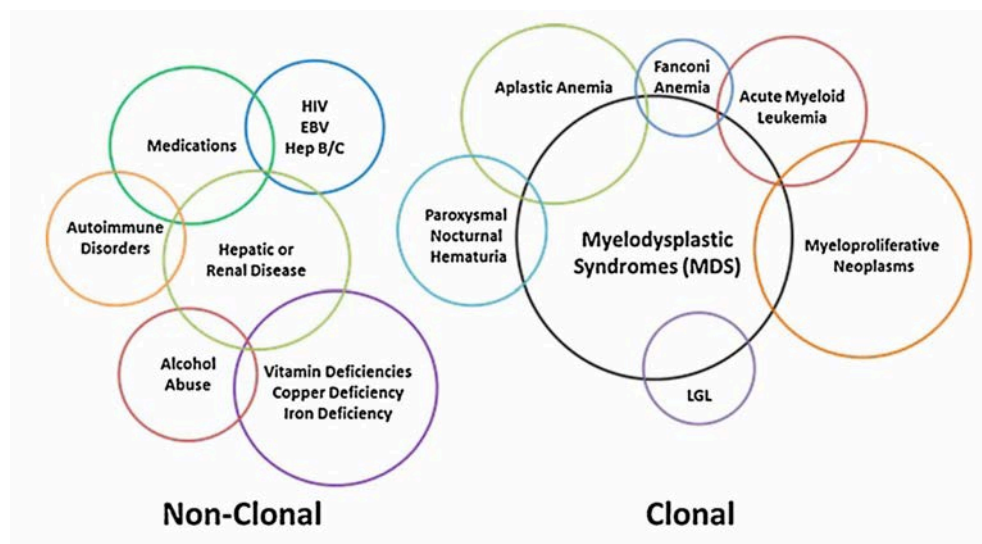


Figura 2. Diagnòstic diferencial entre les SMD i altres causes de citopènies clonals o no clonals amb o sense displàsia. Adaptat de (Bejar, 2015).

Per això, les sèries recollides a la literatura que valoren el pronòstic de les SMD de baix i molt baix risc podrien estar quelcom artefactades per la presència de pacients diagnosticats de SMD quan en realitat no ho són. En un estudi se'ls ha anomenat com a pacients amb un *weak MDS morphological phenotype* (Nomdedeu *et al*, 2017a). En aquest mateix estudi publicat per Nomdedeu i col·laboradors valorant l'impacte pronòstic de la pèrdua del cromosoma Y (-Y), troballa habitual en les SMD i en persones d'edat avançada, varen analitzar si en el grup -Y, el percentatge de pacients amb un *weak MDS morphological phenotype*

era significativament superior en comparació amb el grup de SMD amb cariotip normal, ja que si això fos així es podria inferir que el millor pronòstic que mostren els pacients amb -Y, especialment pel que fa a la reducció del risc transformació a LMA, podria deure's a una possible contaminació per casos que realment no són SMD. La realització d'aquesta anàlisi partia de la hipòtesi que potser alguns casos amb un *weak MDS morphological phenotype* podrien haver rebut amb més facilitat l'etiqueta de SMD pel fet de trobar un cariotip amb una alteració clonal, malgrat que -Y no sigui una alteració definitiva de SMD. L'anàlisi va demostrar que no hi havia un percentatge més elevat de pacients amb aquest fenotip dubtós de SMD en el grup amb -Y i que, per tant, hauríem de proposar hipòtesis alternatives per tal d'explicar el bon pronòstic que aporta aquesta alteració citogenètica (Schanz *et al*, 2012; Nomdedeu *et al*, 2017a). En aquest context, en què establir un diagnòstic de certesa es fa especialment complicat, és on l'estudi de mutacions per NGS aporta una informació realment útil, ja que la majoria de les SMD (fins a un 90% dels casos) presentaran almenys una mutació en algun dels gens habitualment analitzats (Papaemmanuil *et al*, 2013; Haferlach *et al*, 2014; Haider *et al*, 2017; Bejar, 2017a; Bejar *et al*, 2011b, 2011a). En un apartat posterior comentarem àmpliament el valor dels estudis de seqüenciació massiva pel diagnòstic de les SMD.

8.1.1 Criteris mínims pel diagnòstic de les síndromes mielodisplàstiques

Aquests criteris foren definits per consens l'any 2007 després de la reunió d'un comitè d'experts en el diagnòstic i maneig de les SMD format per integrants del *National Comprehensive Cancer Network (NCCN)*, del *International Working group (IWG)* i de la *European Leukemia Net (ELN)*. Es definiren uns prerequisits, uns criteris decisius i uns co-criteris (Valent *et al*, 2007).

- Prerequisits (s'han d'acomplir ambdós supòsits):
 - o Presència d'una o més citopènies persistents durant almenys 6 mesos (hemoglobina < 11g/dL, neutròfils <1.500/mm³ i/o plaquetes <100.000/mm³).
 - o Exclusió d'altres patologies hematològiques o no hematològiques que justifiquin la citopènia i/o displàsia.

- Criteris decisius (almenys 1):
 - o Displàsia en almenys el 10% de les cèl·lules d'una o més de les línies mieloides a moll d'os.
 - o Presència de 5-19% de blasts a moll d'os.
 - o Alteracions cromosòmiques típiques de SMD identificades mitjançant citogenètica convencional o FISH (5q-, -7, +8, 20q-, ...).
- Co-criteris (quan es compleixen els prerequisits però no els criteris decisius):
 - o Fenotip atípic per citometria de flux que orienta a població monoclonal.
 - o Dades moleculars de clonalitat: HUMARA, perfil gènic, mutacions puntuals (*RAS*).
 - o Disminució de la formació de colònies a moll d'os i sang perifèrica.

Quan el pacient presenta una citopènia persistent per no compleix els criteris mínims per establir el diagnòstic de SMD (absència de displàsia significativa i d'anomalies citogenètiques definitòries de SMD) s'anomena citopènia idiopàtica de significat incert (*Idiopathic Cytopenia of Undetermined Significance; ICUS*). Per contra, quan s'observa una displàsia significativa en absència de citopènies persistents s'anomena displàsia idiopàtica de significat incert (*Idiopathic Dysplasia of Undetermined Significance; IDUS*). Aquestes entitats podrien considerar-se com fases precoces d'una SMD (Valent *et al*, 2007; Valent & Horny, 2009; Valent *et al*, 2011; Valent, 2018). Tal i com vàrem comentar a l'apartat de la patogènia de les SMD, l'adveniment de les tècniques de seqüenciació massiva ha permès detectar mutacions en persones sanes, especialment en persones d'edat avançada, el que demostrà que la presència d'hematopoesi clonal associada a l'edat (*age-related clonal hematopoesi*) podria considerar-se com un fenomen predecessor en les neoplàsies mieloides (Jaiswal *et al*, 2014; Genovese *et al*, 2014; Xie *et al*, 2014). La presència d'aquestes mutacions sembla predisposar a un risc indeterminat pel desenvolupament de neoplàsies hematològiques, pel que Steensma i col·laboradors endegaren el concepte d'hematopoesi clonal de potencial indeterminat que coneixem amb l'acrònim CHIP (Steensma *et al*, 2015). Un cop

conegut el concepte d'ICUS i CHIP podem postular que el pas previ al desenvolupament d'una SMD podria ser una ICUS que presenta hematopoesi clonal o CHIP i que, evidentment, no aconsegueix els criteris de l'OMS pel diagnòstic de SMD. A aquesta entitat se la coneix amb el nom de citopènia clonal de significat incert (Clonal Cytopenia of Undetermined Significance; CCUS). Per tant, podríem parlar de tres condicions precoces relacionades amb les SMD (Mufti *et al*, 2018; Valent, 2018; Bejar, 2017b; Steensma *et al*, 2015):

- a) ICUS: citopènies idiopàtiques persistents sense displàsia significativa ni anomalies citogenètiques definitòries de SMD i que no presenten hematopoesi clonal.
- b) CHIP: presència d'hematopoesi clonal en absència de citopènies.
- c) CCUS: citopènies idiopàtiques persistents sense displàsia significativa ni anomalies citogenètiques definitòries de SMD i que presenten hematopoesi clonal (CHIP).

Malgrat que el concepte de IDUS no ha estat revisat de forma detallada a la literatura podríem hipotetitzar sobre l'existència de la displàsia clonal de significat incert (CDUS). Aquesta entitat, malgrat no haver estat descrita a dia d'avui, representaria una passa més avançada en la ontogènia de les SMD que les IDUS. Finalment, Kwok i col·laboradors demostraren que les ICUS amb cert grau de displàsia (sempre menys d'un 10% de les cèl·lules de les diferents sèries mieloides) presentaven una freqüència de mutacions significativament més elevada que la de les ICUS sense displàsia (62% vs. 20%) i que aquesta era molt propera a la del grup de SMD analitzat (71%) (Kwok *et al*, 2015).

8.1.2 Classificació de les síndromes mielodisplàstiques

8.1.2.1 Classificació FAB

L'any 1982 un grup cooperatiu Francès-Americà-Britànic (FAB) va desenvolupar la primera classificació de les SMD (Taula 1) (Bennett *et al*, 1982). Varen definir-se cinc categories basades en: el percentatge de blasts a SP i MO, la presència de bastons d'Auer, la xifra de monòcits a SP i el percentatge de sideroblasts en anell. La classificació FAB va estar vigent durant quasi 20 anys aportant una elevada

utilitat diagnòstica i pronòstica. En aquesta classificació la LMMC era considerada un subtipus de SMD.

Taula 1. Classificació FAB de les SMD.

	Blasts SP (%)	Blasts MO (%)	Monòcits SP ($\times 10^9/L$)	Sideroblasts en anell MO (%)
AR	<1	<5 sense bastons d'Auer	< $1 \times 10^9/L$	<15
ARSA	<1	<5 sense bastons d'Auer	< $1 \times 10^9/L$	≥ 15
AREB	<5	5-19 sense bastons d'Auer	< $1 \times 10^9/L$	Indiferent
AREB-T	>5	20-29 i/o amb bastons d'Auer	< $1 \times 10^9/L$	Indiferent
LMMC MD/MP	<5	0-20	> $1 \times 10^9/L$	Indiferent

Abreviatures. AR: anèmia refractària; ARSA: anèmia refractària amb sideroblasts en anell; AREB: anèmia refractària amb excés de blasts; AREB-T: anèmia refractària amb excés de blasts en transformació; LMMC: leucèmia mielomonocítica crònica; MD: variant mielodisplàstica, $<13 \times 10^9$ leucòcits/L; MP: variant mieloproliferativa, $\geq 13 \times 10^9$ leucòcits/L; SP: sang perifèrica; MO: medul·la òssia.

8.1.2.2 Classificació OMS 2001

L'any 2001, l'OMS elaborà una nova classificació de les SMD amb l'objectiu de millorar el valor diagnòstic i pronòstic de la classificació FAB (Taula 2) (Jaffe *et al*, 2001). Es varen definir 8 categories basades en les variables: nombre de citopènies, percentatge de blasts a SP i MO, presència de bastons d'Auer, percentatge de sideroblasts en anell i la detecció de la deleció aïllada de (5q). Aquesta classificació va tenir una gran acceptació per part de la comunitat científica. Sèries de validació posterior varen fer èmfasi en el valor pronòstic de les categories definides. Així les SMD es podien separar segons l'OMS 2001 en dues categories de risc: SMD de baix risc (AR, ARSA) i SMD d'alt risc (AREB, CRDM i CRDM-SA). Malgrat que la "Síndrome 5q-" ha estat considerada com una SMD de baix risc, a la classificació de l'OMS no es feia un esment específic en aquest sentit.

Els principals canvis respecte a la classificació anterior foren:

- Eliminació del subtipus AREB-T. Aquells casos que amb un percentatge de blasts medul·lars igual o superior al 20% són diagnosticats de LMA.
- Els casos amb les alteracions citogenètiques recurrents t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13.1;q22) o t(16;16)(p13.1;q22), t(15;17)(q22;q12) i reordenaments de 11q23 (gen *MLL*) són diagnosticats de LMA independentment del percentatge medul·lar de blasts.
- Per tal d'establir el diagnòstic d'AR i d'ARSA la displàsia ha d'estar circumscrita a la sèrie eritroide.
- Es defineix la CRDM ja que la presència de displàsia multilínia va demostrar tenir implicacions pronòstiques desfavorables en les SMD sense excés de blasts (Balduini *et al*, 1998; Germing *et al*, 2000; Verburgh *et al*, 2007; Germing *et al*, 2006).
- Es divideix l'AREB en dos grups: AREB-1 i AREB-2.
- La LMMC deixa de formar part de les SMD per passar a formar part de les neoplàsies mielodisplàstiques/mieloproliferatives.
- Es defineix una entitat basada en la detecció d'una anomalia citogenètica concreta: la "síndrome 5q-".
- Mentre que a la FAB la presència de bastons d'Auer era definitiva de l'AREB-T, a l'OMS 2001 és definitiva de l'AREB-2.

Taula 2. Classificació OMS 2001 de les SMD.

	Citopènies	Blasts SP (%)	Blasts MO (%)	Sideroblasts en anell MO (%)	Displàsia
AR	Anèmia	<1	<5	<15	Eritroide
ARSA	Anèmia	0	<5	≥15	Eritroide
CRDM	2 o 3	<1	<5	<15	≥2 línies
CRDM-SA	2 o 3	<1	<5	≥15	≥2 línies
AREB-1	1 o varies	<5	5-9	Indiferent	Indiferent
AREB-2	1 o varies	5-19	10-19	Indiferent	Indiferent
					Bastons d'Auer*
Síndrome 5q-	Anèmia Plaquetes N o ↑	<5	<5	Indiferent	Megacariòcits amb nucli monolobulat
SMD	2 o 3	≤1	<5	Indiferent	1 línia
inclassificable					

*La presència de bastons d'Auer és diagnòstica d'AREB-2.

Abreviatures. AR: anèmia refractària; ARSA: anèmia refractària amb sideroblasts en anello; CRDM: citopènia refractària amb displàsia multilínia; CRDM-SA: citopènia refractària amb displàsia multilínia amb sideroblasts en anell; AREB: anèmia refractària amb excés de blasts; N: normals; SP: sang perifèrica; MO: medul·la òssia.

8.1.2.3 Classificació OMS 2008

L'any 2008 es publicà una nova classificació OMS (Taula 3) (Swerdlow *et al*, 2008) que tal i com passava amb la classificació anterior permetia estratificar els pacients en diferents grups de risc: SMD de baix risc (CRDU i ARSA), SMD de risc intermedi (CRDM i AREB-1) i SMD d'alt risc (AREB-2). Tal i com succeïa amb l'OMS 2001, no es feia un esment específic a l'estratificació de risc de les SMD amb deleció 5q aïllada. L'OMS 2008 introduïa els següents canvis respecte a la de l'OMS 2001:

- Dintre del grup de SMD inclassificable s'engloben els pacients que presenten citopènies persistents sense displàsia significativa però que mostren anomalies citogenètiques definitòries de les SMD (es revisaran en un apartat posterior). En aquest grup també es classifiquen els pacients que presenten displàsia unilínia i pancitopènia, i aquells sense excés de blasts que presenten un 1% de blasts a SP.

- El terme d'anèmia refractària passa a ser un subtipus específic de citopènia refractària amb displàsia unilínia (CRDU). Dintre d'aquesta categoria es troben l'anèmia refractària, la neutropènia refractària i la trombocitopènia refractària. Aquestes categories es defineixen per presentar displàsia unilínia i màxim dues citopènies. Com hem comentat anteriorment, si presentessin pancitopènia serien considerades SMD inclassificables.
- S'elimina la distinció entre la CRDM i la CRDM-SA ja que en l'estudi de Germing i col·laboradors de validació de l'OMS 2001, no observaren diferències significatives de supervivència ni de risc de transformació leucèmica entre les CRDM amb <15% o ≥15% sideroblasts en anell (Germing *et al*, 2006). Tots els casos passen a considerar-se CRDM.
- El concepte de "síndrome 5q-" es reserva per a pacients amb un quadre clínic caracteritzat per la presència d'anèmia macrocítica, una xifra de plaquetes normal o elevada i una hipoplàsia eritroide a nivell medul·lar. A l'OMS 2008 es crea una categoria més genèrica anomenada SMD amb deleció 5q aïllada.
- Es defineix l'entitat provisional de citopènia refractària de la infància. Inclou infants amb citopènies i menys de 2% blasts a SP i menys 5% blasts a MO junt amb evidència de displàsia significativa en alguna de les tres sèries mieloides. Aquells pacients amb 2-<20% blasts a SP i 5-<20% blasts a MO es classificaran seguint els criteris propis de la població adulta.
- La presència d'un 2-<5% blasts a SP determinarà el diagnòstic d'AREB-1, independentment de que el percentatge medul·lar de blasts sigui inferior al 5%.

Taula 3. Classificació OMS 2008 de les SMD.

	Citopènies	Blasts SP (%)	Blasts MO (%)	Sideroblasts en anell MO (%)	Displàsia
CRDU	1 o 2	<1	<5	<15	1 línia
ARSA	Anèmia	0	<5	≥15	Només eritroide
CRDM	Citopènia/es	<1	<5	Indiferent	≥2 línies
AREB-1	Citopènia/es	<5	5-9	Indiferent	Indiferent
AREB-2	Citopènia/es	5-19	10-19	Indiferent	Indiferent Bastons d'Auer*
SMD del(5q)	Anèmia Plaquetes N o ↑	<1	<5	Indiferent	Megacariòcits amb nucli monolobulat
SMD inclassificable	Citopènia/es	≤1%	<5		<10% en ≥1 línia mieloide Alteracions CG

*La presència de bastons d'Auer és diagnòstica d'AREB-2.

Abreviatures. CRDU; citopènia refractària amb displàsia unilínia; ARSA: anèmia refractària amb sideroblasts en anell; CRDM: citopènia refractària amb displàsia multilínia; AREB: anèmia refractària amb excés de blasts; SP: sang perifèrica; MO: medul·la òssia.

Abans de revisar la classificació de l'OMS 2017, revisarem les formes especials de SMD, fent especial èmfasi en les SMD amb expansió de la sèrie eritroide (presència d'almenys un 50% d'eritroblasts a MO) i l'eritroleucèmia que com veurem posteriorment presenten característiques clíniques, biològiques i pronòstiques similars.

8.1.2.3.1 Formes especials de SMD

Malgrat no constituir subgrups individualitzats, tant les SMD hipoplàstiques, com les SMD amb mielofibrosi i les SMD amb increment de la sèrie eritroide presenten característiques distintives que revisarem a continuació.

SMD hipoplàstica: malgrat que la majoria de les SMD es presenten amb un moll normo o hipercel·lular, aproximadament el 10% dels casos mostren hipocel·lularitat en el moment del diagnòstic (Tuzuner *et al*, 1995; Bennett & Orazi, 2009). El diagnòstic diferencial amb l'aplàsia medul·lar (AM) pot ésser complex ja que aquesta pot presentar una marcada displàsia eritroide i en ocasions anomalies

citogenètiques habituals en les SMD. La presència de més d'un 10% de neutròfils hipogranulats a SP, dismegacariopoesi i displàsia granulocítica a MO, la presència de sideroblasts en anell, fibrosi, localització anormal dels precursors mieloides i un percentatge incrementat de blasts suggereixen el diagnòstic de SMD hipoplàstica més que no pas el d'AM (Bennett & Orazi, 2009). D'altra banda, la presència d'una clona d'hemoglobinúria paroxística nocturna (HPN) podria orientar més al diagnòstic d'AM, malgrat que en les SMD de baix risc, especialment en les hipoplàstiques, també es poden detectar clones d'HPN. Per últim un 19-36% dels pacients amb AM presenten les mutacions somàtiques habitualment observades en les SMD. Els gens més freqüentment mutats són *DNMT3A*, *ASXL1* i *BCOR*. Encara que les mutacions detectades no permeten discriminar entre aquestes dues entitats en la majoria de casos, les mutacions de *PIGA*, exclusiva de la AM, i de *BCOR/BCORL1*, molt infreqüent en les SMD, estan sobrerrepresentades en la AM (Yoshizato *et al*, 2015; Kulasekararaj *et al*, 2014).

SMD amb mielofibrosi: aproximadament el 15% de les SMD presenten fibrosi reticulínica significativa (grau ≥ 2). Les SMD amb fibrosi acostumen a ésser formes amb excés de blasts, elevat requeriment transfusional i amb anomalies citogenètiques d'alt risc (Buesche *et al*, 2008; Della Porta *et al*, 2009; Ramos *et al*, 2016).

Tant en les SMD hipoplàstiques, com en les SMD amb fibrosi i les ICUS està indicada la realització d'una biòpsia de moll d'os per tal d'obtenir informació complementària a la de l'aspirat de moll d'os i l'estudi morfològic de SP (Greenberg *et al*, 2017; Malcovati *et al*, 2013; Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos, 2012).

8.1.2.3.1.1 Síndromes mielodisplàstiques amb increment de la sèrie eritroide i eritroleucèmia: controvèrsies sobre el recompte medul·lar de blasts

El comitè d'experts de l'OMS va transmetre una falta de consens sobre quin era el millor mètode per establir el percentatge de blasts en les SMD amb expansió de la sèrie eritroide (SMD-E), és a dir, aquells casos en què com succeeix amb l'eritroleucèmia presenten un $\geq 50\%$ d'eritroblasts a MO. Malgrat que no existia cap evidència sobre si era millor realitzar el recompte en base a la cel·lularitat total o

en base al compartiment cel·lular no eritroide (CNE), com en l'eritroleucèmia, la recomanació final va ser que en les SMD-E el recompte s'havia de realitzar en base a la cel·lularitat total, com a la resta de SMD (Swerdlow *et al*, 2008). Per tant, en tots els casos que presentaven $\geq 50\%$ d'eritroblasts a MO s'havia de realitzar un recompte inicial de blasts basat en la cel·lularitat no eritroide i si el percentatge de blasts de la CNE era $\geq 20\%$ havia d'establir-se el diagnòstic de leucèmia aguda eritroide/mieloide o eritroleucèmia, i si per contra, el percentatge de blasts de la CNE era $< 20\%$ havia d'establir-se el diagnòstic de SMD i basar el recompte de blasts en la cel·lularitat global per tal de designar-ne el subtipus. Aquesta recomanació presentava l'inconvenient que el diagnòstic d'AREB-2, en absència de bastons d'Auer o de més $\geq 5\%$ blasts a SP i $< 10\%$ blasts a MO, no podia ésser establert en les SMD-E, ja que el percentatge medul·lar mínim de blasts per establir-ne el diagnòstic (10%) suposa, en funció del percentatge de sèrie eritroide (almenys un 50%), un mínim d'un 20% de blasts de la CNE i, per tant, obliga a establir el diagnòstic d'eritroleucèmia. Per tant, la categoria de l'OMS de major risc aplicable en les SMD-E és la d'AREB-1. De la mateixa manera no podríem assignar la categoria de SMD d'alt risc segons l'IPSS a aquest subgrup de pacients. Per tot l'anterior, semblava necessari aportar evidència científica per tal de decidir el millor mètode de recompte de blasts en les SMD-E més enllà del consens al que s'arribà i que comportà la recomanació final prèviament exposada. D'altra banda, malgrat que l'eritroleucèmia es va considerar com un subtipus de LMA segons l'OMS 2008, aquesta presentava característiques clínico-patològiques molt properes a les SMD: la displàsia multilínia és freqüent; presenta una elevada freqüència d'alteracions citogenètiques pròpies de les SMD, especialment de cariotips complexes, i mostra un perfil de mutacions gèniques molt més proper al de les SMD que al de les LMA *de novo* (Lessard *et al*, 2005; Park *et al*, 2004; Cuneo *et al*, 1990; Grossmann *et al*, 2013; Bacher *et al*, 2011; Hasserjian *et al*, 2010; Santos *et al*, 2009; Zuo *et al*, 2012; Wang *et al*, 2016). Per tot l'anterior, l'eritroleucèmia representaria el següent esglaó de risc de les AREB-1 amb expansió de la sèrie eritroide. Fan falta estudis comparatius d'aquestes entitats limítrofs per determinar si tal com sembla formen part d'un contínuum clínico-biològic. Això és d'especial importància a l'actualitat, ja que com revisarem al

proper apartat, el comitè d'experts de l'OMS 2017 ha decidit eliminar la regla del comptatge de blasts de la cel·lularitat no eritroide i per tant, l'eritroleucèmia ha desaparegut com a entitat. Les "antigues" eritroleucèmies han passat a classificar-se com subtipus específics de SMD en base al recompte de blasts de la cel·lularitat total (Arber *et al*, 2016; Arber & Hasserjian, 2015; Arber, 2017; Swerdlow *et al*, 2017). La majoria de casos passaran a ésser considerats AREB-2 però alguns pacients amb una marcada expansió medul·lar de la sèrie eritroide podrien passar a ser considerats AREB-1 i inclús SMD sense excés de blasts, cosa que podria provocar una infraestimació del risc d'aquests pacients. Una part dels treballs de l'actual tesi pretén aportar evidència científica sobre la idoneïtat de les recomanacions exposades. A la Taula 4 es resumeixen les característiques morfològiques de les neoplàsies mieloides que cursen amb $\geq 50\%$ d'eritroblasts a moll d'os segons la classificació de l'OMS 2008.

Taula 4. Característiques morfològiques de les neoplàsies mieloides que cursen amb $\geq 50\%$ d'eritroblasts a moll d'os (OMS 2008).

% Eritroblasts MO	Troballes a SP/MO	Altres troballes	Diagnòstic
$\geq 50\%$	SP: ≥ 20 blasts o MO: ≥ 20 blasts de TC	Criteris de LMA amb canvis relacionats amb mielodisplàsia*	LMA amb canvis relacionats amb mielodisplàsia
$\geq 80\%$ precursors eritroides immadurs	Escassos	Escàs component granulocític	Leucèmia eritroide pura
$\geq 50\%$	SP: < 20 blasts MO: < 20 blasts de TC	MO: $\geq 20\%$ blasts de CNE	Eritroleucèmia
$\geq 50\%$	SP: < 20 blasts MO: < 20 blasts de TC	MO: $< 20\%$ blasts de CNE	SMD <i>(utilitzar el percentatge de blasts de la TC per subclassificarlos)</i>

* Criteris de LMA amb canvis relacionats amb mielodisplàsia: història prèvia de SMD o SMD/NMP, o alteracions citogenètiques relacionades amb mielodisplàsia o displàsia multilínia (presència de trets displàstics en $\geq 50\%$ dels elements d'almenys 2 de les 3 sèries mieloides). Tot en absència d'antecedents de tractament quimioteràpic o radioteràpic i en absència d'alteracions citogenètiques recurrents.

Abreviatures. MO: medul·la òssia; SP: sang perifèrica; TC: totalitat cel·lular; LMA: leucèmia mieloide aguda. CNE: cel·lularitat no eritroide.

8.1.2.4 Revisió 2017 de la classificació de l'OMS

La revisió de la quarta edició de l'OMS (Swerdlow *et al*, 2017), tal i com passava amb la classificació anterior, permet estratificar els pacients en tres grups de risc diferents en base a la supervivència global i la incidència d'evolució a LMA: SMD de baix risc (SMD-DU, SMD-SA-DU, SMD amb del(5q) aïllada), SMD de risc intermedi (SMD-DM i SMD-SA-DM) i SMD d'alt risc (SMD-EB). A la revisió de la classificació de l'OMS publicada l'any 2017 (Taula 5) s'han introduït els següents canvis:

- S'elimina el recompte de blasts de la cel·lularitat no eritroide en totes les circumstàncies i desapareix l'eritroleucèmia com a entitat distintiva. Tots els casos prèviament diagnosticats d'eritroleucèmia passen a ser classificats com SMD en base al recompte de blasts de la cel·lularitat total. La majoria de les eritroleucèmies passaran a ser SMD amb excés de blasts. Malgrat no constituir una categoria es fa un esment especial en l'apartat específic de les "SMD amb excés de blasts" a les "SMD amb excés de blasts i predominança eritroide". En aquest subapartat s'esmenta que la significació de la predominança eritroide en aquests casos és incerta i que el percentatge medul·lar d'eritroblasts pot presentar fluctuacions basades en factors exògens com el tractament o les deficiències metabòliques (Wang & Hasserjian, 2012). S'especifica, a més, que les SMD amb excés de blasts i predominança eritroide acostumen a presentar cariotips d'alt risc i mutacions associades a un mal pronòstic com *RUNX1*, *TP53* o *ASXL1* (Grossmann *et al*, 2013; Hasserjian *et al*, 2010).
- Es substitueix el terme "citopènia refractària" pel de "síndrome mielodisplàstica", de tal forma que millora la precisió de la nomenclatura per designar aquells casos en què la línia displàstica no coincideix amb la citopènia observada. Per exemple, una SMD amb displàsia unilínia a nivell de sèrie megacariocítica que presenta una anèmia com a única citopènia.
- Per tal d'establir el diagnòstic de "SMD inclassificable" basat en la troballa d'un 1% de blasts a SP i <5% blasts MO és necessària la confirmació en almenys dos controls consecutius.

- La literatura recent suporta la idea que la presència d'una alteració citogenètica addicional a les síndromes amb deleció aïllada de 5q no confereix un pitjor pronòstic a aquesta entitat, pel que s'inclouen dintre de les "SMD amb deleció 5q aïllada" aquells pacients que presentin una altra alteració citogenètica associada a excepció de la monosomia 7 o deleció 7q (Mallo *et al*, 2011). A la classificació de l'OMS 2008 només es permetia aquest supòsit si la alteració citogenètica addicional era la pèrdua del cromosoma Y.
- Les SMD amb $\geq 15\%$ sideroblasts en anell, amb $< 5\%$ blasts a MO i sense del(5q) es consideren "SMD amb sideroblasts en anell" i es subclassifiquen en "SMD amb sideroblasts en anell i amb displàsia unilínia" i "SMD amb sideroblasts en anell i amb displàsia multilínia". Es important remarcar que les "SMD amb sideroblasts en anell i amb displàsia unilínia" no poden presentar tres citopènies ja que serien reclassificades com "SMD inclassificables". En canvi, les "SMD amb sideroblasts en anell i amb displàsia multilínia" poden presentar pancitopènia. En aquells casos en què es detecti la mutació de *SF3B1*, comptar un $\geq 5\%$ de sideroblasts en anell és suficient per establir-ne el diagnòstic.

Taula 5. Revisió 2017 de la classificació de l'OMS.

	Línies displàstiques	Citopènies	% SA	Blasts SP	Blasts MO	CG
SMD-DU	1	1 o 2	<15 o <5*	<1	<5	Qualsevol [§]
SMD-DM	>1	1-3	<15 o <5*	<1	<5	Qualsevol [§]
SMD-SA:						
- DU	1	1 o 2	≥15 o ≥5*	<1	<5	Qualsevol [§]
- DM	>1	1-3	≥15 o ≥5*	<1	<5	
SMD amb del(5q) aïllada	1-3	1 o 2	Indiferent	<1	<5	del(5q) o del(5q)+1 (excepte -7 o del(7q))
SMD-EB						
- SMD-EB1	0-3	1-3	Indiferent	2-4	5-9	Qualsevol [§]
- SMD-EB2	0-3	1-3	Indiferent	5-19	10-19 o Auer	Qualsevol [§]
SMD inclassificable						
- 1% blasts SP	1-3	1-3	Indiferent	1	<5	Qualsevol [§]
- Pancitopènia + DU	1	3	Indiferent	<1	<5	Qualsevol [§]
- Alt CG sense displàsia	0	1-3	<15 [#]	<1	No Auer	CG de SMD

*Si està present la mutació de *SF3B1*. [§]No criteris SMD del(5q) aïllada. [#]Si ≥15% de SA, es considera displàsia eritroide significativa → SMD amb SA i displàsia unilínia.

Abreviatures. DU: displàsia unilínia; DM: displàsia multilínia; SA: sideroblasts en anell; EB: excés de blasts; SP: sang perifèrica; CG: citogenètica; MO: medul·la òssia.

8.1.3 Paper de la citogenètica en el diagnòstic de les síndromes mielodisplàstiques

La realització d'un estudi citogenètic convencional és imprescindible en l'estudi inicial de les SMD i a part del seu evident valor diagnòstic, és sempre necessari per establir el pronòstic individual i planificar adequadament el tractament. S'han d'avaluar almenys 20 metafases, encara que l'anàlisi d'una xifra inferior es podria considerar informatiu si es detecta una anomalia de caràcter clonal. Hauríem de considerar realitzar una hibridació in situ fluorescent (FISH) i/o *arrays* d'hibridació genòmica comparada (CGH) o de polimorfismes de nucleòtid únic (SNP) en

pacients en què no s'hagin obtingut metafases analitzables o que presentin un cariotip normal amb menys de 20 metafases analitzables. Les sondes de FISH imprescindibles són 5q i 7q. També podrien utilitzar-se les sondes: CEP8, 17p13, 20q i cromosoma Y (Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos, 2012). Cal recordar que la informació de FISH és sempre parcial i que no permet substituir a la de la citogenètica convencional. Per exemple, mai podrem diagnosticar una SMD amb deleció 5q aïllada pel fet de trobar una deleció de 5q per FISH, ja que no podrem saber si el pacient presentava altres anomalies citogenètiques associades. Al voltant d'un 30-50% dels pacients amb SMD *de novo* presenten un cariotip alterat (Vallespí *et al*, 1998; Solé *et al*, 2005; Haase *et al*, 2007; Schanz *et al*, 2011, 2012). Les alteracions més habituals són les que impliquen pèrdues o guanys de material cromosòmic. A diferència del que succeeix amb les LMA, les translocacions són molt infreqüents.

Les alteracions més freqüents són: la deleció d'una part del braç llarg del cromosoma 5 (del(5q)) en aproximadament el 30% de les SMD (en el 5-10% de les SMD apareix de forma aïllada), monosomia total o parcial del cromosoma 7 (-7, del(7q)) en aproximadament el 20% dels casos, trisomia del cromosoma 8 (+8) en aproximadament el 15% dels pacients, pèrdua d'una part del braç llarg del cromosoma 20 (del(20q)) en un 10% de les SMD i pèrdua del cromosoma sexual masculí (-Y) en aproximadament el 6% de les SMD. En aproximadament un 15% dels pacients es detecta un cariotip complex, que es defineix per la presència de 3 o més alteracions cromosòmiques (Solé *et al*, 2005; Haase *et al*, 2007; Schanz *et al*, 2011, 2012).

A la taula 6 s'enumeren les alteracions cromosòmiques recurrents i les seves freqüències d'aparició a les SMD segons la classificació de l'OMS 2017 (Swerdlow *et al*, 2017). Aquestes anomalies són diagnòstiques de SMD en cas de citopènies persistents encara que no presentin trets displàstics concloents, excepte: +8, del(20q) i -Y. Aquestes tres anomalies clonals no són considerades definitòries de SMD ja que també han estat descrites en processos no neoplàsics i en gent sana d'edat avançada (Jaffe *et al*, 2001; Swerdlow *et al*, 2008, 2017).

Algunes d'aquestes alteracions citogenètiques s'han relacionat amb alteracions morfològiques específiques: del(5q) amb megacariòcits monolobulats;

inv(3)(q21;q26.2)/t(3;3)(q21.3;q26.2) amb agregats de micromegacariòcits, i del(17p) amb un marcat predomini de neutròfils hiposegmentats tipus pseudo *Pelger-Huët* i amb neutròfils petits amb vacúols citoplasmàtics (Swerdlow *et al*, 2008, 2017).

Taula 6. Alteracions citogenètiques associades a SMD segons l'OMS 2017.

Alteracions no balancejades		Alteracions balancejades	
Alteració	Freqüència	Alteració	Freqüència
+8	10%*	t(11;16)(q23;p13.3)	-
-7 o del(7q)	10%	t(3;21)(q26.2;q22.1)	-
-5 o 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)/ t(3;3)(q21.3;q26.2)	1%
i(17)(q10) o t(17p)	3-5%	t(6;9)(p23;q34)	1%
-13 o del(13q)	3%		
del(11q)	3%		
del(12p) o t(12p)	3%		
del(9q)	1-2%		
idic(X)(q13)	1-2%		

*La seva presència de forma aïllada no permet establir el diagnòstic de SMD.

8.1.4 Paper de la biologia molecular en el diagnòstic de les síndromes mielodisplàstiques. Tècniques de seqüenciació massiva del genoma

Les tècniques de seqüenciació de l'ADN han permès un gran avenç en el coneixement de la patogènia de les SMD. Les tècniques clàssiques de seqüenciació per *Sanger* (1977), malgrat presentar una elevada fiabilitat presenten grans inconvenients per a ser aplicades a la rutina diària de l'estudi de les SMD. Per una banda permeten analitzar una única mutació per experiment i per altra presenten una baixa sensibilitat de detecció (15-20%) (Sanger & Coulson, 1975; Sanger *et al*, 1977). Amb l'adveniment en els últims anys de les tècniques de seqüenciació massiva o de seqüenciació de nova generació (*Next-Generation Sequencing*; NGS), el coneixement sobre la complexitat molecular d'aquestes entitats ha crescut exponencialment. La NGS aporta grans avantatges sobre les tècniques clàssiques de seqüenciació com una elevada sensibilitat, que oscil·la

entre un 0,03% quan s'usen mètodes de *targeted error-corrected sequencing* (Young *et al*, 2015; Wong *et al*, 2015; Young *et al*, 2016) i un 2% en estudis de NGS convencionals (Jaiswal *et al*, 2014; Bejar, 2017a), i la capacitat de seqüenciar un gran nombre de gens en un mateix experiment, cosa que permet definir perfils moleculars. En aquest sentit, el desenvolupament de la seqüenciació dirigida a un número determinat de gens, sovint designats com panells de gens (panells mieloides) ha permès l'ús de la NGS en l'àmbit clínic i cada vegada més centres del nostre entorn apliquen l'estudi de panells mieloides per NGS com a part de la rutina diagnòstica de les SMD (Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos, 2012). L'aplicació de la NGS per a l'estudi del genoma (WGS) o de l'exoma (WES) ha permès la identificació d'uns 40 gens recurrentment mutats en les SMD (Figura 3). Amb el disseny posterior de panells dirigits a l'estudi d'aquestes mutacions recurrents aconseguim detectar almenys una mutació somàtica en el 90% dels pacients (Papaemmanuil *et al*, 2011, 2013; Walter *et al*, 2011; Delhommeau *et al*, 2009; Bejar *et al*, 2011b; Haferlach *et al*, 2014; Ward *et al*, 2010; Thota *et al*, 2014; Kon *et al*, 2013; Bejar *et al*, 2011a; Bejar, 2017a, 2015; Haider *et al*, 2017).

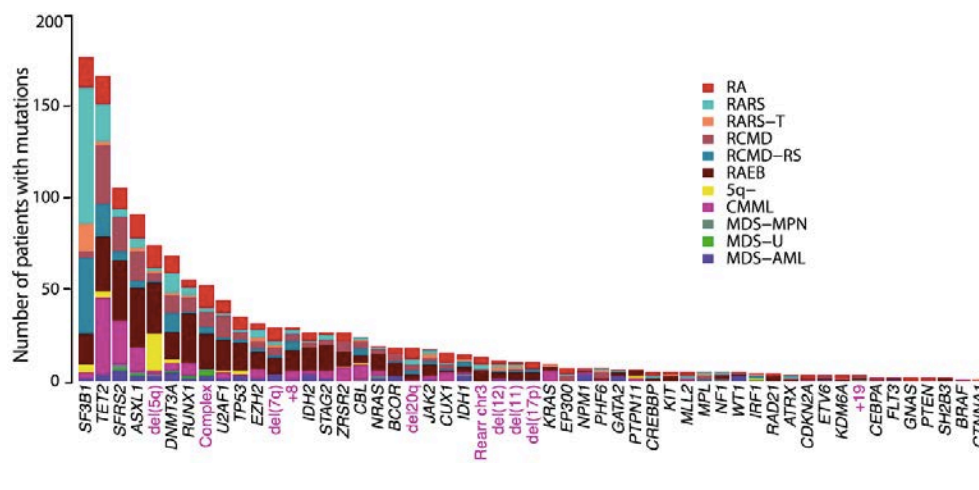


Figura 3. Freqüència de les mutacions somàtiques i principals anomalies citogenètiques en les SMD i distribució d'aquestes per subtipus. S'inclouen la LMMC, altres subtipus de neoplàsies mielodisplàtiques/mieloproliferatives i LMA amb 20-<30% blasts a MO (AREB-T de la FAB). Adaptat de (Papaemmanuil *et al*, 2013).

Tot i així, a diferència del que succeeix amb altres patologies mieloides com les neoplàsies mieloproliferatives en què s'observa una baixa complexitat molecular i les mutacions en tres gens específics (*JAK2*, *CALR*, *MPL*) permeten definir i explicar

el fenotip de la malaltia, les SMD presenten pocs gens amb freqüències mutacionals per sobre del 10% (*SF3B1*, *TET2*, *SRSF2*, *U2AF1*, *ASXL1*, *DNMT3A* i *RUNX1*), les mutacions observades no són específiques de la malaltia i molt poques permeten establir relacions entre el genotip observat i el fenotip de la malaltia (Cazzola *et al*, 2013; Bejar, 2017a; Nikpour *et al*, 2013). En aquest sentit, l'única correlació entre genotip i fenotip ben establerta a les SMD és la mutació de *SF3B1* amb la presència de sideroblasts en anell (Papaemmanuil *et al*, 2011; Malcovati *et al*, 2011a). En aquest sentit, a l'OMS 2017 s'inclou per primera vegada una mutació, *SF3B1*, per establir el diagnòstic de SMD amb sideroblasts en anell al grup de pacients que presentin un percentatge de sideroblasts en anell a MO per sota del 15% (entre 5% i 14%) i que compleixin la resta de criteris propis d'aquesta categoria. A la figura 4 es revisen les principals relacions entre genotip i fenotip de les SMD, neoplàsies mielodisplàstiques/mieloproliferatives i la leucèmia neutrofílica crònica (Cazzola *et al*, 2013). A la figura 5 es detallen les principals associacions entre mutacions, alteracions citogenètiques i subtipus concrets de SMD o de neoplàsies mielodisplàstiques/mieloproliferatives, inclosa la LMMC (Papaemmanuil *et al*, 2013).

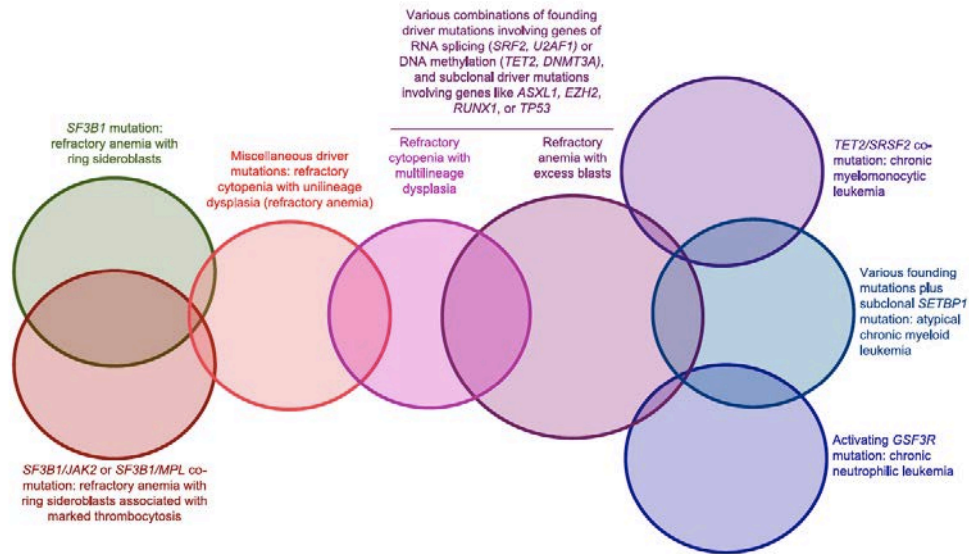


Figura 4. Relacions entre genotip i fenotip en les SMD, LMMC, altres neoplàsies mielodisplàstiques/mieloproliferatives (ARSA amb trombocitosis i leucèmia mieloide crònica atípica) i la leucèmia neutrofílica crònica. Adaptat de (Cazzola *et al*, 2013).

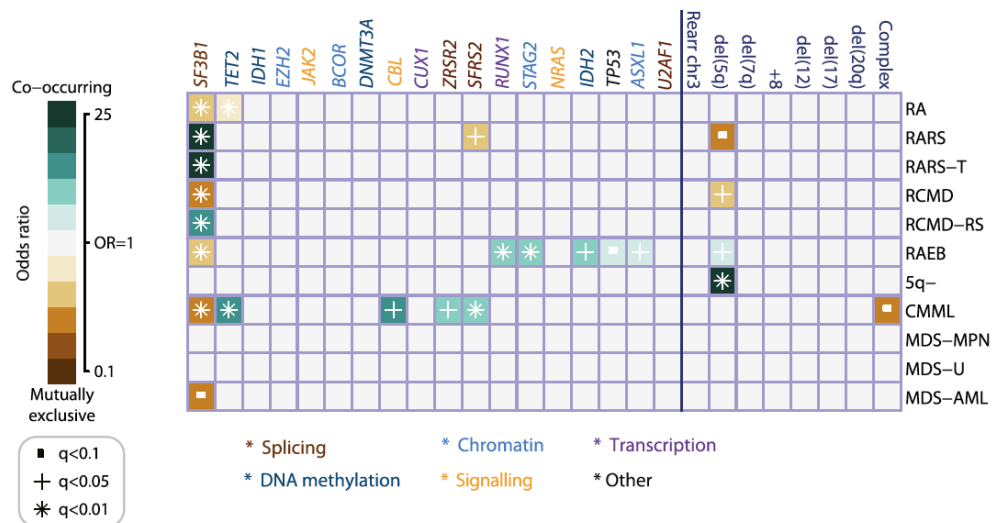


Figura 5. Associacions entre mutacions i alteracions citogenètiques amb subtipus concrets de SMD, LMMC, altres subtipus neoplàsies mielodisplàstiques/mieloproliferatives i LMA amb 20-<30% blasts a MO (AREB-T de la FAB). Adaptat de (Papaemmanuil *et al*, 2013).

Els gens mutats en les SMD es classifiquen segons la funció de la proteïna que codifiquen. Així doncs, s'acostumen a agrupar en: mutacions en gens de la maquinària de *splicing* (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *PRPF8*, *LUC7L2*), mutacions

en reguladors epigenètics (*TET2*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*, *EZH2*, *ASXL1*), factors de transcripció (*RUNX1*, *BCOR*, *CUX1*, *ETV6*, *PHF6*, *GATA2*), cinases transductores de senyals (*NRAS*, *KRAS*, *JAK2*, *CBL*, *NF1*, *MPL*), cohesines (*STAG2*, *CTCF*, *SMC3*, *RAD21*), gens implicats en la reparació de l'ADN (*TP53*) i gens relacionats amb la replicació de l'ADN (*SETBP1*). A continuació detallarem cada un d'aquests grans grups:

- a) **Factors de *Splicing***: es coneix com a mecanisme de *splicing* cel·lular el procés de maduració mitjançant el qual el RNA missatger immadur (pre-ARNm) elimina les regions intròniques i entronca les exòniques per generar un RNA missatger madur (ARNm). En català s'anomena mecanisme de tall i entroncament. Aquest mecanisme està integrat per 6 ribonucleoproteïnes (SnRNP) (U1-U6) i cada SnRNP la conformen aproximadament 10 proteïnes associades a un RNA petit que fa funcions de reconeixement. Mutacions en els components del *splicing* poden ocasionar retencions intròniques totals o parcials, salts exònics únics o múltiples, talls intraexònics o intraintrònics, etc. Aquestes anomalies que afecten la gènesi de l'ARNm poden ocasionar posteriors problemes en el mecanisme de traducció a proteïnes afectant la seva funcionalitat. Aproximadament el 50-60% de les SMD presenta mutacions en algun dels components del *spliceosoma*. Els gens que es trobem mutats amb més freqüència són: *SF3B1* (*splicing factor 3b, subunit 1*; mutat en aproximadament el 20% de les SMD), *SRSF2* (*serine/arginine-rich splicing factor 2*; mutat en aproximadament el 15% de les SMD), *U2AF1* (*U2 small nuclear auxiliary factor 1*; mutat en aproximadament el 10% de les SMD), *ZRSR2* (*zinc finger (CCCH type), RNA binding motif and serine/arginine rich 2*; mutat en aproximadament el 5% de les SMD) i *PRPF8* (*pre-mRNA processing factor 8*; mutat en aproximadament el 3% de les SMD). Generalment són mutacions mútuament excloents, trobada habitual quan s'analitzen mutacions que afecten a una mateixa via funcional. La mutació de *SF3B1* està present en aproximadament el 80% de les SMD amb sideroblasts en anell (Papaemmanuil *et al*, 2011; Malcovati *et al*, 2011a). La mutació de *PRPF8* s'ha associat a les SMD que presenten sideroblasts en anell en absència de la mutació de *SF3B1* (Kurtovic-Kozaric *et al*, 2015).

- b) **Reguladors epigenètics:** podríem dividir aquest grup en tres subgrups: gens encarregats de la metilació de l'ADN (*DNMT3A*), gens encarregats de la hidroximetilació de l'ADN (*TET2*, *IDH1*, *IDH2*) i gens relacionats amb el codi de les histones (*ASXL1* i *EZH2*). *DNMT3A* (*DNA methyltransferase 3 alpha*; mutat en aproximadament el 10% de les SMD) codifica per a una ADN metiltransferasa que s'encarrega de la metilació *de novo* (Ley *et al*, 2010; Walter *et al*, 2011). El mecanisme epigenètic de la metilació consisteix en l'addició d'un grup metil a les citosines situades a les illes CpG, generant 5-metilcitosines (5-mC) (Herman & Baylin, 2003). La metilació de l'ADN és un un mecanisme de silenciament gènic (Herman & Baylin, 2003; Jones & Baylin, 2002). La hidroximetilació consisteix en l'addició d'un grup hidroxil a les 5-mC generant 5-hidroximetilcitosines (5-hmC). El mecanisme està mediat pels gens *TET*, especialment *TET2* (*tet methylcytosine dioxygenase 2*; mutat en aproximadament el 20% de les SMD), i s'ha descrit com un mecanisme fisiològic de demetilació (Tahiliani *et al*, 2009; Zhang *et al*, 2010; Ito *et al*, 2010; Guo *et al*, 2011). *IDH 1/2* (*isocitrate dehydrogenase 1/2*; mutats en aproximadament el 5% de les SMD) catalitza la decarboxilació oxidativa de isocitrat a 2-oxoglutarat, principal cofactor de *TET2* en la reacció d'hidroxilació de les 5-mC (Reitman *et al*, 2011). Les mutacions d'*IDH 1/2* provoquen la conversió de l'isocitrat a l'oncometabolit 2-hidroxiglutarat provocant un bloqueig del mecanisme de la hidroximetilació (Xu *et al*, 2011; Ward *et al*, 2010). Les mutacions de *TET2* i *IDH 1/2* són gairebé sempre mútuament excloents (Figuerola *et al*, 2010).

ASXL1 (*ASXL transcriptional regulator 1*; mutat en aproximadament el 15% de les SMD) i *EZH2* (*enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit*; mutat en aproximadament el 5% de les SMD) són membres de la família de proteïnes del grup *Polycomb* que actuen com a reguladors epigenètics. En concret, *ASXL1* regula la remodelació de la cromatina i *EZH2* és una histona metiltransferasa que catalitza la trimetilació de la lisina 27 a la histona H3 (H3K27me3) provocant la repressió de la transcripció gènica i la remodelació heterocromatínica (Sallman *et al*, 2017; Uni *et al*, 2018; Cabrero *et al*, 2016; Muto *et al*, 2013; Shirahata-Adachi *et al*, 2017).

- c) **Factors de transcripció:** la diferenciació de les cèl·lules hematopoètiques implica l'activació de programes d'expressió gènica específics mitjançant factors de transcripció com *RUNX1* (*runt related transcription factor 1*; mutat en aproximadament el 10% de les SMD), *ETV6* (*ETS variant 6*; mutat en menys del 5% de les SMD) o *BCOR* (*BCL6 corepressor*; mutat en menys del 5% de les SMD) (Bejar *et al*, 2011b; Haferlach *et al*, 2014; Papaemmanuil *et al*, 2013).
- d) **Transducció de senyals o Signalling:** Per a traduir l'activació d'un receptor unit a membrana en una resposta cel·lular, les senyals d'activació han d'arribar al nucli per tal d'activar la síntesi proteica. Això succeeix mitjançant l'activació d'una cascada intracel·lular de reaccions bioquímiques, les anomenades vies de transducció de senyals. Les mutacions d'elements de les vies de transducció generalment provoquen l'activació constitutiva de la via en absència de lligand. Aquest és el mecanisme clàssic d'activació de receptors de factors de creixement amb activitat tirosina-cinasa. En les SMD s'observen mutacions en gens de la via dels *RAS* (*Ras-Raf-MEK-ERK-MAPK*) com *NRAS/KRAS* (*NRAS/KRAS proto-oncogene, GTPase*; mutats en menys del 5% de les SMD), *CBL* (*Cbl proto-oncogene*; mutat en menys del 5% de les SMD) i *NF1* (*neurofibromin 1*; mutat en menys del 5% de les SMD), i en la via de *JAK-STAT* com *JAK2* (*Janus kinase 2*; mutat en aproximadament el 5% de les SMD) i *MPL* (*MPL proto-oncogene thrombopoietin receptor*; mutat en aproximadament el 5% de les SMD) (Papaemmanuil *et al*, 2013; Haferlach *et al*, 2014).
- e) **Cohesines:** les cohesines són un complex de proteïnes encarregades d'establir i mantenir la cohesió entre les cromàtides germanes. Recentment, en les SMD s'han descrit mutacions mútuament excloents en els gens que codifiquen per a aquestes proteïnes com per exemple *STAG2* (*stromal antigen 2*; mutat en menys del 10% de les SMD) i *CTCF* (*CCCTC-binding factor*; mutat en menys del 5% de les SMD) (Kon *et al*, 2013; Thota *et al*, 2014).
- f) **Reparació de l'ADN:** el gen supressor de tumors *TP53* (*tumor protein p53*; mutat en aproximadament el 10% de les SMD) juga un paper cabdal en la

coordinació de la resposta al dany cel·lular, controlant el cicle cel·lular i l'apoptosi. La mutació de *TP53* presenta una elevada associació amb les SMD amb cariotips complexos, aproximadament en el 60% dels casos (Bejar *et al*, 2014b), i amb les SMD amb la deleció (5q) aïllada, en 10-18% dels casos (Jädersten *et al*, 2011; Mallo *et al*, 2013; Mossner *et al*, 2016), i els hi confereix un pronòstic advers (Bejar *et al*, 2014b; Jädersten *et al*, 2011; Mallo *et al*, 2013; Mossner *et al*, 2016). D'altra banda, la mutació es troba en aproximadament el 40% de les SMD secundàries a tractament (Ok *et al*, 2015b, 2015a). Aquesta és una troballa esperable ja que és un grup de pacients que presenta una elevada freqüència de cariotips complexos.

- g) **Replicació de l'ADN:** el gen *SETBP1* (*SET binding protein 1*; mutat en menys del 5% de les SMD) codifica per a una proteïna que s'uneix al oncògen nuclear SET que està involucrat en la replicació de l'ADN (Shou *et al*, 2017).

A la figura 6 s'exposa la distribució de les principals mutacions somàtiques recurrents en les SMD.

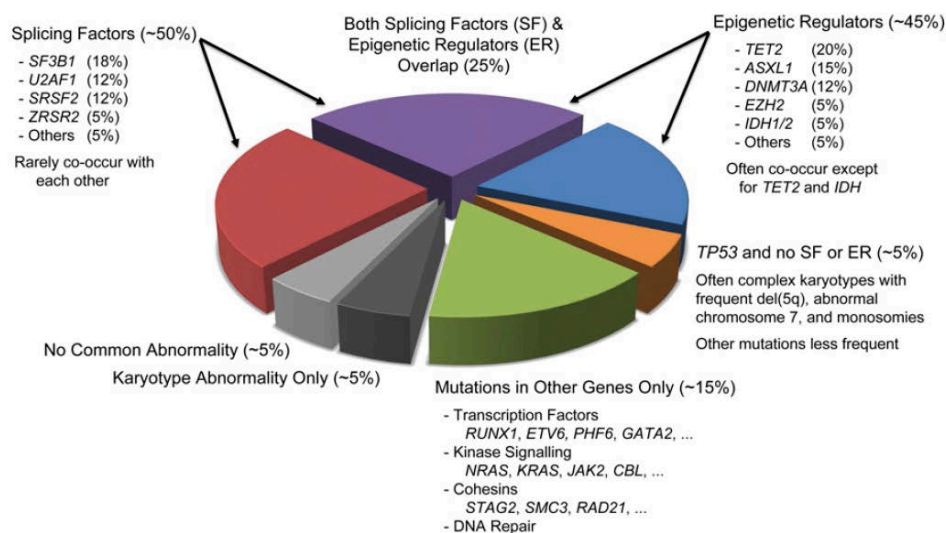


Figura 6. Distribució de les principals mutacions somàtiques recurrents en les SMD. Adaptat de (Bejar & Steensma, 2014).

La informació que aporta la biologia molecular al diagnòstic és de gran utilitat, especialment si s'aplica en un context adequat. Per exemple, davant d'un pacient amb citopènies i displàsia significativa però limítrof; absència de sideroblasts en

anell; sense excés de blasts; amb cariotip normal o -Y, i presència de comorbiditats que puguin justificar parcialment la displàsia i les citopènies observades (hepatopatia crònica, nefropatia crònica, hipotiroïdisme, etc.), la informació molecular pot ser crucial per intentar establir un diagnòstic de certesa. Malgrat això, la presència d'una de les mutacions prèviament descrites, especialment aquelles que es troben molt freqüentment en els casos de persones sanes amb hematopoesi clonal, com *DNMT3A*, *TET2* o *ASXL1* (Jaiswal *et al*, 2014; Genovese *et al*, 2014), ha de ser valorada amb molta cautela en aquesta població de pacients, ja que la mediana d'edat al diagnòstic és molt elevada (entorn a 75 anys). La presència de CHIP (Steensma *et al*, 2015) augmenta exponencialment amb l'edat i per tant la presència d'una única mutació, especialment en els gens esmentats, no hauria d'ésser considerada una troballa definitiva per a establir-ne el diagnòstic. En aquest sentit, a l'estudi de Jaiswal i col·laboradors, la majoria de persones sanes en què es trobaren mutacions presentaven una única mutació i habitualment amb una baixa freqüència al·lèlica (VAF mediana: 9%). De les 17.182 persones estudiades, 746 presentaven mutacions (4,3%). D'aquestes, 693 persones (93%) presentaven una única mutació, 49 persones (6,5%) dues mutacions, 2 persones (0,25%) tres mutacions i 2 persones (0,25%) en presentaven quatre (Jaiswal *et al*, 2014). Aquesta informació pot ser útil per intentar diferenciar una vertadera SMD d'una citopènia secundària associada a CHIP en gent d'edat avançada. La mitjana de mutacions al diagnòstic de les SMD és 2,6 (Bejar, 2017a) i acostumen a presentar un increment progressiu a mesura que incrementen la categoria de risc en base a l'OMS i a l'IPSS (Haferlach *et al*, 2014; Xu *et al*, 2017). D'altra banda, la VAF al diagnòstic també acostuma a ser més elevada (30-50%) (Bejar, 2017a). En aquest context, Malcovati i col·laboradors aplicaren un panell analitzant mutacions en 40 gens a 683 pacients amb citopènies no explicades. El 64% de la població estudiada presentava almenys una mutació somàtica. Els autors van concloure que la presència d'una mutació amb una VAF superior o igual al 10% o la troballa de dues mutacions tenia un valor predictiu positiu del 86% i 88% respectivament pel diagnòstic de neoplàsia mieloide (Malcovati *et al*, 2017).

8.1.5 Paper de la citometria de flux en el diagnòstic de les síndromes mielodisplàstiques

Durant l'última dècada la citometria de flux s'ha anat incorporant progressivament com una prova de rutina a l'estudi inicial de les SMD. Els pacients amb SMD presenten anomalies fenotípiques objectivables a MO a les sèries granulocítica i eritroide. Malgrat que cap anomalia en sí mateixa té un valor patognomònic de SMD, l'estudi conjunt d'una sèrie de paràmetres constitueix una eina de suport molt valuosa pel diagnòstic integrat d'aquestes patologies (Van De Loosdrecht *et al*, 2009; Westers *et al*, 2012; Porwit *et al*, 2014). Tant és així, que ha estat inclosa com a tècnica complementària en les recents classificacions i guies clíniques de diagnòstic i tractament de les SMD (Greenberg *et al*, 2017; Malcovati *et al*, 2013; Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos, 2012). Alguns grups, especialment *The European Leukemia Net (ELN)*, han treballat en l'estandardització de la tècnica focalitzant en la selecció de panells d'anticossos i en les estratègies d'anàlisi. El grup *ELN* va proposar uns requeriments mínims per tal d'assegurar la reproductibilitat de quatre paràmetres: percentatge de mieloblasts CD34+; percentatge de precursors limfoides B CD34+ respecte de la població CD34+; expressió de CD45 en mieloblasts i limfòcits madurs, i el valor de la dispersió lateral (SSC) dels granulòcits madurs (Van De Loosdrecht *et al*, 2009; Westers *et al*, 2012; Porwit *et al*, 2014). En garantir l'anàlisi adequada d'aquests quatre paràmetres podrem aplicar l'*score* diagnòstic més àmpliament validat en les SMD, l'*score* d'*Ogata* que presenta una sensibilitat diagnòstica del 70% (Ogata *et al*, 2009). Una de les limitacions de l'índex és que no valora la sèrie eritroide. Recentment, s'ha desenvolupat un *score* citomètric focalitzat en l'anàlisi de la sèrie eritroide que incorpora els següents paràmetres: anàlisi del coeficient de variació de l'expressió de CD36 i CD71; mitjana d'intensitat de fluorescència de CD71, i percentatge de progenitors eritroides CD117+. L'índex presenta una excel·lent especificitat diagnòstica del 92% per a la discriminació entre SMD i altres citopènies no clonals (Westers *et al*, 2017). Aquest *score* ha estat validat posteriorment en un estudi prospectiu de 106 pacients diagnosticats de SMD (Cremers *et al*, 2017). Malgrat que existeix una llarga llista d'anomalies identificables a les SMD, la manca d'estandardització i el fet de que moltes d'elles no hagin estat integrades en

sistemes de puntuació específics per a la predicció diagnòstica de les SMD fa que no puguem saber la utilitat real que la majoria d'elles podrien aportar al diagnòstic. Tot i així enumerarem les alteracions més freqüentment observades: pèrdua de complexitat de la sèrie neutròfila que inferim en observar una disminució del valor de la dispersió lateral (SSC); increment de les cèl·lules CD34+; asincronismes maduratius (per exemple, expressió dels antígens de sèrie granulocítica CD15, CD11b o CD16 en les cèl·lules CD34+; expressió d'IREM2 a la població monocítica CD14 negativa); alteració del patró maduratiu CD11b/CD13 o CD16/CD13 a la sèrie neutròfila; coexpressió aberrant d'antígens limfoides (CD56, CD2, CD7, CD5) a la població de mieloblasts, de neutròfils (CD4, CD56) i/o monòcits (CD56, CD2); infraexpressió dels antígens monocítics (CD33, CD13, HLA-DR), i absència de precursors limfoide B (Porwit *et al*, 2014).

Per últim, el percentatge de blasts de MO per citometria, malgrat que pot usar-se com una informació complementària (Ogata *et al*, 2004), no ha de substituir al recompte de blasts per citologia (Greenberg *et al*, 2017; Malcovati *et al*, 2013; Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos, 2012). Estudis prospectius en què es comparin els recomptes mitjançant ambdues tècniques en el context de la citometria estandarditzada, per exemple seguint les directrius del grup *Euroflow* (Kalina *et al*, 2012), i que estableixin el valor pronòstic específic de diferents percentatges de blasts establerts per citometria permetran donar un valor sòlid a la citometria en aquest aspecte.

8.2 Diagnòstic i classificació de la leucèmia mielomonocítica crònica

La LMMC és un neoplàsia clonal de la cèl·lula mare hematopoètica amb característiques intermèdies entre les neoplàsies mieloproliferatives i les SMD. Es defineix per la presència d'una monocitosi persistent (monòcits $\geq 1 \times 10^9/L$ i $\geq 10\%$ dels leucòcits durant almenys 3 mesos) en absència dels reordenaments de *BCR-ABL1*, *PDGFRA*, *PDGFRB*, *FGFR1* i *PCM1-JAK2*. Els reordenaments de *PDGFR*, especialment de *PDGFRB*, foren prèviament considerats una característica patogenètica recurrent de la LMMC (LMMC amb t(5;12)(q33;p13); *ETV6-PDGFRB* i eosinofília), però actualment es consideren entitats específiques amb una elevada taxa de resposta a *Imatinib* (Apperley *et al*, 2002; David *et al*, 2007; Cheah *et al*,

2014) i s'agrupen amb d'altres que presenten aquests reordenaments en una categoria específica de la classificació de l'OMS (Swerdlow *et al*, 2008, 2017). Tampoc ha de complir els criteris diagnòstics definitoris propis de les neoplàsies mieloproliferatives cròniques Ph-negatives (policitemia vera, mielofibrosi primària, trombocitemia essencial) ni de la LMA (<20% mieloblasts i/o monoblasts i/o promonòcits a SP i/o BM). Tot i que una neoplàsia mieloproliferativa presenti una monocitosi persistent al diagnòstic o durant la seva evolució clínica, no s'ha d'establir el diagnòstic de LMMC, sinó de neoplàsia mieloproliferativa amb monocitosi. En ocasions, la distinció entre aquestes i la LMMC pot ser difícil, especialment entre una trombocitemia essencial amb monocitosi i mutació de *JAK2* i una LMMC amb trombocitosi i mutació de *JAK2* (present en aproximadament el 8% de les LMMC (Itzykson *et al*, 2013a)). L'estudi de la distribució de les poblacions monocitàries per citometria de flux pot ésser de gran ajuda en aquesta distinció (Patnaik *et al*, 2017). En un apartat posterior revisarem en profunditat el paper de la citometria de flux en el diagnòstic de la LMMC. La presència de monocitosi en la policitemia vera i en la mielofibrosi es dona en aproximadament el 20% i el 15% dels casos respectivament i confereix un mal pronòstic a aquestes entitats (Barraco *et al*, 2017; Elliott *et al*, 2007; Tefferi *et al*, 2017). La displàsia afectant una o més línies mieloides, especialment la granulocítica, és una troballa quasi ubiqua en la LMMC, però la seva absència no invalida el diagnòstic si, com veurem a continuació, es compleixen altres requeriments (Swerdlow *et al*, 2017).

8.2.1 Criteris diagnòstics actuals de la leucèmia mielomonocítica crònica

Els criteris diagnòstics segons la classificació de l'OMS 2017 (Swerdlow *et al*, 2017) són:

- a) Monocitosi persistent a sang perifèrica ($\geq 1 \times 10^9/L$) i que els monòcits representin $\geq 10\%$ dels leucòcits.
- b) No es compleixen els criteris diagnòstics de l'OMS per: la leucèmia mieloide crònica *BCR-ABL1*-positiva, la mielofibrosi primària, la policitemia vera i la trombocitemia essencial.

- c) No s'observen els reordenaments de *PDGFRA*, *PDGFRB*, *FGFR1* ni *PCM1-JAK2* (aquests reordenaments han d'ésser exclosos específicament en els casos d'eosinofília).
- d) Els blasts (mieloblasts + monoblasts + promonòcits) suposen menys del 20% de la cel·lularitat a MO i SP.
- e) Presència de displàsia significativa en una o més sèries mieloides. En absència de displàsia significativa, es pot establir el diagnòstic de LMMC si es compleixen els quatre criteris previs i:
 - a. es documenta la presència d'una alteració citogenètica clonal o una alteració mutacional adquirida a les cèl·lules hematopoètiques, o,
 - b. la monocitosi ha persistit durant ≥ 3 mesos i totes les altres causes de monocitosi (per exemple: neoplàsia, infecció, inflamació) han estat excloses.

Aquests criteris diagnòstics han romàs pràcticament invariables des de la classificació de l'OMS 2001. L'OMS 2017 ha aportat tres petites novetats: s'especifica com a criteri diagnòstic que els monòcits han de representar $\geq 10\%$ dels leucòcits, s'afegeix el reordenament de *PCM1-JAK2* a la llista dels reordenaments gènics relacionats amb eosinofília i la informació mutacional es descriu com una eina útil en la recerca de marcadors de clonalitat.

A la pràctica clínica diària és difícil excloure totes les causes que poden justificar monocitosis secundàries persistents. Algunes de les causes més habituals són: neoplàsies, discràsies de cèl·lules plasmàtiques, embaràs, malalties autoimmunes, esplenectomia, asplènia funcional, sarcoidosi, malaltia inflammatòria intestinal, tractament amb corticoides, tractament amb fàrmacs estimulants de colònies granulocítiques, brucel·losi, tuberculosi, infeccions pel virus varicela-zoster, febre tifoide, sífilis, tripanosomiasi. A més, la relació entre la LMMC i la presència de malalties autoimmunes ha estat àmpliament descrita a la literatura i, per tant, davant d'aquests casos sempre ens hauríem de preguntar si la monocitosi observada és causa (LMMC amb malaltia autoimmune associada) o conseqüència (monocitosi persistent no clonal secundària a la malaltia autoimmune) (Braun & Fenaux, 2013; Hadjadj *et al*, 2014; Grignano *et al*, 2016; Fraison *et al*, 2016; Peker *et al*, 2015; Montoro *et al*, 2018; Elbæk *et al*, 2016). Per tot, establir-ne un

diagnòstic de certesa pot ser francament complicat ja que existeixen múltiples causes que poden justificar una monocitosi i a que la mielodisplàsia, malgrat que és freqüent, no sempre hi és present. La troballa d'un marcador de clonalitat per citogenètica és dona en 20-30% dels casos (Such *et al*, 2011; Tang *et al*, 2014; Wassie *et al*, 2014) i, malgrat que un 85-90% dels casos presenten almenys una mutació en els gens *TET2*, *SRSF2* o *ASXL1* (Meggendorfer *et al*, 2014; Itzykson *et al*, 2013a; Elena *et al*, 2016; Patnaik & Tefferi, 2016), l'aplicació de panells de NGS a la rutina diària no està totalment estesa. A més, les mutacions d'aquests gens són de les més freqüentment observades a la hematopoesi clonal associada a l'edat (Jaiswal *et al*, 2014; Genovese *et al*, 2014; Xie *et al*, 2014). Per tant es requereixen tècniques complementàries per al suport diagnòstic d'aquesta entitat. En aquest sentit és d'especial ajuda l'estudi per citometria de flux de la distribució de les poblacions monocitàries a sang perifèrica (Selimoglu-Buet *et al*, 2015). En un apartat posterior revisarem en profunditat el paper de la citometria de flux i el de la biologia molecular en el diagnòstic de la LMMC.

8.2.2 Classificació de la leucèmia mielomonocítica crònica

Com s'ha esmentat prèviament, la LMMC fou considerada un subtipus específic de SMD a la classificació de la FAB (Bennett *et al*, 1982). Per contra, a les successives classificacions de l'OMS 2001, 2008 i 2017 s'ha classificat dintre de les neoplàsies mielodisplàstiques/mieloprolifratives (Jaffe *et al*, 2001; Swerdlow *et al*, 2008, 2017).

A les classificacions OMS 2001 i 2008 va desaparèixer la distinció específica de la FAB entre variant displàstica (leucòcits $< 13 \times 10^9/L$) i variant proliferativa (leucòcits $\geq 13 \times 10^9/L$) (Jaffe *et al*, 2001; Swerdlow *et al*, 2008), però a l'OMS 2017 es torna a recuperar aquesta subdivisió en base a que presenten diferències clíniques, pronòstiques i moleculars evidents (Such *et al*, 2013; Elena *et al*, 2016; Itzykson *et al*, 2013a; Swerdlow *et al*, 2017). A l'OMS 2017 s'afegeix la LMMC-0 a les categories prèviament descrites, a les classificacions de l'OMS 2001 i 2008, LMMC-1 i LMMC-2. Aquesta divisió es basa en les diferències pronòstiques observades entre els tres subtipus (Schuler *et al*, 2014).

Per tant, la classificació de l'OMS 2017 subclassifica la LMMC en les següents categories:

- a) LMMC-0: <2% blasts a SP i <5% blasts a MO.
- b) LMMC-1: 2-<5% blasts a SP i/o 5-<10% blasts a MO.
- c) LMMC-2: 5-<20% blasts a SP i/o 10-<20% blasts a MO, o bé, presència de bastons d'Auer amb independència del recompte de blasts a SP i MO.
 - Qualsevol dels subtipus anteriors pot ésser subclassificat en LMMC displàstica (leucòcits < $13 \times 10^9/L$) o LMMC proliferativa (leucòcits $\geq 13 \times 10^9/L$).

Recentment, Geyer i col·laboradors varen descriure la leucèmia mielomonocítica crònica oligomonocítica (*Olygomonocytic chronic myelomonocytic leukemia*) per denominar a aquelles SMD que presenten monocitosis relatives (monòcits $\geq 10\%$ dels leucòcits) però que no arriben al llindar de monòcits establert pel diagnòstic de la LMMC (monòcits: $0,5 - < 1 \times 10^9/L$). Les característiques clíniques i el perfil molecular d'aquests casos és molt proper al de la LMMC, observant-se molt freqüentment la firma gènica d'aquesta (co-mutacions de *TET2* i *SRSF2*). A més, un 38% dels pacients va progressar a una LMMC manifesta. Tal i com varen concloure els autors, la leucèmia mielomonocítica crònica oligomonocítica representa una fase precoç de la LMMC displàstica (Geyer *et al*, 2017). Haurem de veure si en futures edicions de l'OMS s'accepta aquesta entitat com un subtipus ben establert de LMMC.

8.2.3 Paper de la citogenètica en el diagnòstic de la leucèmia mielomonocítica crònica

La presència d'anomalies citogenètiques clonals és menys freqüent a la LMMC (20-30% dels casos) que a les SMD (Such *et al*, 2011; Tang *et al*, 2014; Wassie *et al*, 2014). Les alteracions observades no són específiques d'aquesta entitat i poden veure's en altres neoplàsies mieloides, especialment en les SMD. Les anomalies recurrents més freqüents són: trisomia 8 (+8), monosomia 7 (-7) o pèrdua parcial del braç llarg del cromosoma 7 (del(7q)). Als estudis que recullen les sèries més llargues de LMMC amb informació citogenètica de la literatura, que analitzen la informació d'aproximadament 400 pacients cadascun, un 6-7% dels pacients

presenten +8, un 4-6% -Y, un 3-6% presenten un cariotip complex i un 1,5-5,5% anomalies del cromosoma 7 (Such *et al*, 2011; Tang *et al*, 2014; Wassie *et al*, 2014). Altres alteracions clàssiques de les SMD com la del(5q) o del(20q) s'observen amb més baixa freqüència en la LMMC. La del(5q) s'observa en menys de l'1% dels casos (Such *et al*, 2011; Wassie *et al*, 2014) i la del(20q) entorn a un 2% (Such *et al*, 2011; Tang *et al*, 2014; Wassie *et al*, 2014).

8.2.4 Paper de la biologia molecular en el diagnòstic de la leucèmia mielomonocítica crònica

Amb l'adveniment en els últims anys de les tècniques de seqüenciació de nova generació o NGS, el coneixement sobre la patogènia d'aquestes entitats ha crescut exponencialment. Tal i com hem comentat prèviament, l'estudi de panells de gens específics per NGS és d'enorme interès en la LMMC, ja que en moltes ocasions necessitem demostrar un marcador de clonalitat per a establir un diagnòstic de certesa. En situacions, per exemple, en què la citogenètica sigui normal, tal i com passa en el 70-80% dels casos, que els trets de mielodisplàsia siguin lleus i que sigui difícil descartar totes les causes de monocitosi benignes, l'estudi d'un nombre molt reduït de gens pot ser d'una elevada rendibilitat. Meggendorfer i col·laboradors demostraren que més d'un 90% de les LMMC presentaven mutacions en almenys un dels següents nou gens: *TET2*, *SRSF2*, *ASXL1*, *CBL*, *EZH2*, *JAK2*, *KRAS*, *NRAS* i *RUNX1* (Meggendorfer *et al*, 2012). Estudis posteriors confirmaren aquestes troballes i demostraren que acotant l'estudi a *TET2* (mutat en aproximadament el 50% dels casos), *SRSF2* (mutat en aproximadament el 50% dels casos) i *ASXL1* (mutat en aproximadament el 40% dels casos) permet detectar mutacions en el 80-90% dels pacients (Meggendorfer *et al*, 2014; Itzykson *et al*, 2013a; Elena *et al*, 2016; Patnaik & Tefferi, 2016). D'altra banda, l'estudi de les mutacions de la via del *RAS*, especialment *NRAS*, *KRAS* i *CBL* permeten detectar mutacions en un 30% de pacients. Per tant, utilitzant un reduït panell de gens amb les mutacions esmentades (*TET2*, *SRSF2*, *ASXL1*, *CBL*, *KRAS* i *NRAS*) podríem detectar mutacions en la pràctica totalitat dels pacients. Les variants proliferatives de la LMMC presenten molt freqüentment mutacions en gens de la via del *Ras* (*NRAS*, *KRAS*, *CBL*, *PTPN11*, *NF1*) (Elena *et al*, 2016; Itzykson *et al*, 2013a). La presència

d'aquestes mutacions no només suposa un increment de la sensibilitat a l'acció del factor estimulant de colònies granulo-monocítiques, sinó que a més s'ha demostrat que les LMMC amb mutacions en els integrants d'aquesta via presenten un creixement autònom de colònies granulo-monocítiques *in vitro* en absència de factors de creixement exògens (Geissler *et al*, 2016). A les figura 7 es recullen les principals mutacions observades a la LMMC comparant la seva freqüència d'aparició entre les LMMC displàstiques i proliferatives. A la figura 8 es representen les principals vies funcionals afectades a la LMMC. A l'apartat "8.1.4 Paper de la biologia molecular en el diagnòstic de les síndromes mielodislàstiques" de la present tesi, es dona una explicació sobre la funció d'aquestes vies i de les mutacions més representatives de cada una d'elles.

Gene Mutation	CMML (%)	CMML-MD (%)	CMML-MP (%)	P value
<i>TET2</i>	44.4	51.9	32.9	.008
<i>SRSF2</i>	38.8	38.0	40.0	Ns
<i>ASXL1</i>	37.0	32.6	43.5	Ns
<i>NRAS</i>	11.7	4.7	22.4	<.001
<i>KRAS</i>	8.9	10.1	7.1	Ns
<i>SETBP1</i>	8.9	3.9	16.5	.002
<i>CBL</i>	8.4	7.8	9.4	Ns
<i>RUNX1</i>	7.9	6.2	10.6	Ns
<i>JAK2</i>	7.0	3.8	11.8	.05
<i>EZH2</i>	7.0	6.2	8.2	Ns
<i>SF3B1</i>	5.6	8.5	1.2	.03
<i>IDH2</i>	5.6	7.0	3.5	Ns
<i>U2AF1</i>	4.2	4.7	3.5	Ns
<i>ZRSR2</i>	4.2	5.4	2.4	Ns
<i>CUX1</i>	3.7	4.7	2.4	Ns
<i>DNMT3A</i>	3.7	3.1	4.7	Ns
<i>EP300</i>	3.7	2.3	5.9	Ns
<i>ETNK1</i>	3.3	2.3	4.7	Ns
<i>NF1</i>	3.3	2.3	4.8	Ns
<i>KIT</i>	2.3	1.6	3.5	Ns
<i>PTPN11</i>	2.3	1.6	3.5	Ns

Figura 7. Freqüència de les principals mutacions somàtiques recurrents en la LMMC. Comparació de la seva freqüència entre les LMMC displàstiques i proliferatives. Adaptat de (Elena *et al*, 2016).

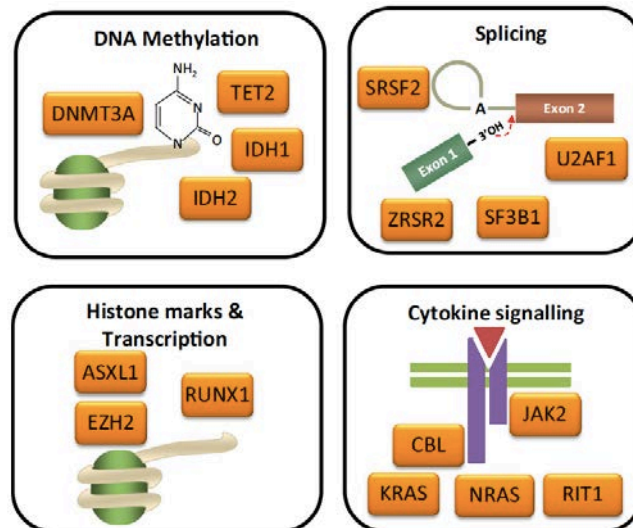


Figura 8. Mutacions i vies funcionals afectades en la LMMC. Adaptat de (Itzykson *et al*, 2017).

8.2.5 Paper de la citometria de flux en el diagnòstic de la leucèmia mielomonocítica crònica

El diagnòstic de la LMMC no inclou criteris immunofenotípics, malgrat això, la citometria de flux s'ha erigit en els últims anys com una eina de suport excel·lent. Existeixen pocs estudis en la literatura que analitzin de forma específica les aberràncies de les LMMC a moll d'os. Xu i col·laboradors publicaren un interessant estudi en què es recullen les principals anomalies fenotípiques que presenten els monòcits de la LMMC a MO: increment del percentatge de monòcits CD14 positius dèbils (la troballa de més d'un 20% d'elements monocítics amb aquesta característica és una troballa molt específica de LMMC); coexpressió de CD56; coexpressió de CD2, i disminució de l'expressió de CD13, CD15 i/o CD36. Els autors demostraren que la coexpressió de CD56 junt amb la infraexpressió d'algun d'aquests antígens era una troballa específica de LMMC (Xu *et al*, 2005). La infraexpressió d'altres antígens habitualment expressats en els monòcits també ha estat àmpliament reportada (CD11c, HLA-DR, CD38, CD33) (Sojitra *et al*, 2013). Recentment, Matarraz i col·laboradors varen descriure les característiques immunofenotípiques pròpies dels diferents estadis de la maduració monocítica a moll d'os (Figura 9). Dintre d'aquests estadis maduratiu sembla d'especial interès la definició del promonòcit immunofenotípic, cèl·lula de difícil identificació

morfològica, malgrat que fonamental per tal d'emetre un diagnòstic adequat amb elevades implicacions pronòstiques. El promonòcit es caracteritza per presentar: negativitat per a antígens d'imaduresa (CD34-, CD117-), positivitat intensa per l'antigen pan-monocitari CD64 (CD64++) i ser CD14+ dèbil o negatiu (Matarraz *et al*, 2017). Tal i com anticipava Xu i col·laboradors al seu estudi, l'increment del percentatge de monòcits CD14 positius dèbils, concepte proper al que actualment considerem un promonòcit, era un reflex de la desviació a l'esquerra de la sèrie monocítica (Xu *et al*, 2005). És fonamental implementar estudis en què s'analitzi l'existència d'una possible correlació entre els promonòcits immunofenotípics i morfològics. A més, és important valorar l'impacte pronòstic del percentatge de promonòcits immunofenotípics respecte de la població monocítica medul·lar, valor amb una probable variabilitat intra i interobservador menor que el percentatge medul·lar de promonòcits establert per morfologia.

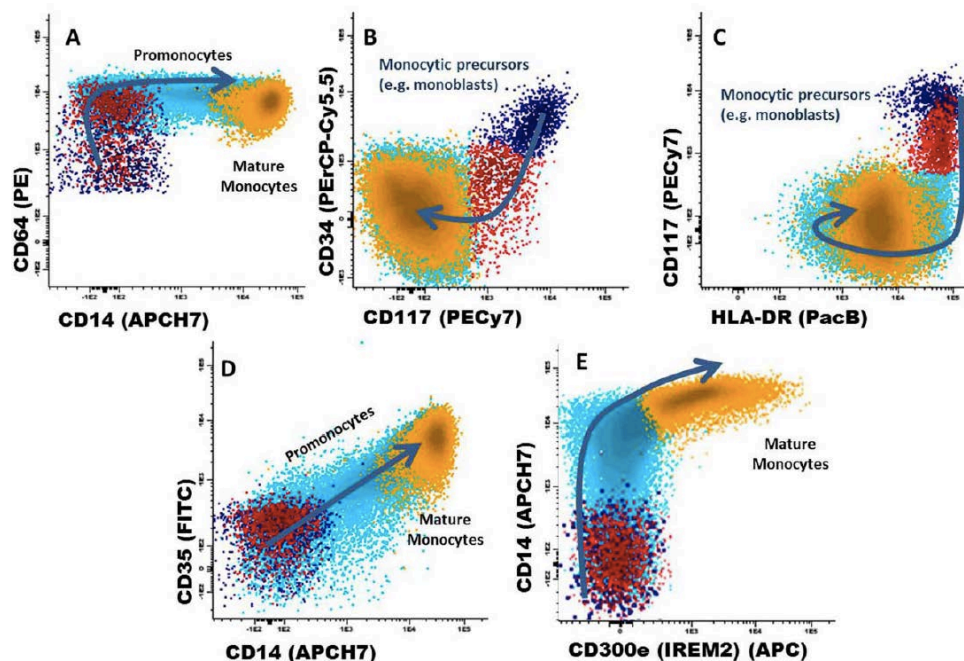


Figura 9. Patró maduratiu immunofenotípic normal dels diferents elements de la sèrie monocítica a moll d'os. Adaptat de (Matarraz *et al*, 2017).

Recentment, Selimoglu-Buet i col·laboradors publicaren un estudi en què demostraren que l'expansió a SP de la població de monòcits de fenotip clàssic és

una troballa molt sensible i específica de la LMMC. S'estudiaren la distribució de les poblacions de monòcits de fenotip clàssic (CD14⁺⁺,CD16⁻), fenotip intermedi (CD14⁺⁺,CD16⁺) i fenotip no clàssic (CD14⁻ o + dèbil, CD16⁺⁺) a SP en una llarga sèrie de pacients amb LMMC, donants sans, monocitosis reactives, SMD i neoplàsies mieloproliferatives. Els autors van concloure que la presència de més d'un 94% de monòcits de fenotip clàssic és una troballa molt sensible (91%) i específica (95%) de la LMMC (Selimoglu-Buet *et al*, 2015). Altres grups posteriors han reproduït aquestes dades (Talati *et al*, 2017). Les característiques de la prova la converteixen en un test amb una elevat valor de *screening* i podria establir-se en un futur com una de les proves inicials bàsiques per l'estudi de qualsevol monocitosi persistent. A la figura 10 es compara la distribució de les poblacions monocitàries d'un donant sa, d'una LMMC i d'una monocitosi reactiva (Itzykson *et al*, 2017). A la figura 11 s'exposa l'algoritme diagnòstic de la LMMC proposat per Solary i col·laboradors en què s'integra la informació de la distribució de les poblacions monocitàries a SP analitzades per citometria de flux (Solary & Itzykson, 2017).

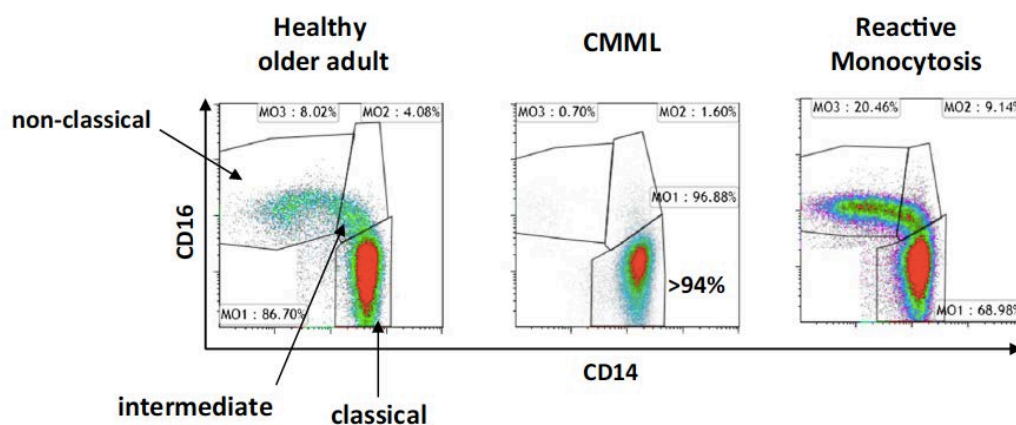


Figura 10. Distribució de les poblacions monocitàries a SP per citometria de flux. La presència de més d'un 94% de monòcits de fenotip clàssic (CD14⁺⁺,CD16⁻) respecte de la població monocítica total és una troballa quasi patognomònica de la LMMC (sensibilitat 91%; especificitat 95%). Adaptat de (Itzykson *et al*, 2017).

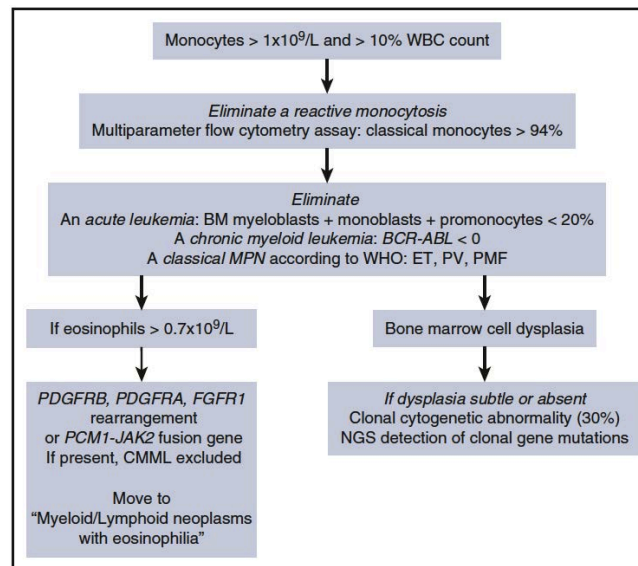


Figura 11. Algorisme diagnòstic de la LMMC en què s'integra l'estudi de la distribució de les poblacions monocitàries per citometria de flux. Adaptat de (Solary & Itzykson, 2017).

9. Valoració pronòstica de les síndromes mielodisplàstiques i de la leucèmia mielomonocítica crònica

9.1 Valoració pronòstica de les síndromes mielodisplàstiques

Les SMD són un grup heterogeni d'entitats amb una història natural molt variable amb supervivències que oscil·len entre escassos mesos i dècades (Greenberg *et al*, 2012). Aquesta variabilitat pronòstica s'explica tant des de la diversitat biològica pròpia de la malaltia recollida per les "variables relacionades amb la malaltia" (citopènies, percentatge de blasts, anomalies citogenètiques, alteracions moleculars, etc.), com des dels factors relacionats amb l'hoste, les anomenades "variables relacionades amb el pacient" (edat, comorbiditats, fragilitat, etc.) (Della Porta *et al*, 2011; Naqvi *et al*, 2011; Ramos *et al*, 2017; Buckstein *et al*, 2016; Abel & Buckstein, 2016; Luskin *et al*, 2017; Efficace *et al*, 2015; Zipperer *et al*, 2014; Falantes *et al*, 2017; Breccia *et al*, 2011; van Spronsen *et al*, 2014; Balleari *et al*, 2015). Malgrat que aquesta divisió en variables relacionades amb la malaltia i amb el pacient és operativa, la realitat és que ambdós tipus de variables s'intriquen de forma indivisible per determinar el pronòstic dels pacients. Estudis recents qüestionen la distinció funcional d'aquests dos tipus de variables. Jaiswal i col·laboradors demostraren que les persones amb CHIP presentaven quasi el doble

de risc de presentar cardiopatia isquèmica que les persones sense CHIP (Jaiswal *et al*, 2017). Aquesta troballa permet hipotetitzar sobre la influència parcial que la complexitat molecular dels pacients pot tenir sobre la presència de les seves comorbiditats i, per tant, permetria catalogar parcialment a les comorbiditats com una “variable relacionada amb la malaltia”. En aquesta línia, Brunner i col·laboradors demostraren que els pacients amb SMD tenen més probabilitat de morir per causes cardiovasculars que la població general ajustada per edat i sexe (Brunner *et al*, 2017). D'altra banda, és evident que les “variables relacionades amb l'hoste” modulen la capacitat predictiva de les “variables relacionades amb la malaltia”. Per exemple, l'impacte pronòstic en la supervivència del mateix grau d'anèmia serà diferent d'un pacient a un altre en funció de les comorbiditats que presenti (cardiopatia, pneumopatia, etc.). Malgrat que totes aquestes observacions qüestionen la vertadera naturalesa de la distinció, les “variables relacionades amb l'hoste” no presenten cap impacte en quant a la predicció de la transformació leucèmica (Naqvi *et al*, 2011; Kantarjian *et al*, 2008; Garcia-Manero *et al*, 2008; Buckstein *et al*, 2016; Falantes *et al*, 2017; Zipperer *et al*, 2014; Breccia *et al*, 2011; Balleari *et al*, 2015; van Spronsen *et al*, 2014), únic *outcome* que es pot relacionar directament amb l'evolució de les SMD, ja que la supervivència pot estar influenciada per múltiples causes no relacionades amb la malaltia en aquesta població de pacients d'edat avançada. Per això no sembla adequat que les “variables relacionades amb el pacient” s'incloguin en índexs pronòstics compostats per “variables relacionades amb la malaltia”, ja que la seva manca d'influència en la progressió a leucèmia fa poc probable que tinguin un gran pes en la mortalitat relacionada específicament amb la malaltia (Nomdedeu *et al*, 2017b).

L'elecció del tractament en les SMD és adaptada al risc i, per tant, és fonamental tenir eines que ens permetin predir adequadament la supervivència i el risc de transformació leucèmica dels pacients. Existeixen diferents índexs pronòstics integrats únicament per “variables relacionades amb la malaltia” com l'IPSS (Greenberg *et al*, 1997), l'IPSS-R (Greenberg *et al*, 2012) o el WPSS (Malcovati *et al*, 2007), i d'altres compostats per “variables relacionades amb el pacient” i amb la malaltia com el MPSS (Kantarjian *et al*, 2008). Aquests últims, que acostumen a incloure l'edat i les comorbiditats dels pacients com a ítems pronòstics, malgrat ser

òptims predictors de la supervivència global poden sobreestimar el risc propi de la malaltia. Per exemple, seria un error avançar pacients de categories de baix risc a alt risc perquè aquests presentin comorbiditats o una edat avançada. Això podria provocar que fossin sotmesos a tractaments agressius de forma innecessària. Des del nostre punt de vista, l'estratificació pronòstica de les SMD hauria de fer-se en dos passos. El primer pas permetria establir de forma acurada el risc propi de la malaltia mitjançant l'ús dels diferents índexs pronòstics composts únicament per "variables relacionades amb la malaltia" com l'IPSS (Greenberg *et al*, 1997), l'IPSS-R (Greenberg *et al*, 2012) o el WPSS (Malcovati *et al*, 2007). En aquest primer pas podríem afegir la informació que aporten nous factors pronòstics relacionats amb l'evolució de la malaltia com, per exemple, la informació molecular (Bejar *et al*, 2011b; Haider *et al*, 2017; Nazha *et al*, 2017). En un segon pas valoraríem l'edat i les comorbiditats del pacient utilitzant alguna de les escales específiques per tal de precisar el tipus de tractament que el pacient pot rebre (Della Porta *et al*, 2011; Zipperer *et al*, 2014). Per exemple, en funció de l'edat, les comorbiditats o la fragilitat, un pacient d'alt risc podria rebre des de tractament de suport a un transplantament al·logènic.

A continuació s'enumeren una sèrie de factors associats a mal pronòstic en el moment del diagnòstic de les SMD:

- Nivells sèrics elevats de LDH (Germing *et al*, 2005; Aul *et al*, 1992) i Beta-2-microglobulina (Gatto *et al*, 2003).
- Nivells sèrics elevats de ferritina (Cazzola *et al*, 2008; Malcovati *et al*, 2007).
- Nombre i intensitat de les citopènies (Greenberg *et al*, 1997; Kao *et al*, 2008; Greenberg *et al*, 2012; Malcovati *et al*, 2011b; Sanz *et al*, 1989; Cordoba *et al*, 2012; Gonzalez-Porras *et al*, 2011).
- Requeriment transfusional (Malcovati *et al*, 2007).
- Categories de l'OMS (Germing *et al*, 2006; Jaffe *et al*, 2001; Swerdlow *et al*, 2008, 2017).
- Percentatge de blasts a MO i SP (Malcovati *et al*, 2007; Duong *et al*, 2018; Bennett *et al*, 1982; Jaffe *et al*, 2001; Swerdlow *et al*, 2008, 2017).

- Edat avançada (Greenberg *et al*, 1997, 2012; Balleari *et al*, 2015).
- Comorbiditats (Naqvi *et al*, 2011; Kantarjian *et al*, 2008; Garcia-Manero *et al*, 2008; Buckstein *et al*, 2016; Falantes *et al*, 2017; Zipperer *et al*, 2014; Breccia *et al*, 2011; Balleari *et al*, 2015; van Spronsen *et al*, 2014).
- Problemes per dormir (*sleep disturbance*) (Luskin *et al*, 2017).
- Fatiga autopercebuda (Efficace *et al*, 2015).
- Fibrosi medul·lar (Buesche *et al*, 2008; Della Porta *et al*, 2009; Ramos *et al*, 2016).
- Alteracions citogenètiques (alteracions del cromosoma 7, cariotip complex) (Knapp *et al*, 1985; Nowell *et al*, 1986; Nowell & Besa, 1989; Billström *et al*, 1988; Pierre *et al*, 1989; Morel *et al*, 1993; Toyama *et al*, 1993; White *et al*, 1992, 1994; Greenberg *et al*, 1997; Solé *et al*, 2005; Haase *et al*, 2007; Schanz *et al*, 2011, 2012; Malcovati *et al*, 2007; Kantarjian *et al*, 2008; Greenberg *et al*, 2012).
- Mutacions específiques (*TP53*, *EZH2*, *RUNX1*, *PRPF8*) (Haider *et al*, 2017; Bejar, 2017a; Bejar *et al*, 2011b, 2014b; Nazha *et al*, 2017; Papaemmanuil *et al*, 2013).
- Nivells elevats de metilació de l'ADN (Poloni *et al*, 2013; Figueroa *et al*, 2009; Jiang *et al*, 2009).
- Nivells incrementats d'expressió del gen del tumor de Wilms (*WT1*) (Cilloni *et al*, 2003; Galimberti *et al*, 2010).
- Disminució de l'expressió del regulador de la granulopoesi *LEF1* (Pellagatti *et al*, 2009, 2013).
- Nivells elevats del factor de necrosi tumoral (TNF)-alfa (Tsimberidou *et al*, 2008).
- Localització anormal dels precursors immadurs (ALIP) a la medul·la òssia (De Wolf-Peeters *et al*, 1986; Mangi *et al*, 1991; Xiong *et al*, 2017).

9.1.1 Valor pronòstic de la morfologia: displàsia multilínia i percentatge de blasts

Les diferents categories de l'OMS, que es basen principalment en el percentatge de blasts a MO i SP, la presència o absència de displàsia multilínia i la presència o

absència de sideroblasts en anell, permeten estratificar els pacients en quant a la supervivència global i al risc de transformació leucèmica (Germing *et al*, 2006; Jaffe *et al*, 2001; Swerdlow *et al*, 2008, 2017). En aquest sentit, com veurem posteriorment, un dels índexs pronòstics amb major acceptació, el WPSS, integra les diferents categories de l'OMS 2001 com a variables pronòstiques (Malcovati *et al*, 2007).

La displàsia multilínia (displàsia en almenys 2 de les tres sèries mieloides) ha demostrat ser un factor pronòstic advers independent en les SMD sense excés de blasts (Germing *et al*, 2006; Dunkley *et al*, 2002).

Establir adequadament el percentatge de blasts a moll d'os és fonamental pel diagnòstic de les SMD i conjuntament amb la citogenètica és el factor pronòstic advers independent amb major pes per a la predicció de la supervivència global i la transformació leucèmica. És una variable que forma part de tots els índexs pronòstics que s'han anat desenvolupant en les SMD. El percentatge de blasts a SP també és un factor pronòstic advers independent (Duong *et al*, 2018) i té un paper fonamental en el diagnòstic de les SMD. A diferència del que succeeix amb el percentatge de blasts a MO no és una variable recollida de forma directa pels índexs pronòstics més habitualment utilitzats. El valor dels blasts a SP queda reflectit de forma indirecta en les categories de l'OMS que recull el WPSS (Malcovati *et al*, 2007).

Per últim, algun treball ha recollit l'impacte pronòstic de troballes morfològiques específiques. Per exemple, Matsuda i col·laboradors publicaren que la presència de disgranulopoesi superior al 10% i de dismegacariopoesi superior al 40% eren factors pronòstics adversos independents per la supervivència global i la transformació leucèmica (Matsuda *et al*, 2007).

9.1.2 Valor pronòstic de la citogenètica

Les alteracions citogenètiques tenen un impacte pronòstic independent en les SMD. Des dels primers estudis, que daten de la dècada dels 80 i 90, les anomalies del cromosoma 7 i la presència d'un cariotip complex, definit per la presència de tres o més anomalies, s'han erigit com a factors adversos independents amb un elevat impacte en la supervivència global i en el risc de transformació leucèmica

(Knapp *et al*, 1985; Nowell *et al*, 1986; Nowell & Besa, 1989; Billström *et al*, 1988; Pierre *et al*, 1989; Morel *et al*, 1993; Toyama *et al*, 1993; White *et al*, 1992, 1994; Greenberg *et al*, 1997; Solé *et al*, 2005; Haase *et al*, 2007; Schanz *et al*, 2011, 2012; Malcovati *et al*, 2007; Kantarjian *et al*, 2008; Greenberg *et al*, 2012). Amb l'estudi successiu de sèries més llargues de pacients s'ha pogut precisar el pronòstic d'un gran nombre específic d'alteracions citogenètiques, alguna de les quals estan molt poc representades (Haase *et al*, 2007; Schanz *et al*, 2011, 2012; Costa *et al*, 2013). Malgrat això, l'impacte pronòstic d'algunes alteracions no ha estat establert de forma individualitzada per la seva baixa incidència. Per exemple, en un estudi recent, Nomdedeu i col·laboradors establiren l'impacte pronòstic de les translocacions com a grup, però l'escàs nombre de pacients no va permetre respondre a qüestions concretes com per exemple, si l'impacte de les alteracions del cromosoma 7 o del cromosoma 5 formant part d'una translocació varia respecte d'aquestes anomalies quan es presenten de forma aïllada (Nomdedeu *et al*, 2016). De la mateixa manera, des de la publicació de l'estudi de Schanz i col·laboradors que va permetre establir les categories citogenètiques de l'IPSS-R, les anomalies del(11q) i -Y es consideren de millor pronòstic que el cariotip normal. El grup de pacients amb -Y presentaren una supervivència significativament més perllongada que el grup amb cariotip normal, però en canvi, el grup amb del(11q) mostrà una tendència a una millor supervivència però sense assolir la significació estadística. Aquest fet s'explica, probablement, perquè només 20 pacients presentaven la del(11q) i es va incórrer en un error tipus II (manca de potència estadística). Els autors van solucionar aquest fet generant una categoria amb 83 pacients que reunia el grup de pacients amb -Y i el grup amb del(11q). L'anàlisi conjunta va permetre demostrar que aquest grup presentava una supervivència significativament més perllongada que el grup de pacients amb cariotip normal (Schanz *et al*, 2012).

A l'IPSS-R, que és l'índex pronòstic amb millor acceptació per a la estratificació pronòstica de les SMD, la citogenètica és la variable que presenta un major pes pronòstic (Greenberg *et al*, 2012).

9.1.3. Valor pronòstic de les mutacions

Malgrat que múltiples mutacions han demostrat presentar una valor pronòstic advers independent i que la mutació de *SF3B1* ha demostrat ser un factor protector (Bejar *et al*, 2011b; Papaemmanuil *et al*, 2013; Haferlach *et al*, 2014), l'addició de la informació molecular als índexs pronòstics tradicionals, basats en variables clíniques, citològiques i citogenètiques, no ha aportat una gran milloria en quant a la capacitat predictiva d'aquests, tant en termes de supervivència com en predicció dels temps a la transformació leucèmica (Papaemmanuil *et al*, 2013; Haferlach *et al*, 2014; Nazha *et al*, 2017; Kennedy & Ebert, 2017; Gerstung *et al*, 2015). Una de les explicacions més plausibles podria ser que la complexitat molecular queda ben recollida per les variables que integren els índexs (citopènies, alteracions citogenètiques i percentatge medul·lar de blasts) (Kennedy & Ebert, 2017). Aquestes variables serien els subrogats tardans de la complexitat molecular dels pacients. És a dir, els pacients amb perfils moleculars d'alt risc, en la majoria de casos presentaran unes característiques clíniques i citogenètiques d'alt risc adequadament recollides pels índexs que utilitzem (alteracions citogenètiques d'alt risc, SMD amb excés blasts, citopènies profundes). Un clar exemple d'això es dona amb la mutació del gen *TP53* que apareix molt freqüentment associada a cariotips complexes (Bejar *et al*, 2014b). Des d'un punt de vista evolutiu podríem considerar les alteracions mutacionals com un primer pas en el desenvolupament del fenotip final de la malaltia; les alteracions citogenètiques com un esdeveniment posterior, i les citopènies, la displàsia i el percentatge de blasts a moll d'os com el fenotip o esdeveniment final de la malaltia que lògicament estarà determinat per la complexitat genètica, essent d'alguna manera, un subrogat final d'aquesta. No obstant, en estudis com el de Bejar i col·laboradors (Bejar *et al*, 2011b), o el de Nazha i col·laboradors (Nazha *et al*, 2017), l'addició de la informació molecular als índexs pronòstics tradicionals (IPSS o IPSS-R) permet reclassificar un important percentatge de pacients catalogats de baix risc a categories d'alt risc. Malgrat això, la nova reclassificació no permet una milloria notable pel que fa a la precisió pronòstica dels índexs originals. A l'estudi de Nazha i col·laboradors l'addició de la informació de les mutacions de *EZH2*, *SF3B1* i *TP53* a l'IPSS i IPSS-R no va permetre observar millores en la capacitat de predicció dels temps a la leucèmia aguda (C-

índex IPSS: 0,7, C-índex IPSS molecular: 0,7; C-índex IPSS-R: 0,72, C-índex IPSS-R molecular: 0,72) i s'observaren millores molt lleus en quant a la predicció de la supervivència global (C-índex IPSS: 0,64, C-índex IPSS molecular: 0,69; C-índex IPSS-R: 0,66, C-índex IPSS-R molecular: 0,7) (Nazha *et al*, 2017). Una possible explicació a aquest fet és que pot ser un error atorgar el mateix impacte a mutacions presents en clones minoritàries que a les que afecten a les clones principals. Per exemple, en futurs estudis es podria intentar ajustar l'impacte de les mutacions a la freqüència al·lèlica amb la que aquestes es detecten. D'altra banda, diferents subtipus de mutacions del mateix gen poden afectar de forma diferent la funció proteica.

De forma genèrica, les principals conclusions que s'extreuen dels principals estudis que avaluen l'impacte pronòstic de les mutacions somàtiques en les SMD són:

- A major nombre de mutacions, pitjor pronòstic presenten els pacients (Figura 12) (Bejar *et al*, 2011b; Papaemmanuil *et al*, 2013; Haider *et al*, 2017).

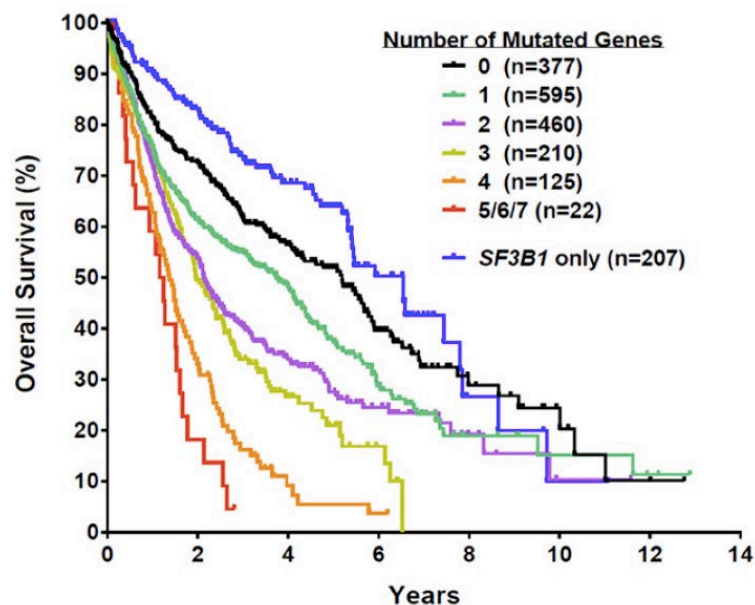


Figura 12. Relació entre la supervivència global i el nombre de mutacions en les SMD. Adaptat de (Haider *et al*, 2017).

- La presència de la mutació de *TP53* s'ha relacionat amb una disminució de la supervivència i a una pitjor resposta al tractament amb

lenalidomida en SMD amb del(5q) (Jädersten *et al*, 2011; Mallo *et al*, 2013; Mossner *et al*, 2016).

- Les mutacions de *TP53* modulen el pronòstic de les SMD amb cariotip complex, conferint-les-hi un pitjor pronòstic (Figura 13) (Bejar *et al*, 2014b).

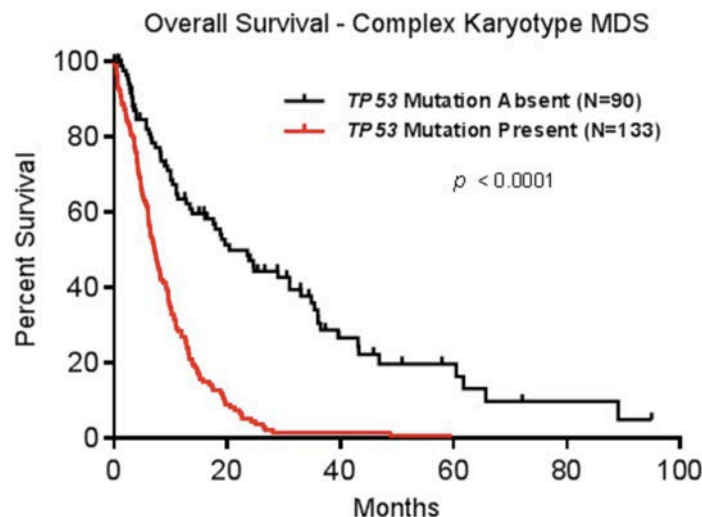


Figura 13. La presència de mutacions de *TP53* confereix un pronòstic advers a les SMD amb cariotip complex. Adaptat de (Bejar *et al*, 2014b).

- Les mutacions de *SF3B1* s'associen a un pronòstic favorable a les SMD sense excés de blasts (Papaemmanuil *et al*, 2011; Malcovati *et al*, 2011a; Papaemmanuil *et al*, 2013; Haferlach *et al*, 2014; Haider *et al*, 2017; Nazha & Bejar, 2017; Nazha *et al*, 2017; Bejar, 2017a). Múltiples mutacions confereixen un pronòstic advers independent de l'IPSS-R, però aquestes presenten un valor pronòstic diferent si s'analitzen en pacients amb o sense excés de blasts (Figura 14a i 14b). Les úniques mutacions que mantenen el seu impacte pronòstic advers independentment de si són analitzades en pacients amb o sense excés de blasts són: *TP53*, *EZH2*, *RUNX1* i *PRPF8* (Bejar, 2017a; Haider *et al*, 2017).

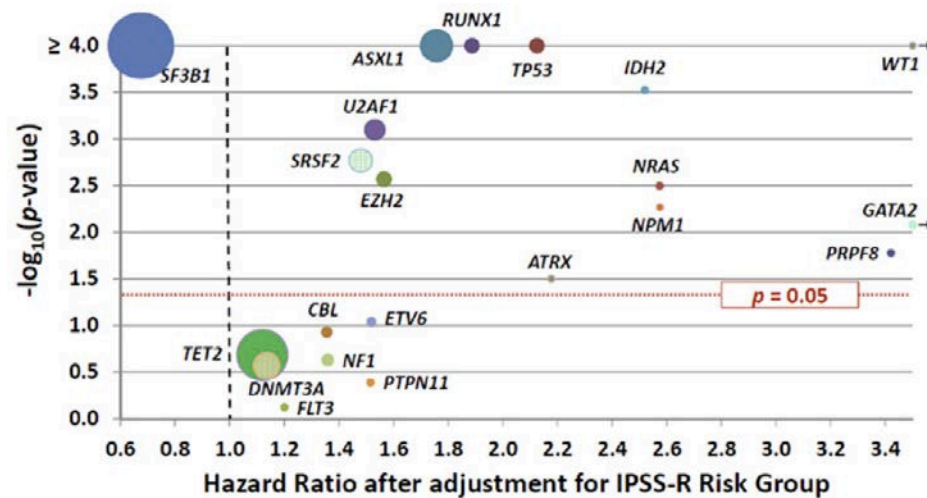


Figura 14a. Freqüència i implicació pronòstica de les principals mutacions somàtiques recurrents en SMD sense excés de blasts. El diàmetre dels cercles es relaciona amb la freqüència de les mutacions en aquesta població. Les mutacions que es situen per sobre de la línia discontinua horitzontal són factors pronòstics independents (ajustats per l'IPSS-R). L'eix de les X indica les Hazard Ratio (HR) per a la mort de les diferents mutacions. El valor de la HR es calcula comparant els pacients que presenten una determinada mutació amb els que no la presenten (regressió de Cox univariada). Només la mutació de *SF3B1* és un factor independent de bon pronòstic ($HR < 1$). Adaptat de (Haider *et al*, 2017).

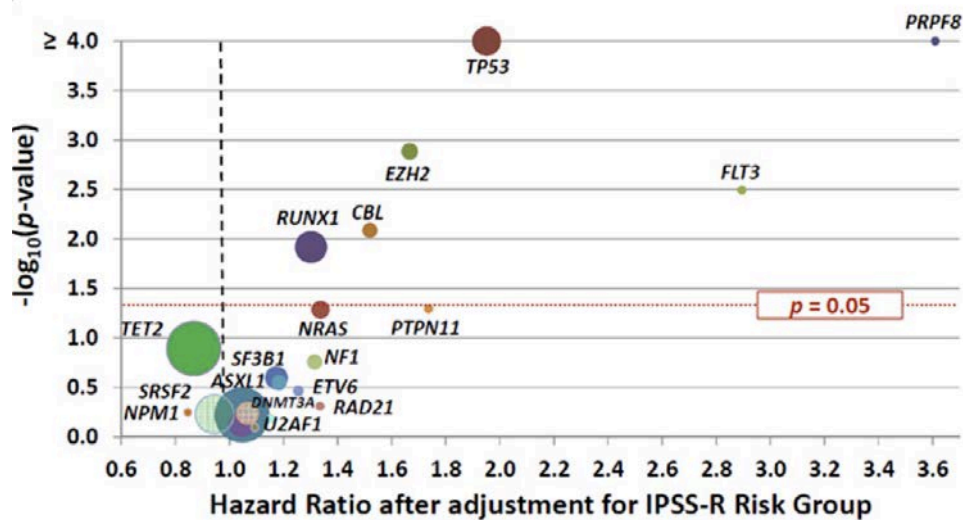


Figura 14b. Freqüència i implicació pronòstica de les principals mutacions somàtiques recurrents en SMD amb excés de blasts i LMA amb 20-<30% blasts. Veure explicació de la Figura 14a. En aquest subgrup de pacients, les mutacions de *SF3B1* són infreqüents i la seva presència no determina un millor pronòstic. Adaptat de (Haider *et al*, 2017).

9.1.4 Valor pronòstic de la metilació de l'ADN

La epigenètica, en el seu sentit més ampli, es refereix a tota la informació que es transmet mitjançant la divisió cel·lular que no està codificada a la seqüència d'ADN. En un sentit més restringit fa referència als mecanismes que regulen la transcripció gènica i que no es troben codificats a la seqüència d'ADN. Els mecanismes epigenètics es poden dividir en tres grans grups: metilació i hidroximetilació de l'ADN; codi d'histones (acetilació, metilació i ubiquitinització d'histones) que regula l'accessibilitat de la cromatina, afectant a la transcripció de grans àrees del genoma, i RNAs no codificants (microRNAs i long non-coding RNAs) que actuen inhibint (microRNAs i lncRNAs) o activant (lncRNAs) l'expressió gènica (Itzykson & Fenaux, 2014). A continuació detallarem els mecanismes de la metilació i hidroximetilació i farem esment al seu impacte pronòstic en les SMD.

El mecanisme epigenètic de la metilació consisteix en l'addició d'un grup metil a les citosines situades a les illes CpG, generant 5-metilcitosines (5-mC) (Herman & Baylin, 2003). Les illes CpG són regions de l'ADN riques en citosines i guanines que

acostumen a situar-se en regions promotores de gens supressors. La metilació aberrant de l'ADN és un esdeveniment comú en el càncer, essent un mecanisme de silenciament gènic (Herman & Baylin, 2003; Jones & Baylin, 2002). La hidroximetilació, un mecanisme epigenètic descrit recentment, consisteix en l'addició d'un grup hidroxil a l'extrem 5' de les 5-mC generant 5-hidroximetilcitosines (5-hmC). El mecanisme està mediat pels gens *TET*, especialment *TET2*, i sembla ésser un mecanisme fisiològic de desmetilació passiva (Tahiliani *et al*, 2009; Zhang *et al*, 2010; Ito *et al*, 2010; Guo *et al*, 2011).

Les DNA metiltransferases (*DNMT*) transmeten els patrons de metilació durant la replicació cel·lular mitjançant el reconeixement actiu de les 5-mC d'una de les dues cadenes d'ADN i promouen l'addició d'un nou grup metil a la nova cadena d'ADN no metilada. Les *DNMT* no poden reconèixer les 5-hmC i els patrons de metilació es perdran de forma passiva amb les successives replicacions cel·lulars (Valinluck & Sowers, 2007). La *DNMT1* sembla jugar un paper en el manteniment de la metilació, mentre que les *DNMT3A* i *DNMT3B* s'encarreguen de la metilació *de novo* (Ley *et al*, 2010; Walter *et al*, 2011). *IDH 1* i *IDH2* formen part de la mateixa via funcional que *TET2* i catalitzen la descarboxilació oxidativa de isocitrat a 2-oxoglutarat (o alfa-cetoglutarat). 2-oxoglutarat serà un dels cofactors de *TET2* en la reacció d'hidroxilació de les 5-mC (Reitman *et al*, 2011). Les mutacions d'*IDH 1/2* generen una proteïna disfuncional que promou la conversió de l'isocitrat a 2-hidroxiglutarat (2-HG). 2-HG provoca un bloqueig en l'activitat de *TET2* actuant com un inhibidor competitiu (Xu *et al*, 2011; Ward *et al*, 2010). Les mutacions de *TET2* i *IDH 1/2* són gairebé sempre mútuament excloents (Figuerola *et al*, 2010). Diversos estudis han demostrat que les mutacions dels integrants d'aquesta via, especialment de *TET2*, provoquen una disminució dels nivells d'hidroximetilació global de l'ADN (Ko *et al*, 2010; Liu *et al*, 2013; Delhommeau *et al*, 2009; Langemeijer *et al*, 2009). La relació entre el pronòstic de les SMD i la metilació de l'ADN ha estat investigat en gens únics (Lin *et al*, 2008; Tien *et al*, 2001; Wu *et al*, 2006; Quesnel *et al*, 1998; Fan *et al*, 2012, 2014; Chaubey *et al*, 2015; Zhang *et al*, 2016; Wu *et al*, 2017; Wang *et al*, 2017) o conjunts de gens (Aggerholm *et al*, 2006; Shen *et al*, 2010; Zhao *et al*, 2014), però existeix molt poca informació respecte a l'impacte pronòstic dels nivells de metilació global de l'ADN (Poloni *et al*, 2013;

Figuroa *et al*, 2009; Jiang *et al*, 2009; Chandra *et al*, 2017) i pràcticament res sobre l'impacte de la hidroximetilació global (Liu *et al*, 2013). Diferents estudis han associat la metilació del gen supressor $p15^{INK4B}$ amb reduccions de la supervivència global en les SMD (Quesnel *et al*, 1998; Tien *et al*, 2001), i la metilació combinada dels promotors dels gens $p15^{INK4B}$, *HIC1*, *CDH1* i *ERa* a l'evolució a estadis avançats de la malaltia (Aggerholm *et al*, 2006). Poloni i col·laboradors trobaren que presentar uns nivells elevats de metilació global de l'ADN, analitzats per immunohistoquímica (anticossos anti-5-mC) a les biòpsies de moll d'os, era un factor pronòstic advers independent (Poloni *et al*, 2013). Liu i col·laboradors observaren que els pacients amb mutacions de *TET2* mostraven una disminució dels nivells globals d'hidroximetilació de l'ADN i que els pacients amb nivells baixos d'hidroximetilació presentaven menors supervivències globals (Liu *et al*, 2013).

Els fàrmacs hipometilants (inhibidors de la DNA metiltransferasa) han estat l'únic tractament capaç d'allargar la supervivència de forma significativa en les SMD d'alt risc (Fenaux *et al*, 2009). Per tant, sembla de cabdal importància valorar l'impacte de la metilació i hidroximetilació globals en l'evolució clínica dels pacients. A més, es requereixen estudis que valorin si els nivells de metilació i, especialment, d'hidroximetilació global poden ser bons predictors de resposta a aquests tractaments. En aquest sentit, Bejar i col·laboradors mostraren que les mutacions de *TET2* amb VAF superiors o iguals al 10%, especialment en absència de mutacions d'*ASXL1*, permeten predir la resposta als fàrmacs hipometilants (Bejar *et al*, 2014a). Malauradament, en aquest article no s'analitzaren els nivells de metilació i hidroximetilació global. Un dels articles que conformen la present tesi valora l'impacte pronòstic de la metilació i de la hidroximetilació global de l'ADN.

Els mètodes basats en la conversió per bisulfit (mètode Sanger, *microarrays* de metilació, NGS) són els més habitualment emprats per a l'estudi de la metilació de l'ADN. Aquests mètodes consisteixen en tractar l'ADN amb bisulfit sòdic que convertirà les citosines no metilades en uracils. L'anàlisi posterior dels productes de PCR permetrà la diferenciació de les 5-mC (amplifiquen com citosines) dels uracils, que amplifiquen com timines (Grønbaek *et al*, 2012). El problema d'aquests mètodes és que no permeten estudiar la hidroximetilació de l'ADN ja que el tractament amb bisulfit no permet diferenciar les 5-mC de les 5-hmC (Huang *et al*,

2010). En un dels articles de la tesi s'utilitzen anticossos anti-5-mC i anti-5-hmC per a estudiar la metilació i la hidroximetilació global de l'ADN.

9.1.5 Índexs pronòstics

9.1.5.1 International Prognostic Scoring System (IPSS)

Des de la seva publicació l'any 1997 ha estat l'índex pronòstic més àmpliament utilitzat (Greenberg *et al*, 1997). L'índex es va generar a partir de l'avaluació de les característiques clínic-biològiques de 816 pacients diagnosticats de SMD *de novo* en base a la classificació de la FAB i tractats amb mesures de suport (*best supportive care*). El model final recull tres variables que presenten un impacte pronòstic advers independent en la supervivència global i en el risc d'evolució a LMA: número de citopènies, percentatge de blasts a MO i cariotip (taula 7). Les citopènies es definiren en funció dels següents punts de tall: hemoglobina < 10g/dL, neutròfils < 1800/microL, plaquetes < 100.000/microL.

Taula 7. Sistema de puntuació de l'IPSS.

Variable Pronòstica	0	0,5	1	1,5	2
Blasts MO (%)	<5	5-10	-	11-20	21-30
Cariotip*	Bo	Intermedi	Dolent	-	-
Nº citopènies	0-1	2-3	-	-	-

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

D'acord a aquestes puntuacions els pacients s'estratifiquen en quatre categories de risc (baix, intermedi-1, intermedi-2 i alt) amb diferències estadísticament significatives en supervivència global i risc d'evolució a LMA:

- Baix: 0 punts. Mediana de supervivència: 5,7 anys
- Intermedi-1: 0,5-1 punts. Mediana de supervivència: 3,5 anys
- Intermedi-2: 1,5-2 punts. Mediana de supervivència: 1,2 anys
- Alt: 2,5-3,5 punts. Mediana de supervivència: 0,4 anys

L'IPSS va ser el primer *score* pronòstic àmpliament acceptat i utilitzat en les SMD. Una de les seves majors fortaleeses és la seva simplicitat d'ús i que va ser creat en base a una sèrie llarga de SMD no tractats, el que ens ha permès obtenir

informació sobre la història natural de la malaltia. Malgrat això presenta unes quantes limitacions:

- Es van excloure les SMD secundàries (*therapy-related* myeloid neoplasms) i les LMMC proliferatives.
- Els talls del percentatge de blasts a MO no s'ajusten exactament als criteris de l'OMS. Per exemple, el tall del 10% (AREB-2 o SMD-EB-2) només suma 0,5 punts. Això és lògic perquè els pacients es varen diagnosticar en base a les categories de la FAB, en què no es diferenciava l'AREB-1 de l'AREB-2, però en la versió revisada de l'IPSS (IPSS-R) tampoc s'ha tingut en compte aquest aspecte. Les SMD-EB-2 amb un 10% de blasts, categoria de pitjor pronòstic segons l'OMS, no reben la major puntuació en la variable "percentatge de blasts a MO", ja que es requereix que els pacients presentin >10% blasts. En aquest mateix sentit, les AREB-T (20-30% blasts), actualment considerades LMAs, es van seguir tenint en compte a l'hora de desenvolupar l'IPSS-R.
- Presenta un probable biaix en la estimació del risc dels pacients, ja que la supervivència s'assigna des del moment en què els pacients arribaren a centres terciaris i no des del diagnòstic.
- No té en compte la severitat de les citopènies, només el número.
- S'atorga un pes excessiu al percentatge de blasts en comparació amb el cariotip (Schanz *et al*, 2011).
- Aproximadament un 30% dels pacients no presentava informació citogenètica.
- El número d'anomalies citogenètiques designades era baix, amb una categoria de risc intermedi que contenia una gran nombre d'alteracions citogenètiques amb un valor pronòstic molt heterogeni.
- Va ser dissenyat i validat per ser aplicat només al moment del diagnòstic.

9.1.5.2 Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R)

Amb l'objectiu de millorar alguna de les debilitats que presentava l'IPSS, l'any 2012 va publicar-se'n una revisió (Greenberg *et al*, 2012). L'IPSS revisat (IPSS-R) es va desenvolupar en base a 7012 SMD *de novo* (Taula 8). L'IPSS-R es basà en les variables que conformaven l'IPSS però aportava una sèrie de canvis: s'estableix de forma individualitzada el pes de cada citopènia; es modifiquen els talls del percentatge de blasts a MO: es divideix la categoria de <5% blasts en $\leq 2\%$ i $>2\text{-}<5\%$ blasts i s'elimina la distinció de $>10\text{-}20\%$ i $>20\text{-}30\%$ blasts, i s'estratifiquen els pacients en cinc categories citogenètiques de risc. Un treball del grup Germano-Austríac de SMD en base a 2351 pacients demostrà que la citogenètica era la variable amb major pes pronòstic en les SMD, malgrat que a l'IPSS el percentatge medul·lar de blasts fou l'ítem a què se li atorgà un major pes (Schanz *et al*, 2011). En base a aquesta observació es proposà la nova classificació citogenètica de l'IPSS-R que categoritza explícitament un gran nombre d'anomalies amb valor pronòstic diferencial (Schanz *et al*, 2012).

Taula 8. Sistema de puntuació de l'IPSS-R.

Variable pronòstica	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Grup de risc CG*	Molt bo	-	Bo	-	Intermedi	Dolent	Molt dolent
% blasts MO	≤ 2		$>2\text{-}<5$		5-10	>10	
Hemoglobina (g/dL)	≥ 10		8-<10	<8			
Plaquetes ($\times 10^9/L$)	≥ 100	50-<100	<50				
Neutròfils ($\times 10^9/L$)	$\geq 0,8$	<0,8					

*Grup de risc citogenètic. Molt bo: -Y, del(11q) com alteracions úniques; Bo: normal, del(5q), del(12p), del (20q) com alteracions úniques o dobles amb del(5q); Intermedi: del(7q), +8, +19, i(17q) com alteracions úniques i qualsevol altre anomalia única o doble independent; Dolent: -7, inv(3)/(3q)/del(3q), dobles amb -7/del(7q), complex amb 3 anomalies; Molt dolent: complex amb més de 3 alteracions.

L'IPSS-R estratifica els pacients en cinc grups de risc amb diferències significatives en supervivència global i risc d'evolució leucèmica: molt baix (0-1,5 punts) amb una mediana de supervivència de 8,8 anys; baix ($>1,5\text{-}3$ punts) amb una mediana de

supervivència de 5,3 anys; intermedi (>3-4,5 punts) amb una mediana de supervivència de 3 anys; alt (>4,5-6 punts) amb una mediana de supervivència de 1,6 anys, i molt alt (>6 punts) amb una mediana de supervivència de 0,8 anys.

L'índex va rebre una àmplia acceptació i actualment és el *score* més utilitzat per a la estratificació pronòstica de les SMD. En estudis posteriors ha estat reconegut com l'índex amb la major precisió pronòstica dels índexs existents (Voso *et al*, 2013) i ha estat validat per ésser aplicat en diferents moments del curs clínic de la malaltia (Lamarque *et al*, 2012; Della Porta *et al*, 2014), en SMD secundàries a tractament (Ok *et al*, 2014; Zeidan *et al*, 2017) i en pacients sotmesos a tractaments modificadors de l'evolució de la malaltia (Voso *et al*, 2013). Tot i així, planteja un important problema clínic, que els autors ja varen reflectir en el moment de la seva publicació: no queda clar si els pacients inclosos a la categoria de risc intermedi havien de ser considerats pacients d'alt o baix risc. Basant-se en què les supervivències medianes d'aquest grup eren més properes a la dels pacients classificats en el grup Intermedi-1 de l'IPSS que a les de l'Intermedi-2 varen aconsellar, amb certa cautela, considerar a aquests pacients de baix risc. Tot i així deixaren una porta oberta a reconsiderar aquesta recomanació. En diversos estudis els pacients inclosos en aquesta categoria de risc han mostrat medianes de supervivència entorn als 30 mesos (Voso *et al*, 2013; Della Porta *et al*, 2015), que és el tall que el GESMD va establir per a que un pacient sigui considerat d'alt risc (Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos, 2012). Per tal d'intentar resoldre aquest dilema, s'ha recomanat considerar els pacients classificats en el grup intermedi de baix risc si puntuen $\leq 3,5$ a l'IPSS-R i d'alt risc si puntuen $>3,5$ (Pfeilstöcker *et al*, 2016). En un dels treballs de l'actual tesi es proposa enumerar els blasts medul·lars de la cel·lularitat no eritroide com a estratègia de millora de l'avaluació pronòstica d'aquest grup de pacients.

9.1.5.3 WHO classification-based prognostic scoring system (WPSS)

El WPSS (Taula 9) té en compte tres variables pronòstiques: les categories citogenètiques proposades per l'IPSS, les categories diagnòstiques de l'OMS 2001 i el requeriment transfusional (Malcovati *et al*, 2007). L'impacte de la dependència transfusional va ser prèviament demostrada pels autors que desenvoluparen

l'índex (Malcovati *et al*, 2005; Malcovati, 2007). Aquest ítem va ésser substituït en una revisió posterior pel grau d'anèmia (Malcovati *et al*, 2011b; Della Porta *et al*, 2015). És un *score* dinàmic, permetent la seva aplicació en diferents moments de l'evolució de la malaltia. Presenta, com a limitació principal, la subjectivitat implícita en la classificació de l'OMS en quant a la diferenciació fidedigna de les entitats amb displàsia unilínia o multilínia. D'altra banda, no permet l'abordatge pronòstic ni de les SMD inclassificables ni de la LMMC.

Tabla 9. Sistema de puntuació del WPSS.

Variable Pronòstica	0	1	2	3
<i>Classificació OMS 2001</i>	AR, ARSA, Síndrome 5q-	CRDM, CRDM-SA	AREB-1	AREB-2
<i>Cariotip*</i>	Bo	Intermedi	Dolent	-
<i>Requeriment transfusional**</i>	No	Sí	-	-

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

** *Requeriment transfusional*: com a mínim una transfusió cada 8 setmanes en un període de 4 mesos.

El WPSS estratifica els pacients en cinc grups de risc amb diferències significatives en supervivència global i risc d'evolució leucèmica: molt baix (0 punts) amb una mediana de supervivència de 103 mesos; baix (1 punt) amb una mediana de supervivència de 72 mesos; intermedi (2 punts) amb una mediana de supervivència de 40 mesos; alt (3-4 punts) amb una mediana de supervivència de 21 mesos, i molt alt (5-6 punts) amb una mediana de supervivència de 12 mesos.

9.1.5.4 MD Anderson Global Prognostic Scoring System (MPSS) i Low-Risk Prognostic Scoring System (LR-PSS)

L'any 2008 Kantarjian i col·laboradors publicaren el MPSS, basat en 1915 pacients (Kantarjian *et al*, 2008). La gran diferència respecte dels índexs prèviament exposats és que incloïa SMD secundàries a tractament, LMMC proliferatives, pacients tractats i neoplàsies mielodisplàstiques/mieloproliferatives. A més integrava dues variables depenents de l'hoste, l'ECOG i l'edat. Establia quatre categories de risc (baix, intermedi-1, intermedi-2 i alt) en base a 8 paràmetres:

ECOG, edat, hemoglobina, leucòcits, plaquetes, percentatge de blasts a MO, cariotip i dependència transfusional. El score no ha tingut una gran acceptació. El principal inconvenient que planteja és que inclou “variables relacionades amb el pacient”, que com hem explicat prèviament podria fer incórrer en decisions terapèutiques errònies en sobreestimar el risc específic de la malaltia en pacients d’edat avançada o amb un ECOG elevat. D’altra banda es va desenvolupar en base a una població molt heterogènia, la qual cosa podria dificultar l’extrapolació directa dels resultats a subpoblacions més homogènies de pacients. En aquest sentit, l’índex ha estat validat en sèries de pacients amb SMD *de novo* (Komrokji *et al*, 2012) i en SMD secundàries a tractament (Zeidan *et al*, 2017).

Durant el mateix any, Garcia-Manero i col·laboradors del MD Anderson publicaren el LR-PSS que permetia detectar a pacients classificats en categories de baix risc de l’IPSS (baix i intermedi-1) amb un comportament clínic desfavorable i que, per tant, podrien beneficiar-se de rebre tractaments modificadors de la malaltia (Garcia-Manero *et al*, 2008). Aquest índex també ha estat validat posteriorment (Bejar *et al*, 2012; Komrokji *et al*, 2015).

9.1.6 Recomanacions del GESMD per a la estratificació pronòstica de les síndromes mielodisplàstiques

Les guies del GESMD recomanen estratificar els pacients en dos grups de risc. Es consideren pacients d’alt risc aquells amb una mediana de supervivència global estimada inferior a 30 mesos (Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos, 2012).

- Pacients d’alt risc:
 - o IPSS intermedi-2 i alt; i/o WPSS alt i molt alt, i/o IPSS-R alt i molt alt.
 - o IPSS intermedi-1; i/o WPSS intermedi, i/o IPSS-R intermedi amb una o més de les següents característiques:
 - Anomalia citogenètica de risc alt o molt alt de l’IPSS-R.
 - Plaquetes $< 30 \times 10^9/L$.
 - Neutròfils $< 0,5 \times 10^9/L$.
 - Mielofibrosi (graus 2-3 del consens europeu).

- Pacients de baix risc:
 - Pacients que no aconsegueixen cap dels supòsits anteriors.

9.2 Valoració pronòstica de la leucèmia mielomonocítica crònica

Els pacients amb LMMC poden presentar una evolució clínica molt variable, des de processos quasi indolents amb medianes de supervivència estimades per sobre dels cinc anys a formes molt agressives amb una esperança de vida de pocs mesos. En general, la LMMC es considera una entitat de mal pronòstic amb una mediana de supervivència global que es situa entre els 18 i els 24 mesos (Fenaux *et al*, 1988; Worsley *et al*, 1988; Germing *et al*, 2004a, 2007; Onida *et al*, 2002; Such *et al*, 2013; Padron *et al*, 2015; Elena *et al*, 2016; Schuler *et al*, 2014). S'han desenvolupat diferents índexs pronòstics amb l'objectiu d'oferir una valoració pronòstica individualitzada a aquests pacients ja que, tal i com succeeix amb les SMD, les decisions terapèutiques són adaptades al risc. A continuació s'enumeren una sèrie de factors pronòstics adversos independents que, com veurem posteriorment, són adequadament recollits pels diferents índexs pronòstics existents:

- Nivells sèrics elevats de LDH (Aul *et al*, 1992).
- Anèmia (Onida *et al*, 2002; Such *et al*, 2013; Itzykson *et al*, 2013a; Patnaik *et al*, 2013, 2014; Elena *et al*, 2016; Worsley *et al*, 1988).
- Plaquetopènia (Worsley *et al*, 1988; Aul *et al*, 1992; Itzykson *et al*, 2013a; Patnaik *et al*, 2013, 2014).
- Neutropènia (Worsley *et al*, 1988).
- Requeriment transfusional (Such *et al*, 2013; Elena *et al*, 2016).
- Leucocitosi (Itzykson *et al*, 2013a)
 - LMMC displàstica vs. Proliferativa (Such *et al*, 2013).
- Monòcits $> 10 \times 10^9/L$ (Patnaik *et al*, 2013, 2014).
- Percentatge de blasts a MO
 - LMMC-0 vs. LMMC-1 vs. LMMC-2 (Schuler *et al*, 2014).

- Presència de precursors mieloides circulants (mielèmia) (Onida *et al*, 2002; Patnaik *et al*, 2013, 2014).
- Recompte limfocitari superior a $2,5 \times 10^9/L$ (Onida *et al*, 2002; Beran *et al*, 2007; Germing *et al*, 2002).
- Alteracions citogenètiques (alteracions del cromosoma 7, cariotip complex, +8) (Such *et al*, 2011; Tang *et al*, 2014; Wassie *et al*, 2014).
- Mutacions específiques (*ASXL1*, *NRAS*, *RUNX1*, *SETBP1*) (Itzykson *et al*, 2013a; Patnaik *et al*, 2014; Elena *et al*, 2016).

Abans de les classificació de l'OMS 2001, la LMMC era considerada un subtipus de SMD (Bennett *et al*, 1982) i per això la seva avaluació pronòstica era duta a terme mitjançant índexs pronòstics desenvolupats per a pacients amb SMD. L'índex més habitualment utilitzat era l'IPSS, malgrat que no permetia predir el pronòstic específic de les variants proliferatives ja que durant el seu desenvolupament s'excloueren les LMMC amb una xifra de leucòcits superior a $12 \times 10^9/L$ (Greenberg *et al*, 1997).

Fins a la publicació del *CMML-specific Prognostic Scoring System* (CPSS) l'any 2013 (Such *et al*, 2013), només existia un índex pronòstic específic per a la LMMC basat en una sèrie llarga de més de 200 pacients, el *MD Anderson Prognostic Scoring System* (MDAPS) que va aparèixer l'any 2002 (Onida *et al*, 2002). Fins aleshores s'havien desenvolupat tres índexs pronòstics per a la LMMC: l'índex de *Bournemouth* modificat, l'índex de *Düsseldorf* i l'índex espanyol.

L'índex de *Bournemouth* modificat (Worsley *et al*, 1988) va ser el primer *score* desenvolupat específicament per a la LMMC. Incorporava les variables: xifra de neutròfils, valors d'hemoglobina, recompte de plaquetes i percentatge de blasts a MO. Permetia diferenciar dos grups de risc, alt i baix, amb medianes de supervivència de 15 i 27 mesos respectivament.

L'índex de *Düsseldorf* es desenvolupà l'any 1992 en base a una cohort de 235 pacients amb SMD (Aul *et al*, 1992). Aquest índex, que aportava el valor de LDH com a nova variable pronòstica, va permetre estratificar especialment bé els pacients amb LMMC (Germing *et al*, 2004a). Permetia segmentar la sèrie de pacients amb LMMC en tres grups de risc: baix (mediana de supervivència global

de 93 mesos), intermedi (mediana de supervivència global de 26 mesos) i alt (mediana de supervivència global de 12 mesos).

L'índex espanyol publicat per González-Medina (González-Medina *et al*, 2002) i col·laboradors es basava en una sèrie de 70 pacients amb LMMC diagnosticats a l'Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona. Permetia diferenciar dos grups de risc, un amb una mediana de supervivència de 44 mesos, i l'altre de 7 mesos.

A continuació es detallen els índexs pronòstics específics per a la LMMC basats en sèries llargues de pacients. Aquests han permès una estratificació pronòstica molt més precisa d'aquest grup de pacients.

9.2.1 MD Anderson Prognostic Scoring System (MDAPS)

L'any 2002, Onida i col·laboradors publicaren el MDAPS (Onida *et al*, 2002) que es desenvolupà en base a 213 pacients amb LMMC. L'índex incloïa quatre variables: hemoglobina inferior a 120 g/L, recompte absolut de limfòcits superior a $2,5 \times 10^9/L$, presència de cèl·lules mieloides immadures circulants (mielèmia), percentatge de blasts a MO igual o superior al 10%. Permetia diferenciar quatre grups de risc: baix (mediana de supervivència global de 24 mesos), intermedi-1 (mediana de supervivència global de 15 mesos), intermedi-2 (mediana de supervivència global de 8 mesos) i alt (mediana de supervivència global de 5 mesos). Les noves variables pronòstiques, recompte absolut de limfòcits superior a $2,5 \times 10^9/L$ i presència de mielèmia, foren posteriorment validades per altres grups (Germing *et al*, 2002; Patnaik *et al*, 2013). Posteriorment, l'índex va ésser validat per una nova cohort de 250 pacients del MD Anderson (Beran *et al*, 2007). El principal problema que presentava l'índex és que malgrat separar quatre grups pronòstics amb supervivències significativament diferenciades, aquestes no permetien fer una separació efectiva dels pacients d'alt i baix risc, ja que tots els grups presentaven medianes de supervivència molt dolentes, inclús en la categoria de baix risc. Aquest fet limita el seu ús com a eina per prendre decisions terapèutiques adaptades al risc dels pacients.

9.2.2 CMML-specific Prognostic Scoring System (CPSS)

El CPSS ha estat l'índex més àmpliament utilitzat des de la seva publicació en 2013 (Such *et al*, 2013). El CPSS es desenvolupà en base a una sèrie de 558 pacients amb LMMC del Registro Español de SMD (RESMD) i va ser validat en una cohort independent de 274 pacients del Registre de Düsseldorf i de l'Hospital San Matteo de Pavia. Va ser el primer índex específic per a la LMMC en introduir la citogenètica com a variable pronòstica. Els grups de risc citogenètic foren prèviament definits per Such i col·laboradors i es coneixen internacionalment amb el nom de *Spanish Cytogenetic Risk Stratification System* (Such *et al*, 2011). Es diferenciaren tres grups de risc citogenètic: baix (cariotip normal i -Y), intermedi (anomalies no explícitament mencionades als grups de baix i alt risc) i alt (anomalies del cromosoma 7; cariotip complex, definit per la presència de tres o més anomalies, i +8). El CPSS inclou quatre variables: LMMC displàstica vs. LMMC proliferativa, LMMC-1 vs. LMMC-2, requeriment transfusional i la classificació citogenètica prèviament esmentada. Permet diferenciar quatre grups pronòstics amb diferències significatives en quant a la supervivència global i el risc de transformació leucèmica: baix (mediana de supervivència global de 72 mesos), intermedi-1 (mediana de supervivència global de 31 mesos), intermedi-2 (mediana de supervivència global de 13 mesos) i alt (mediana de supervivència global de 5 mesos). Els grups pronòstics establerts permetien establir una clara diferència operativa entre pacients de baix (categories de risc baix i intermedi-1) i alt risc (intermedi-2 i alt). En analogia amb les recomanacions del GESMD sobre l'estratificació pronòstica de les SMD, que considera com pacients d'alt risc aquells amb una mediana de supervivència global estimada inferior a 30 mesos (Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos, 2012), les supervivències estimades d'aquests grups de pacients amb LMMC són excel·lents per planificar estratègies terapèutiques adaptades al risc. En aquest mateix treball es proposava un CPSS alternatiu que substituïa la variable requeriment transfusional pel valor d'hemoglobina <10 g/dL. El CPSS alternatiu presentava una capacitat predictiva, mesurada per l'índex de concordança CPE (*Concordance Probability Estimate*), quasi idèntica al model original. Malgrat això, no va permetre diferenciar

significativament quatre grups de risc de transformació leucèmica a la cohort de validació.

9.2.3 Groupe Français des Myélodysplasies (GFM) prognostic score (GFM score)

El GFM score va ser desenvolupat en base a una sèrie de 312 pacients del Grup Francès de SMD (Groupe Français des Myélodysplasies) i validat per una cohort de 165 pacients del Munich Leukemia Laboratory (MLL) (Itzykson *et al*, 2013a). Va ser el primer índex en incloure dades moleculars, en concret la mutació d'*ASXL1*. El GFM score inclou cinc variables: edat > 65 anys, leucòcits > $15 \times 10^9/L$, anèmia (Hb < 10 g/dL en dones i < 11 g/dL en homes), plaquetes < $100 \times 10^9/L$ i mutacions d'*ASXL1*. Permet diferenciar tres grups pronòstics amb diferències significatives en quant a la supervivència global i la supervivència lliure de progressió: baix (mediana de supervivència global no assolida), intermedi (mediana de supervivència global de 38,5 mesos) i alt (mediana de supervivència global de 14,4 mesos). Per les supervivències reflectides sembla un índex excel·lent per guiar en la presa de decisions terapèutiques adaptades al risc. El principal inconvenient que planteja és que inclou l'edat, que com hem explicat prèviament podria fer incórrer en decisions terapèutiques errònies en sobreestimar el risc específic de la malaltia en pacients d'edat avançada.

9.2.4 Mayo Prognostic Model for WHO-defined CMML (Mayo Model)

El Mayo Model també va aparèixer l'any 2013 (Patnaik *et al*, 2013). Es va desenvolupar en base a una sèrie de 226 pacients amb CMML de la Clínica Mayo i fou validat per una cohort de 268 pacients del Lee Moffit. S'analitzaren variables clíniques, citogenètiques i moleculars (mutacions d'*ASXL1*, *SRSF2*, *SF3B1* i *U2AF1*), però a l'anàlisi multivariable només quatre variables clíniques van mantenir-se com a factors pronòstics adversos amb valor independent, entre les quals no s'inclouïa el percentatge de blasts a MO. El Mayo model inclou les següents variables: hemoglobina < 100 g/L, recompte de monòcits superior a $10 \times 10^9/L$, recompte de plaquetes < $100 \times 10^9/L$ i presència de cèl·lules mieloides immadures circulants (mielèmia). Permet diferenciar tres grups amb diferències pronòstiques: baix

(mediana de supervivència de 32 mesos), intermedi (mediana de supervivència global de 18,5 mesos) i alt (mediana de supervivència global de 10 mesos).

9.2.5 Mayo Molecular Model (MMM)

Davant de les diferències observades pel que fa a l'impacte pronòstic de les mutacions d'*ASXL1* entre el GFM i el grup de la Clínica Mayo, es va dur a terme un treball col·laboratiu entre ambdós grups per tal de resoldre aquesta discrepància. Els grups van aconseguir reunir una sèrie de 466 pacients. En combinar les dues sèries les mutacions d'*ASXL1* (variants *nonsense* i *frameshift*) varen confirmar ser un factor pronòstic advers independent per a la supervivència global però no per a la transformació leucèmica. Finalment es desenvolupà el MMM que incloïa les variables del Mayo Model i afegia la mutació d'*ASXL1* (Patnaik *et al*, 2014). El MMM permet diferenciar quatre grups de risc: baix (mediana de supervivència global de 97 mesos), intermedi-1 (mediana de supervivència global de 59 mesos), intermedi-2 (mediana de supervivència global de 31 mesos) i alt (mediana de supervivència global de 16 mesos).

9.2.6 Molecular CMML-specific Prognostic Scoring System (CPSS-Mol)

Elena i col·laboradors publicaren una revisió del CPSS amb l'addició de dades moleculars (Elena *et al*, 2016). El CPSS-Mol es desenvolupà en base a una sèrie de 214 pacients amb LMMC i fou validat per una cohort externa de 260 pacients. Les mutacions que van demostrar tenir un impacte pronòstic advers independent van ésser *ASXL1*, *RUNX1*, *SETBP1* i *NRAS*. Amb la combinació d'aquestes mutacions i les categories citogenètiques definides pel GESMD es va implementar un *score* genètic. El CPSS-Mol inclou les següents variables: percentatge de blasts a MO igual o superior al 5%, leucòcits $\geq 13 \times 10^9/L$, requeriment transfusional i el *score* genètic prèviament esmentat. Permet diferenciar quatre grups pronòstics amb diferències significatives en quant a la supervivència global i la incidència acumulada de transformació leucèmica: baix (mediana de supervivència global no assolida), intermedi-1 (mediana de supervivència global de 64 mesos), intermedi-2 (mediana de supervivència global de 37 mesos) i alt (mediana de supervivència global de 18 mesos).

10. Tractament de les síndromes mielodislàstiques i de la leucèmia mielomonocítica crònica

L'elecció de tractament en les SMD i en la LMMC és una decisió complexa a causa de l'elevada heterogeneïtat clínica que presenten aquestes patologies. Per això és fonamental recórrer a totes les eines d'estratificació pronòstica prèviament comentades ja que la decisió terapèutica serà adaptada al risc. Les opcions terapèutiques disponibles en ambdues patologies són limitades i existeixen molt pocs tractaments que hagin demostrat allargar la supervivència de forma significativa. En aquest sentit, l'únic tractament amb potencial curatiu és el transplantament al·logènic de progenitors hematopoètics però la seva indicació està limitada a un nombre molt reduït de pacients per la seva elevada morbidimortalitat i al fet que l'edat al diagnòstic d'aquestes malalties sigui molt avançada (Saber & Horowitz, 2016; de Witte *et al*, 2017). Com que el tractament d'aquestes patologies està fora del focus principal d'estudi de l'actual tesi revisarem les principals opcions terapèutiques de forma resumida en base a les recomanacions del GESMD recollides en les *Guías de diagnóstico y tratamiento de los síndromes mielodisplásicos y de la leucemia mielomonocítica crónica* (Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos, 2012).

10.1 Tractament de les síndromes mielodislàstiques

En la pràctica clínica habitual l'elecció de tractament dependrà de la categoria de risc que adjudiquem als pacients, és a dir, si considerem al pacient de baix o d'alt risc. Per a prendre aquesta important decisió podem seleccionar algun dels índexs de predicció pronòstica prèviament exposats. En aquells pacients en què es plantegin dubtes sobre la categoria a la que haurien de ser adscrits, com per exemple els pacients classificats en la categoria de risc intermedi de l'IPSS-R (Greenberg *et al*, 2012), serà recomanable ampliar el seu abordatge pronòstic usant tota la informació amb rellevància pronòstica disponible. En aquest sentit podríem: realitzar l'estratificació pronòstica utilitzant índexs pronòstics diferents (Valcárcel *et al*, 2015), algun dels quals ha estat concebut per detectar a pacients de baix risc amb un comportament clínic propi dels pacients d'alt risc (Garcia-

Manero *et al*, 2008); perfilar el seu pronòstic amb la informació que aporten els estudis moleculars (Haider *et al*, 2017); utilitzar les recomanacions del GESMD que considera a un pacient d'alt risc si presenta una mediana de supervivència global estimada inferior a 30 mesos (Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos, 2012), i seguir les últimes recomanacions del grup internacional que considera a pacients d'alt risc aquells inclosos a les categoria intermèdia de l'IPSS-R però que puntuen més de 3,5 punts (Pfeilstöcker *et al*, 2016). Establir aquesta distinció de forma adequada és cabdal ja que l'objectiu del tractament varia entre els pacients de baix i d'alt risc. L'objectiu principal del tractament dels pacients de baix risc és millorar la qualitat de vida que estarà condicionada, sobretot, pel seu grau d'anèmia; mentre que en els pacients d'alt risc l'objectiu primordial estarà destinat a modificar la història natural de la malaltia, és a dir, a intentar perllongar la supervivència i endarrerir la transformació leucèmica d'aquest grup de pacients (Greenberg *et al*, 2017; Malcovati *et al*, 2013; Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos, 2012). L'únic fàrmac que ha demostrat allargar la supervivència de forma significativa en les SMD d'alt risc és l'azacitidina (Fenaux *et al*, 2009). En general, els tractaments disponibles poden classificar-se en tres grans grups: tractament de suport (transfusions de components sanguinis, teràpia antimicrobiana, factors estimulants de colònies granulocítiques (G-CSF), quelants del ferro), tractament no intensiu (agents estimulants de l'eritropoesi (AEE), fàrmacs hipometilants (azacitidina, decitabina, guadecitabina), fàrmacs immunomoduladors (lenalidomida), tractament immunosupressor (ciclosporina, timoglobulina antitimocítica), fàrmacs bloquejadors de la via de TGF- β (luspatercept sotatercept), inhibidors de IDH1/IDH2 (enasidenib), inhibidors de la histona deacetilasa (HDACi), *immune checkpoint inhibitors*, anàlegs de la trombopoetina) i tractament intensiu (quimioteràpia tipus LMA, transplantament al·logènic de progenitors hematopoètics).

A la figura 15 es mostra l'algoritme proposat pel GESMD pel tractament dels pacients de baix risc, mentre que a la figura 16 es presenta l'algoritme proposat pel GESMD pel tractament dels pacients d'alt risc.

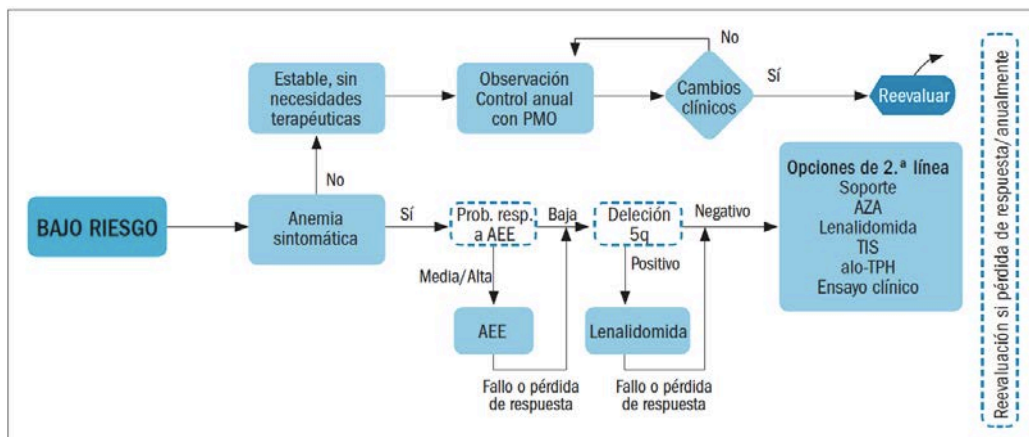


Figura 15. Algoritme de tractament per a les SMD de baix risc proposat pel GESMD. Abreviatures. AEE: agents estimulants de l'eritropoesi; AZA: azacitidina; PMO: punció de moll d'os; TIS: tractament immunosuppressor; alo-TPH: transplantament al·logènic de progenitors hematopoètics.

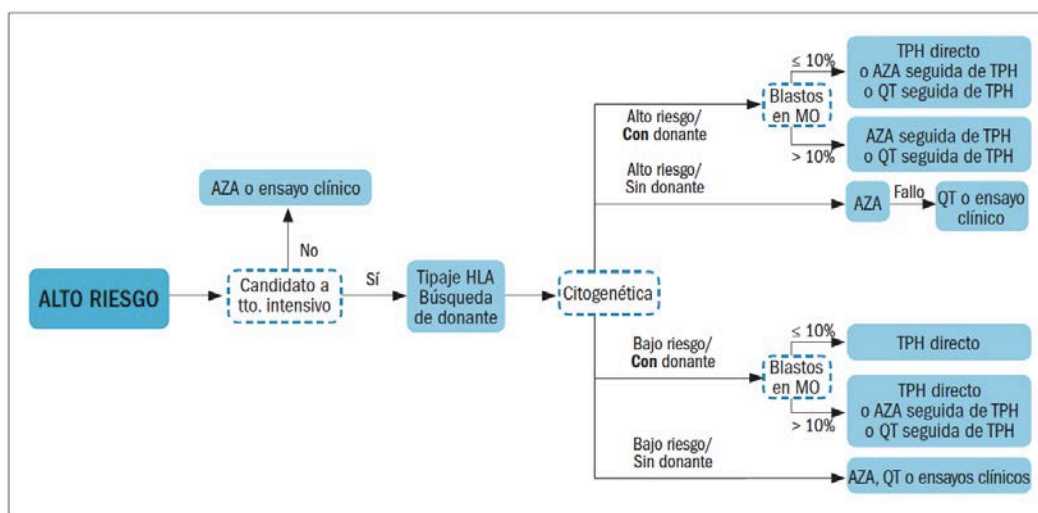


Figura 16. Algoritme de tractament per a les SMD d'alt risc proposat pel GESMD. Abreviatures. AZA: azacitidina; HLA: antigen leucocitari humà; QT: quimioteràpia tipus LMA; TIS: tractament immunosuppressor; TPH: transplantament al·logènic de progenitors hematopoètics.

10.2 Tractament de la leucèmia mielomonocítica crònica

De la mateixa manera que succeeix amb les SMD, les decisions terapèutiques en la LMMC també són adaptades al risc. En aquest sentit, l'índex pronòstic proposat pel

GESMD, el CPSS, sembla ser l'eina amb la millor acceptació internacional per a l'estratificació pronòstica dels pacients amb LMMC (Such *et al*, 2013). Podem dividir els pacients amb LMMC en pacients de baix risc, en els quals l'objectiu principal és millorar la qualitat de vida, i en pacients d'alt risc en els quals es pretén modificar la història natural de la malaltia (Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos, 2012; Onida *et al*, 2013; Solary & Itzykson, 2017; Patnaik & Tefferi, 2018). Malgrat que les dades sobre l'activitat dels fàrmacs hipometilants en la LMMC és més escassa i contradictòria que en les SMD, amb respostes globals que varien entre 25%-70% en funció dels estudis (Aribi *et al*, 2007; Wijermans *et al*, 2008; Braun *et al*, 2011; Costa *et al*, 2011; Garcia-Manero *et al*, 2011; Thorpe *et al*, 2012; Greco *et al*, 2011), l'azacitidina està aprovada per l'agència europea del medicament (EMA) pel tractament de les LMMC-2 en absència de trets mieloproliferatius (LMMC-2 variant displàstica). En els pacients amb variants proliferatives de la malaltia el tractament d'elecció és la hidroxiurea (Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos, 2012; Onida *et al*, 2013; Solary & Itzykson, 2017; Patnaik & Tefferi, 2018). Actualment es troba en curs un assaig clínic fase III conduït pel *Groupe Francophone des Myelodysplasies* comparant decitabina amb o sense hidroxiurea vs. hidroxiurea en pacients amb LMMC proliferativa en fases avançades (*ClinicalTrials.gov Identifier*: NCT02214407). A causa de l'escassetat de dades sobre la idoneïtat de les diferents propostes terapèutiques en la LMMC, el seu algoritme terapèutic està per definir. A continuació s'exposa l'algoritme terapèutic proposat pel GESMD pel tractament de la LMMC (Figura 17).

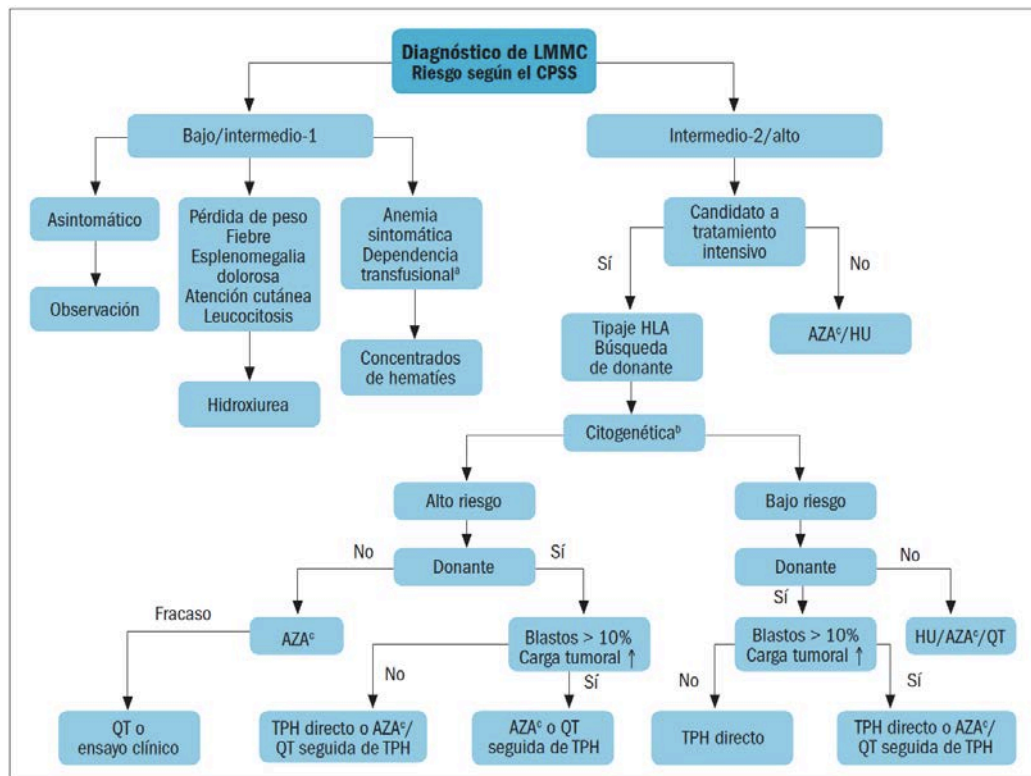


Figura 17. Algoritme de tractament per a la LMMC proposat pel GESMD. Abreviatures. AEE: agents estimulants de l'eritropoesi; AZA: azacitidina; HU: hidroxiurea; QT: quimioteràpia tipus LMA; CPSS: *CMML-specific prognostic scoring system*; TPH: transplantament al·logènic de progenitors hematopoètics.

II. HIPÒTESIS I OBJECTIUS

La present tesi doctoral pretén aportar millores en l'avaluació pronòstica de les síndromes mielodisplàstiques (SMD) i de la leucèmia mielomonocítica crònica (LMMC). Les SMD i la LMMC presenten característiques clínic-biològiques comunes, com la presència de citopènies, displàsia morfològica, hematopoesi inefectiva, anomalies genètiques recurrents similars i un risc incrementat d'evolucionar a una leucèmia mieloide aguda (LMA), fet que ocasionà que la LMMC és considerés un subtipus de SMD en el passat. Les característiques diferencials d'alguns pacients amb LMMC, amb trets característics de les malalties mieloproliferatives com la leucocitosi, hepato-esplenomegàlia o trombocitosi, ha fet que la LMMC es consideri un subtipus específic de neoplàsia mielodisplàstica/mieloproliferativa des de que es va crear la categoria a la classificació de l'OMS 2001. D'altra banda, malgrat que la majoria de factors pronòstics identificats a les SMD són també aplicables a la LMMC, se n'han identificat alguns específics d'aquesta última, sent especialment distintiu l'impacte advers de la leucocitosi. Per això sembla interessant abordar ambdues patologies de manera independent per tal d'intentar aportar millores en l'avaluació pronòstica dels pacients. A continuació s'exposen les hipòtesis i objectius de treball que hem elaborat:

- 1) Existeix un nombre limitat d'estudis avaluant l'impacte pronòstic dels nivells de metilació i d'hidroximetilació globals de l'ADN en les SMD. La majoria dels treballs que han avaluat l'impacte pronòstic de la metilació es focalitzen en l'anàlisi del seu estat en gens concrets o en grups de gens. La metilació és un mecanisme de silenciament gènic. La majoria dels gens analitzats han estat gens supressors tumorals, pel que és lògic pensar que el seu silenciament es relacioni amb un pitjor pronòstic. D'altra banda, el fàrmac hipometilant azacitidina ha estat l'únic tractament capaç d'allargar la supervivència de forma significativa en les SMD d'alt risc. El seu efecte no està circumscrit a gens específics, sinó que produeix una disminució dels nivells globals de metilació. Recentment s'ha descrit el mecanisme epigenètic de la hidroximetilació que promou la desmetilació fisiològica de l'ADN. Basant-nos

en l'evidència indirecta que ens aporta l'ús dels fàrmacs hipometilants ens hem formulat les següents **hipòtesis**:

- a. Els pacients amb els nivells més elevats de metilació global de l'ADN haurien de presentar un pitjor pronòstic.
- b. Els pacients amb els nivells més baixos d'hidroximetilació global de l'ADN haurien de presentar un pitjor pronòstic.

i. **Objectius:**

1. Valorar els nivells de metilació (5-mC) i hidroximetilació (5-hmC) globals de l'ADN en una sèrie pacients amb SMD *de novo* mitjançant l'ús d'anticossos anti-5-mC i anti-5-hmC.
 2. Avaluar l'impacte dels nivells globals de 5-mC i 5-hmC de l'ADN en la supervivència global (SG) i en el temps a la transformació leucèmica dels pacients amb SMD *de novo*.
 3. Analitzar l'impacte dels nivells globals de 5-mC i 5-hmC de l'ADN en la supervivència global (SG) dels pacients amb SMD de baix risc, per copsar si aquesta estratègia serveix per detectar pacients de baix risc que puguin comportar-se com pacients d'alt risc (medianes de SG estimades inferiors als 30 mesos).
 4. Analitzar l'impacte de les variables pronòstiques clàssiques en les SMD a la nostra sèrie.
 5. Avaluar si els nivells globals de 5-mC i 5-hmC de l'ADN es correlacionen amb alguna de les variables clàssiques analitzades.
- 2) Es consideren SMD amb predominança eritroide (SMD-E) aquelles en què la sèrie eritroide suposa el 50% o més de la cel·lularitat medul·lar. Malgrat no constituir un subgrup específic en les diferents classificacions de l'OMS, sí que se'n fa una menció especial a l'última edició. Aquestes plantegen el diagnòstic diferencial amb la leucèmia aguda eritroide/mieloide o eritroleucèmia. El comitè d'experts que elaboraren la classificació de l'OMS 2008 va transmetre una falta de consens sobre quin era el millor mètode per

establir el percentatge de blasts en les SMD-E, si fer-ho en base a la cel·lularitat no eritroide (CNE), com en l'eritroleucèmia, o bé en base a la cel·lularitat total. Malgrat que no existia cap evidència al respecte, la recomanació final va ser que en les SMD-E el recompte s'havia de realitzar en base a la cel·lularitat total, com en la resta de les SMD. Aquesta recomanació presentava l'inconvenient que el diagnòstic d'AREB-2 només es podia establir en aquells pocs pacients amb SMD-E en què el percentatge de blasts a MO fos menor d'un 10% però que presentessin 5-19% blasts a SP o blasts amb bastons d'Auer, ja que la presència d'un 10% de blasts a MO en el context de la predominança eritroide implica almenys un 20% de blasts de la CNE i obliga a establir el diagnòstic d'eritroleucèmia. D'altra banda, malgrat que l'eritroleucèmia es va considerar com un subtipus de LMA segons l'OMS 2008, aquesta presenta característiques clínic-biològiques pròpies de les SMD com la presència de displàsia multilínia; una elevada freqüència d'alteracions citogenètiques típiques de les SMD, especialment de cariotips complexes, i un perfil de mutacions gèniques més proper al de les SMD que al de les LMA *de novo*. Per tot l'anterior ens hem formulat les següents hipòtesis:

- a. La recomanació de l'OMS que aconsella considerar el percentatge de blasts en base a la cel·lularitat total en les SMD-E podria infravalorar el risc d'aquest grup de pacients, ja que la màxima categoria de risc de l'OMS (AREB-2) només es pot assignar a un nombre molt escàs de SMD-E. A més, davant d'expansions molt marcades de la sèrie eritroide, el percentatge de blasts referit en base a la cel·lularitat total podria no reflectir el seu impacte pronòstic advers de la mateixa manera que en les SMD sense un increment de la sèrie eritroide.
- b. Malgrat ésser considerada un subtipus de LMA a la classificació de l'OMS, les característiques clínic-biològiques de l'eritroleucèmia podrien fer que fos més adequat considerar-la un subtipus específic de SMD. Això tindria unes implicacions pronòstiques que haurien d'ésser avaluades específicament.

i. **Objectius:**

1. Comparar les característiques clíniques, morfològiques i citogenètiques entre els pacients amb SMD-E i els pacients amb SMD sense predominança eritroide.
 2. Comparar les característiques clíniques, morfològiques i citogenètiques entre els pacients amb SMD-E i l'eritroleucèmia. Focalitzant en la comparativa entre la categoria de major risc de les SMD-E, l'AREB-1, i l'eritroleucèmia, ja que aquesta última suposaria el següent esglaió pronòstic si fos considerada un subtipus específic de SMD.
 3. Comparar la SG de les AREB-1 amb predominança eritroide i de l'eritroleucèmia.
 4. Comparar la SG de l'eritroleucèmia i de les AREB-2 que presenten un 20% o més de blasts de la CNE però que, a diferència de l'eritroleucèmia, tenen menys d'un 50% d'eritroblasts a MO.
 5. Comparar la SG de les AREB-1 amb i sense predominança eritroide.
 6. Estudiar la forma més òptima d'establir el percentatge de blasts dels pacients amb SMD-E, en base a la cel·lularitat total, tal i com s'aconsella actualment per l'OMS, o en base a la CNE.
- 3) Malgrat que existeixen índexs pronòstics específics per a la valoració de la LMMC, per la seva baixa prevalença molt pocs s'han basat en sèries llargues de pacients. De fet, l'IPSS ha estat l'score pronòstic més utilitzat per a la valoració de la LMMC, malgrat que no és aplicable a les variants proliferatives. L'any 2002 aparegué el MD Anderson Prognostic Scoring System (MDAPS), el primer índex basat en una sèrie llarga de pacients erigit-se com a l'eina pronòstica més valuosa. A causa de la recent aparició d'índexs específics com el *CMML-specific Prognostic Score* (CPSS) i el *Mayo prognostic model* es pretén avaluar la validesa d'aquests aplicada a una sèrie llarga de

pacients amb LMMC. Posteriorment compararem els tres índexs per definir quin d'ells estratifica millor els pacients de la nostra sèrie i valorarem independentment totes les variables que els integren. La nostra **hipòtesi** és que no hauria d'haver-hi grans diferències entre els índexs analitzats en quant a la capacitat de predicció de la SG i del risc de transformació leucèmica i que totes les variables que els integren haurien de mostrar un impacte pronòstic independent en quant a la SG en la nostra sèrie.

i. Objectius:

1. Valoració de l'impacte pronòstic en quant a SG i temps a la transformació leucèmica de les variables i que integren els índex MDAPS, CPSS i *Mayo prognostic model*.
2. Valoració de l'aplicabilitat dels índexs a la nostra sèrie de pacients i de la seva capacitat per estratificar el pacients en grups de baix i alt risc.
3. Establir quines de les variables pronòstiques que integren els índexs es mostren com a factors pronòstics adversos independents en la nostra sèrie de pacients.
4. Selecció dels factors pronòstics adversos independents per a la SG amb major pes pronòstic per tal d'implementar un nou índex o modificar-ne algun dels existents amb l'addició d'alguna de les variables seleccionades.
5. Seleccionar l'índex amb la millor capacitat predictiva de la supervivència i del risc de progressió leucèmica.

III. MÈTODES I RESULTATS

Els mètodes i resultats s'exposen en els cinc articles publicats que conformen l'actual tesi:

Primer treball

Calvo X, Nomdedeu M, Navarro A, Tejero R, Costa D, Muñoz C, Pereira A, Peña O, Risueño RM, Monzó M, Esteve J, Nomdedeu B. *High levels of global DNA methylation are an independent adverse prognostic factor in a series of 90 patients with de novo myelodysplastic syndrome*. Leuk Res. 2014 Aug;38(8):874-81. Factor d'impacte: 2,319.

Segon treball

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. Factor d'impacte: 26,303.

* Igual contribució com a primers autors

Tercer treball

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. Factor d'impacte: 5,303.

Quart treball

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 classifications of myelodysplastic syndromes. Mod Pathol. 2016 Dec; 29(12):1541-1551. Factor d'impacte: 6,655.

Cinquè treball

Calvo X, Nomdedeu M, Santacruz R, Martínez N, Costa D, Pereira A, Estrada N, Xicoy B, Esteve J, Nomdedeu B. *Comparison of three prognostic scoring systems in a series of 146 cases of chronic myelomonocytic leukemia (CMML): MD Anderson prognostic score (MDAPS), CMML-specific prognostic scoring system (CPSS) and Mayo prognostic model. A detailed review of prognostic factors in CMML.* Leuk Res. 2015 Jul 23. pii: S0145-2126(15)30324-6. Factor d'impacte: 2,319.

Primer Treball

High levels of global DNA methylation are an independent adverse prognostic factor in a series of 90 patients with de novo myelodysplastic syndrome.

Resum

Es va avaluar l'impacte pronòstic dels nivells de metilació i hidroximetilació globals de l'ADN en una sèrie de 90 pacients amb SMD *de novo*. El DNA es va obtenir de mostres de MO extretes al diagnòstic i els nivells de metilació i hidroximetilació globals foren determinats per ELISA. En concret s'utilitzaren anticossos anti-5-metilcitosina (5-mC) i anti-5-hidroximetilcitosina (5-hmC). Els pacients amb un percentatge de DNA metilat per sobre del 2,73% presentaren una supervivència global significativament més curta que els pacients amb un percentatge més baix de DNA metilat ($P=0,018$) i a més presentaren una clara tendència estadística a presentar un menor temps a la transformació leucèmica ($P=0,084$), que fou estadísticament significativa en censurar 9 pacients que van rebre tractaments modificadors de la història natural de la malaltia (azacitidina, quimioteràpia tipus LMA i transplantament al·logènic de progenitors hematopoètics). Per tal de seleccionar el punt de tall òptim del percentatge global de metilació que separava la nostra sèrie en dos grups amb supervivències globals significativament diferenciades, vàrem utilitzar el mètode en R *Maximally Selected Rank Statistics* (MaxStat). L'impacte pronòstic advers observat a l'anàlisi univariable dels nivells elevats de 5-mC globals de l'ADN per a la supervivència global i la transformació leucèmica va ser mantingut a l'anàlisi multivariable en ajustar el seu impacte per l'edat, sexe, requeriment transfusional i IPSS. Per tant, els nivells elevats de metilació global de l'ADN es van erigir com un factor pronòstic advers independent en la nostra sèrie. En la mateixa línia, els pacients de baix risc, definits per l'IPSS, WPSS i IPSS-R, amb un percentatge de DNA metilat per sobre del 2,73% mostraren una supervivència significativament menor ($P=0,032$, $P=0,023$, $P=0,031$ per l'IPSS, WPSS i IPSS-R respectivament). A diferència del que succeí amb els nivells globals de 5-mC, no vàrem trobar cap punt de tall òptim del percentatge de 5-hmC de l'ADN global que separés la nostra sèrie en dos grups amb supervivències o amb temps a la transformació leucèmica significativament diferenciats. L'estudi

Mètodes i resultats

suggereix que els nivells de metilació global de l'ADN poden ser un bon predictor de la supervivència en les SMD.



High levels of global DNA methylation are an independent adverse prognostic factor in a series of 90 patients with de novo myelodysplastic syndrome[☆]

Xavier Calvo^a, Meritxell Nomdedeu^{b,c}, Alfons Navarro^d, Rut Tejero^d, Dolors Costa^a, Concha Muñoz^a, Arturo Pereira^e, Oscar Peña^b, Ruth M. Risueño^c, Mariano Monzó^d, Jordi Esteve^{b,c}, Benet Nomdedeu^{b,*}

^a Hematopathology Unit, Department of Pathology, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain

^b Hematology Department, Hospital Clínic, IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain

^c Josep Carreras Leukaemia Research Institute, Barcelona, Spain

^d Molecular Oncology and Embryology Laboratory, Human Anatomy Unit, School of Medicine, University of Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain

^e Department of Hemotherapy and Hemostasis, Hospital Clínic, IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain



ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 February 2014

Received in revised form 23 April 2014

Accepted 27 April 2014

Available online 12 May 2014

Keywords:

Myelodysplastic syndromes

Prognosis

5-mC

5-hmC

Methylation

Hydroxymethylation

ABSTRACT

The prognostic impact of global DNA methylation and hydroxymethylation was assessed in 90 patients with de novo myelodysplastic syndrome (MDS). DNA was isolated from bone marrow samples obtained at diagnosis and global methylation and hydroxymethylation were determined by ELISA. Patients with a percentage of methylated DNA above 2.73% had a shorter overall survival than those with lower levels ($P=0.018$) and presented a negative trend in terms of leukemia-free survival ($P=0.084$), that was statistically significant after censoring 9 patients that received disease-modifying treatments both in univariate and multivariate analyses. Similarly, the low-risk MDS patients defined by the IPSS, WPSS and IPSS-R with 5-mC percentage in total DNA above 2.73% had a shorter overall survival ($P=0.032$; $P=0.023$; $P=0.031$). No cut-off value for the 5-hydroxymethylcytosine percentage with statistical significance for overall or leukemia-free survival was obtained. This study suggests that global DNA methylation predicts overall survival in myelodysplastic syndromes.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The myelodysplastic syndromes (MDS) are a heterogeneous group of disorders, mostly appearing in older people, which are characterized by cytopenias, dysplastic hematopoiesis, and an inherent propensity to clonal evolution into acute myeloid leukemia (AML) [1]. Different prognostic procedures have been proposed to predict patient outcomes being cytogenetics the most valuable independent prognostic factor [2]. The International Prognostic Scoring System (IPSS) that classifies patients into four prognostic groups according to the number of cytopenias, blast

count and karyotype has been the most useful method applied in clinical practice [3]. Other scores have been proposed to increase the discriminatory power of IPSS such as the WHO classification-based prognostic scoring system (WPSS) [4], the MD-Anderson prognostic score [5] or the Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R) [6]. The WPSS introduced the transfusional requirement while the MD-Anderson score recognized poor performance status as new independent adverse prognostic factors. On the other hand, the IPSS-R proposed a more extensive reclassification of cytogenetics into five groups giving to this variable the highest prognostic value. In addition, every cytopenia was evaluated independently and new cut-off points were established in the blast percentage. The Spanish group of MDS (GESMD) has recently proposed a new approach considering high risk patients those with severe cytopenias [7,8], high bone marrow fibrosis [9] or high risk cytogenetics, although previously they were classified as low risk patients in the IPSS, WPSS or IPSS-R scores [10].

In the last years, relevant new information has been obtained from genomic studies. A fair number of mutations affecting mainly

[☆] Presented in part at the 17th Congress of the European Hematology Association (EHA), June 14–17, 2012, Amsterdam, Netherlands, as an Oral presentation.

* Corresponding author at: Hematology Department, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 227 57 76; fax: +34 93 227 98 11.

E-mail addresses: xcalvo@clinic.ub.es (X. Calvo), nomdedeu@clinic.ub.es (B. Nomdedeu).

the epigenetic or the splicing machinery have been described showing important relevance in the pathogenesis of MDS or in the outcome of patients [11–17]. This new data derived from translational research must be integrated in the upcoming prognostic scores.

DNA methylation consists of the addition of a methyl group to cytosines in CpG dinucleotides [18]. Aberrant DNA methylation at the promoter of CpG islands is a common event in human cancer and has been associated with silencing of important tumor suppressor genes [18,19]. The hydroxymethylation, a recently described epigenetic mechanism mediated by the ten-eleven translocation (TET) proteins which consists of adding a hydroxyl group at the 5' end of the 5-methylcytosines (5-mC) [20–22], has been described as a passive DNA demethylation process [23]. The relation between prognosis and DNA methylation has been investigated in single genes [24–27] or combinations of multiple genes in MDS patients [28,29], but to the best of our knowledge, little is known about the prognostic impact of global DNA methylation [30] in MDS and almost nothing about global DNA hydroxymethylation [31]. Epigenetic therapy using DNA methyltransferase inhibitors have been the only treatment capable of significantly prolonging survival in high-risk MDS [32], therefore, it seems critical to assess the impact of global DNA methylation and hydroxymethylation in the outcome of patients.

In this study, we examined the prognostic significance of global DNA methylation and hydroxymethylation in adult patients with de novo MDS using a simple, feasible and inexpensive method (ELISA assay).

2. Materials and methods

2.1. Patients

Ninety patients with de novo MDS diagnosed between January 2002 and December 2009 were evaluated at our institution (49 M/41 F; median age 75 years, range 32–97 years). Patients were grouped according to the World Health Organization (WHO) 2008 criteria, the International Prognostic Scoring System (IPSS) [3], the WHO classification-based prognostic Scoring System (WPSS) [4] and the Revised IPSS (IPSS-R) [6]. The median follow-up was 4.8 years (range 1.3–9.3 years). No patient was lost in follow-up. As expected, the majority of patients belonged to the low risk categories of IPSS, WPSS and IPSS-R. Main characteristics of patients are shown in Table 1. Informed consent was obtained in accordance with the Declaration of Helsinki and the Ethics Committee of Hospital Clínic de Barcelona provided institutional review board-approval for this study.

2.2. DNA isolation

Genomic DNA was isolated from cell pellets of bone marrow samples fixed with carnoy after the cytogenetic study done at diagnosis. The extraction was performed using the commercial DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's protocol and the 260/280 nm absorbance ratio was used to assess the purity of DNA. At least a concentration of 25 ng/μl was required to perform the study.

2.3. Global DNA methylation and hydroxymethylation analysis

Global methylation and hydroxymethylation were determined in total DNA of all samples by a specific ELISA assay (MethylFlash™ Methylated DNA Quantification Kit and MethylFlash™ Hydroxymethylated DNA Quantification Kit; Epigentek, Farmingdale, NY) which is capable to recognize the DNA methylated and hydroxymethylated fraction. This test uses monoclonal antibodies against 5-methylcytosine (5-mC) and 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC) to obtain the percentage of 5-mC and 5-hmC in total DNA. The procedure was performed according to manufacturer's protocol.

2.4. Data analysis

Statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and R 2.9.2 software (Vienna, Austria) [33]. All *p* values were two-tailed and the threshold of statistical significance was *p* less than 0.05. Clinical and biological parameters were recorded at the time of diagnosis. Descriptive statistical analysis of the main characteristics of patients was performed. Categorical variables are reported as counts and relative frequencies and continuous variables are indicated as medians and ranges.

Table 1
Main patient characteristics.

Variable	N=90 patients
Median age, years (range)	75 (32–97)
Gender (M/F)	49/41
Median follow-up, years (95% CI)	4.8 (1.3–9.3)
Median OS, years (95% CI)	4.6 (3.4–5.9)
<i>WHO 2008</i>	
RCUD (RA), (%)	2 (2.2)
RARS, n (%)	3 (3.3)
5q-, n (%)	1 (1.1)
RCMD, n (%)	63 (70)
MDS-U, n (%)	1 (1.1)
RAEB-I, n (%)	9 (10)
RAEB-II, n (%)	11 (12.2)
<i>IPSS risk group</i>	
Low risk (low/intermediate-1), n (%)	77 (86)
High risk (intermediate-2/high), n (%)	13 (14)
<i>WPSS risk group^a</i>	
Low risk (very low/low/intermediate), n (%)	65 (73)
High risk (high/very high), n (%)	24 (27)
<i>R-IPSS risk group</i>	
Low risk (very good/good/intermediate), n (%)	77 (86)
High risk (high/very high), n (%)	13 (14)
<i>IPSS cytogenetics</i>	
Low risk, n (%)	64 (71.1)
Intermediate risk, n (%)	15 (16.7)
High risk, n (%)	11 (12.2)
<i>IPSS-R cytogenetics</i>	
Very good, n (%)	5 (5.6)
Good, n (%)	62 (68.9)
Intermediate, n (%)	16 (17.8)
Poor, n (%)	1 (1.1)
Very poor, n (%)	6 (6.7)
AML evolution, n (%)	23 (26)
<i>Treatment</i>	
Best supportive care, n (%)	81 (90)
Azacitidine, n (%)	4 (4.5)
Allo-SCT, n (%)	4 (4.5)
Chemotherapy plus allo-SCT, n (%)	1 (1)

MDS: myelodysplastic syndrome; WHO: World Health Organization; RCUD: refractory cytopenia with unilineage dysplasia; RA: refractory anemia; RARS: refractory anemia with ring sideroblasts; 5q-: MDS with isolated deletion of 5q; RCMD: refractory cytopenia with multilineage dysplasia; MDS-U: MDS unclassifiable; RAEB: refractory anemia with excess of blasts; Allo-SCT: allogeneic stem cell transplantation; IPSS: International Prognostic Scoring System; IPSS-R: Revised IPSS; WPSS: WHO classification-based Prognostic Scoring System.

^a N=89: WPSS not applicable in MDS-U.

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; OS) or progression to acute myeloid leukemia (leukemia-free survival; LFS) and compared using the log-rank test. Spearman or Pearson Correlation Coefficients to assess if any variable was associated with the 5-mC or 5-hmC levels was also utilized. We used the MaxStat package of R (Maximally selected Rank Statistics) to determine a cut-off value to dichotomize the continuous variables 5-mC and 5-hmC percentage. Using the identified cutoffs, we divided the patients in two groups of high or low levels of global 5-mC or 5-hmC. Multivariate analysis was performed (Cox model) to assess the independent impact of the variables that showed significance in the univariate analysis.

3. Results

All 90 patients were evaluable for the variables composing the IPSS, IPSS-R and WPSS (cytogenetics, bone marrow blasts, hemoglobin levels, neutrophil count, platelet count, transfusion requirement and WHO classification). The majority of patients belonged to the low risk categories of those prognostic scores (see Table 1). We evaluated classical clinical factors associated with a prognostic impact in terms of OS and LFS using univariate survival analysis (Kaplan–Meier; log-Rank test) and found

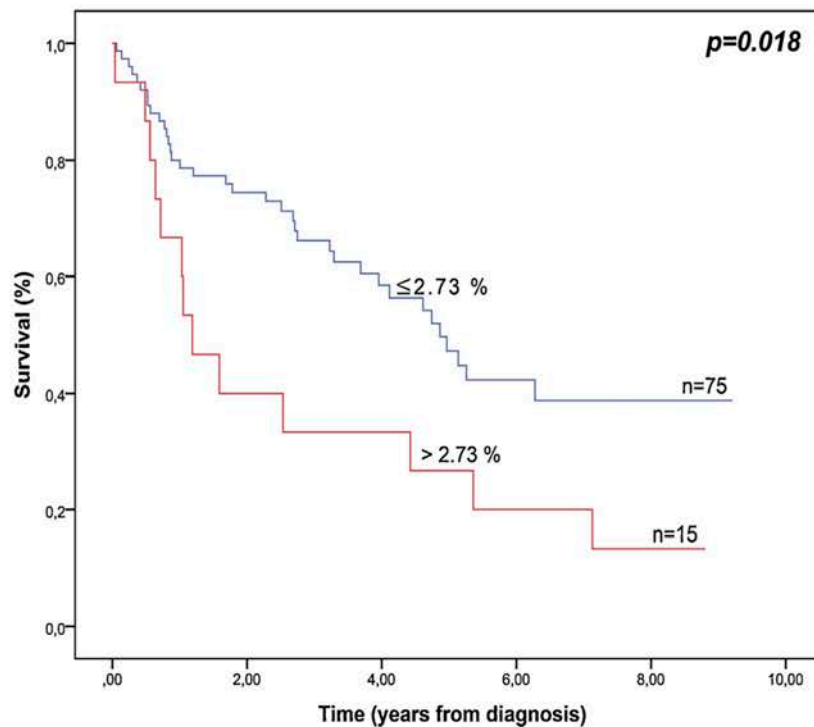


Fig. 1. Overall survival of MDS patients according to global DNA methylation. Patients with 5-mC percentage above 2.73% ($n=15$; red line) had a shorter median overall survival than those with lower levels ($n=75$; blue line) (median 1.19 vs. 4.87 years; $P=0.018$). (For interpretation of reference to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

that bone marrow blasts $\geq 5\%$ ($P<0.001$; $P<0.001$), bone marrow blasts $\geq 10\%$ ($P<0.001$; $P<0.001$), IPSS cytogenetics ($P<0.001$; $P=0.001$), IPSS-R cytogenetics ($P<0.001$; $P<0.001$), IPSS ($P<0.001$; $P<0.001$), IPSS-R ($P<0.001$; $P<0.001$), WPSS ($P<0.001$; $P<0.001$), transfusion requirement ($P=0.001$; $P=0.048$) and neutrophil count $<0.8 \times 10^9/L^*$ ($P<0.001$; $P<0.001$) were significantly associated with a worse OS and LFS, respectively. On the other hand, age ≥ 65 years ($P=0.021$) and hemoglobin $<100 g/L^*$ ($P=0.009$) showed a significantly adverse impact in terms of OS, but not in LFS. Platelets $<100 \times 10^9/L^*$ were not significantly associated with a worse OS or LFS (*cut-off value as defined in the IPSS-R).

3.1. Prognostic impact of global DNA methylation and hydroxymethylation

In our series global methylation levels were higher than the global hydroxymethylation levels. The mean of the global DNA methylation percentage was 2.29% (range 1.28–3.10%) and the mean of 5-hmC percentage was 0.15% (range 0.01–0.82%). Using the MaxStat package, we estimated a significant cut-off point in terms of OS for the percentage of 5-mC: 2.73%, near the 75th percentile, selecting 15 patients with global 5-mC levels above that percentage. The low-methylated group showed a mean of 2.16%, in comparison to the 2.94% in the higher one. We could not obtain an optimal cut-off value for the 5-hmC percentage with statistical significance for the OS or LFS.

Patients with a 5-mC percentage in total DNA of 2.73% or below had a better OS than those with more methylated DNA (median 4.87 vs. 1.19 years) ($P=0.018$; Fig. 1). On the other hand, we observed a positive trend in terms of LFS ($P=0.084$). By using Cox regression which included age, gender, 5-mC above 2.73%, transfusion requirement and high risk IPSS (Intermediate 2 or High), we found that these variables were independently associated with a worse outcome except for gender (Table 2).

Table 2

Multivariate analysis of variables related to overall survival.

Variable	P	ORR (95% CI)
Age	0.017	1.042 (1.007–1.078)
Gender	0.451	–
5-mC % > 2.73%	0.039	2.011 (1.036–3.903)
Transfusion requirement	0.035	1.913 (1.046–3.497)
High risk categories of IPSS	<0.001	4.167 (1.977–8.783)

Further analysis, after censoring patients at time of allogeneic transplant ($n=4$) or at time of receiving azacitidine ($n=4$) or intensive chemotherapy ($n=1$), showed that patients with the highest methylation levels had a shorter OS (median 5.04 vs. 2.57 years) ($P=0.040$; Fig. 2) and LFS ($P=0.019$; Fig. 3). The new estimated cut-off point for the 5-mC percentage was 2.7%, which was very close to the prior value. The significance of this variable was retained in the multivariate analysis (Table 3). It is of note that after censoring patients the transfusion requirement maintained

Table 3

Multivariate analysis of variables related to overall survival (A) and leukemia-free survival (B).

Variable	P	ORR (95% CI)
A		
Age	0.002	1.063 (1.023–1.105)
Gender	0.344	–
5-mC % > 2.7%	0.042	2.042 (1.025–4.070)
Transfusion requirement	0.098	–
High risk categories of IPSS	0.001	4.439 (1.916–10.287)
B		
Age	0.346	–
Gender	0.106	–
5-mC % > 2.7%	0.007	3.883 (1.443–10.450)
Transfusion requirement	0.708	–
High risk categories of IPSS	<0.001	7.993 (2.526–25.287)

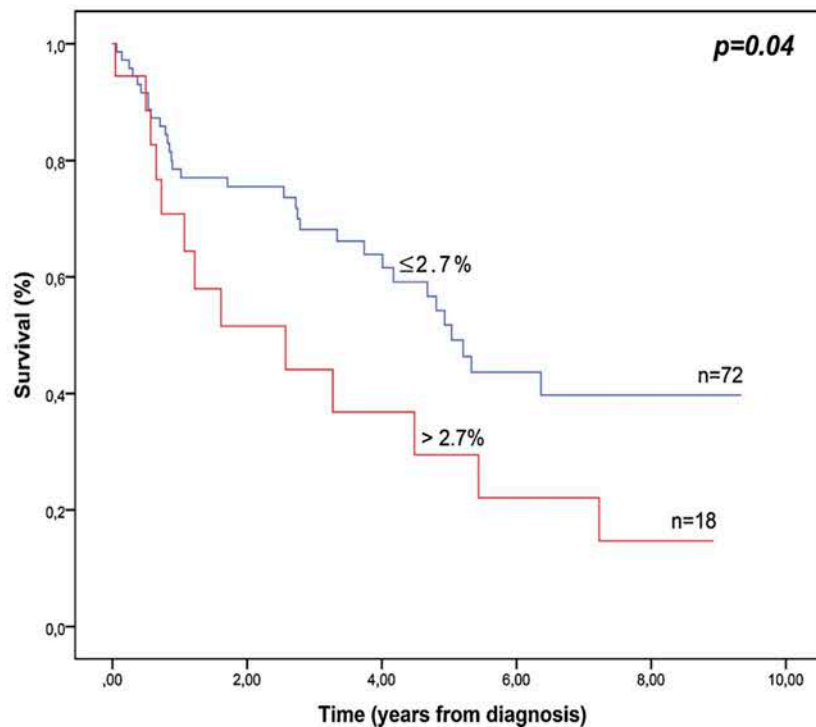


Fig. 2. Overall survival of MDS patients according to global DNA methylation (9 patients were censored at time of receiving azacitidine, intensive chemotherapy or an allogeneic transplant). Patients with 5-mC percentage above 2.7% ($n = 18$; red line) had a shorter median overall survival than those with lower levels ($n = 72$; blue line) (median 2.57 vs. 5.04 years; $P = 0.04$). (For interpretation of reference to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

its statistical significance in terms of OS ($P = 0.001$) but not in terms of LFS ($P = 0.152$).

It is remarkable that the low-risk MDS patients defined by the IPSS ($n = 77$), WPSS ($n = 65$) and IPSS-R ($n = 77$) with 5-mC percentage in total DNA above 2.73% had a shorter OS than those

with lower levels of methylated DNA (IPSS: median 1.59 vs. 5.26 years, $P = 0.032$; WPSS: median 2.53 vs. 6.28 years, $P = 0.023$; R-IPSS: median 1.59 vs. 5.26 years, $P = 0.031$) (Fig. 4). If validated in larger series of patients, this finding would support the measurement of global DNA methylation by increasing the discriminative power of

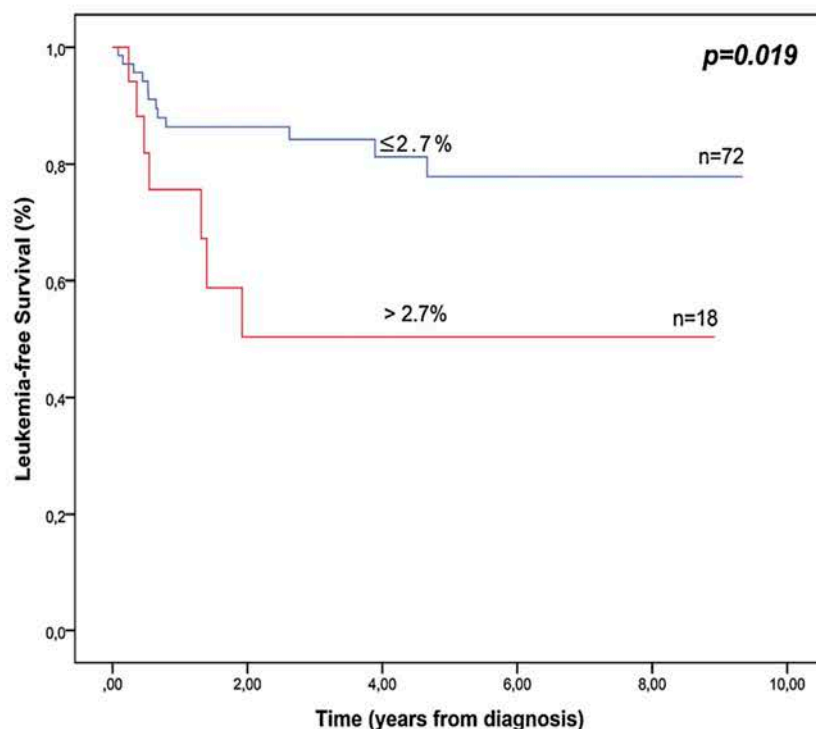


Fig. 3. Leukemia-free survival of MDS patients according to global DNA methylation (9 patients were censored at time of receiving azacitidine, intensive chemotherapy or an allogeneic transplant). Patients with 5-mC percentage above 2.7% ($n = 18$; red line) had a shorter leukemia-free survival than those with lower levels ($n = 72$; blue line) ($P = 0.019$). (For interpretation of reference to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

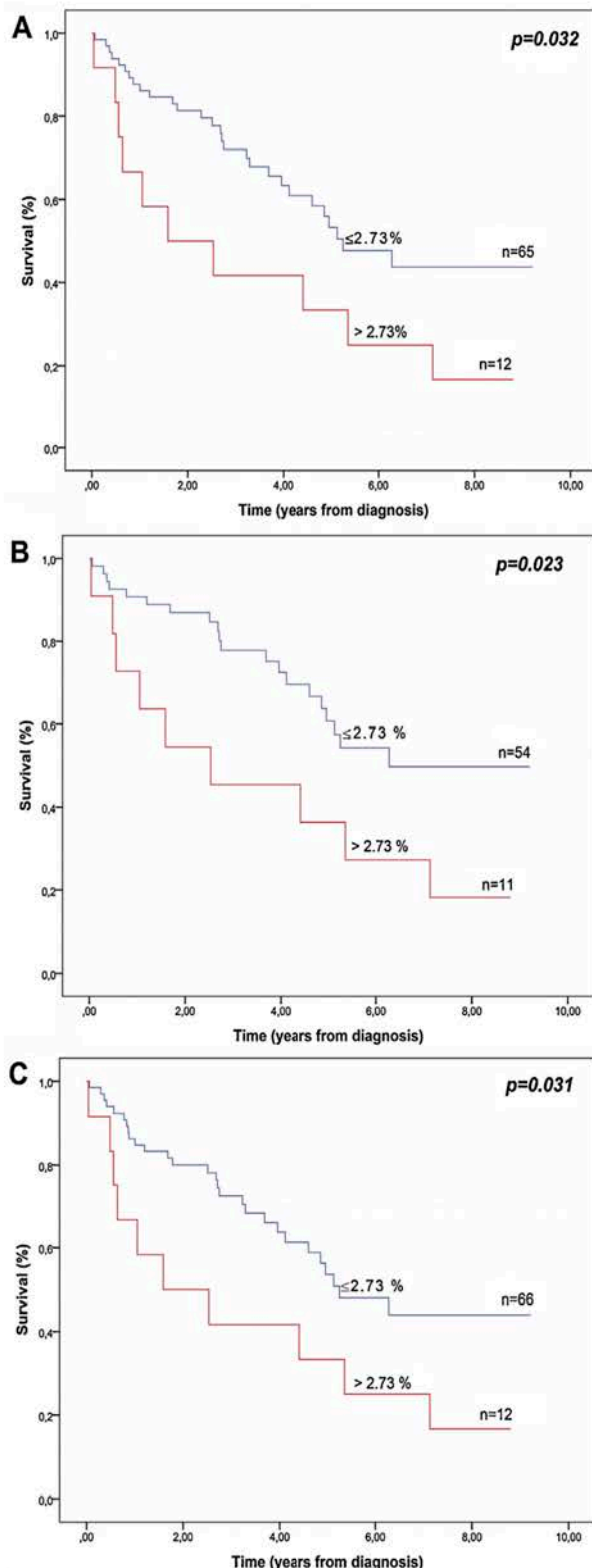


Fig. 4. Overall survival of low-risk MDS patients according to global DNA methylation. Patients were classified by the IPSS (A), WPSS (B) and IPSS-R (C). The low-risk MDS patients with 5-mC percentage above 2.73% (A: $n=12$, B: $n=11$, C: $n=12$; red line) had a shorter median overall survival than those with lower levels (A: $n=65$, B: $n=54$, C: $n=66$; blue line) (A: median 1.59 vs. 5.26 years, $P=0.032$; B: median 2.53 vs. 6.28 years, $P=0.023$; C: median 1.59 vs. 5.26 years, $P=0.031$). (For interpretation of reference to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

prognostic scoring systems to detect low-risk MDS patients with high risk features.

No significant correlation was found between the 5-mC or the 5-hmC levels and the other classical prognostic factors studied (bone marrow blasts, IPSS, IPSS-R, WPSS, cytogenetic groups defined by the IPSS or IPSS-R, transfusion requirement and cytopenias), showing that the methylation and the hydroxymethylation status were not a surrogate marker of any of these variables in our series (Table 4). In addition, a significant association between the number of cytogenetic alterations and the 5-mC percentage in total DNA was not observed.

4. Discussion

In this study, global DNA methylation and hydroxymethylation using specific antibodies against 5-mC and 5-hmC from bone marrow samples of 90 de novo MDS patients at time of diagnosis was investigated. Later on the association between global DNA methylation and hydroxymethylation and clinical outcome was studied.

We found that patients with the highest levels of global DNA methylation had a shorter OS. Moreover after censoring patients at time of receiving disease-modifying treatments, we also observed a shorter LFS. In addition, a multivariate analysis showed that age, high risk categories of IPSS, transfusion requirement and high levels of global DNA methylation were independent adverse prognostic factors. Furthermore, it was also observed that the low-risk MDS patients defined by the IPSS, WPSS and IPSS-R with the highest levels of global DNA methylation had a shorter OS than those with lower levels of methylated DNA. This finding indicates that the measurement of global DNA methylation could increase the discriminative power of prognostic scoring systems to detect low-risk MDS patients with high risk features.

The majority of published data reported the methylation status of single genes [24–27] or combination of multiple genes [28,29] but there is a paucity of studies investigating the outcome of patients in relation to their global methylation status [30]. For instance, the methylation of the suppressor gene $p15^{INK4B}$ has been associated with a shorter OS in a univariate analysis [25,26], and the combination of promoter methylation of $p15^{INK4B}$, HIC1, CDH1 and ER α genes were higher in advanced disease and predicted a poor prognosis in early-stage MDS [28]. Recently, Poloni et al. [30] found that high levels of global DNA methylation detected by immunohistochemistry (anti-5mC antibodies) of the bone marrow trephine biopsies was an independent adverse prognostic factor. To the best of our knowledge, this and the present study are the only ones showing these findings. The bisulfite-based methods are the most commonly used to investigate the DNA methylation status and different approaches based on these have been used to study the global DNA methylation [34]. Of these, the most commonly accepted as a proxy marker of genome-wide methylation was methylation of the repetitive LINE1 sequences [35]. This assay is less labor intensive and requires less DNA than the previous non PCR-based methods, but as other bisulfite-based assays, LINE1 is not capable to discriminate between 5-mC and 5-hmC [36]. Moreover, since there is no specific data regarding whether the mechanisms that control methylation of repetitive elements may differ from the rest of the genome, this assay might not be a perfect representation of total genomic methylation [35]. It is noteworthy that the present results have been obtained by a fast and inexpensive assay (ELISA) capable of distinguishing between 5-mC and 5-hmC. The main problem of the used method is that it has not been compared with other well established assays used to determine the global DNA methylation. However, if this test could be compared with these other methods and applied in prospective studies or larger series of patients, it would strengthen the value of this assay as a new prognostic tool in clinical practice.

Table 4
Correlation analysis between classical prognostic factors in MDS and the 5-mC or 5-hmC levels.

Variable ^a	5-mC%	5-hmC%
IPSS	Spearman: 0.009 <i>p</i> = 0.931 Mean of 5-mC (low risk): 2.28 Mean of 5-mC (high risk): 2.33 <i>t</i> -test(<i>p</i> value): 0.730	Spearman: -0.194 <i>p</i> = 0.066 Mean of 5-hmC (low risk): 0.15 Mean of 5-hmC (high risk): 0.14 <i>t</i> -test(<i>p</i> value): 0.757
IPSS-R	Spearman: 0.015 <i>p</i> = 0.890 Mean of 5-mC (low risk): 2.29 Mean of 5-mC (high risk): 2.30 <i>t</i> -test(<i>p</i> value): 0.954	Spearman: 0.029 <i>p</i> = 0.786 Mean of 5-hmC (low risk): 0.15 Mean of 5-hmC (high risk): 0.13 <i>t</i> -test(<i>p</i> value): 0.244
WPSS	Spearman: 0.028 <i>p</i> = 0.791 Mean of 5-mC (low risk): 2.28 Mean of 5-mC (high risk): 2.30 <i>t</i> -test(<i>p</i> value): 0.820	Spearman: -0.079 <i>p</i> = 0.461 Mean of 5-hmC (low risk): 0.15 Mean of 5-hmC (high risk): 0.14 <i>t</i> -test(<i>p</i> value): 0.524
IPSS cytogenetics	Spearman: 0.039 <i>p</i> = 0.715 Mean of 5-mC (low risk): 2.27 Mean of 5-mC (high risk): 2.44 <i>t</i> -test(<i>p</i> value): 0.269	Spearman: -0.035 <i>p</i> = 0.742 Mean of 5-hmC (low risk): 0.15 Mean of 5-hmC (high risk): 0.14 <i>t</i> -test(<i>p</i> value): 0.794
IPSS-R cytogenetics	Spearman: 0.059 <i>p</i> = 0.580 Mean of 5-mC (low risk): 2.28 Mean of 5-mC (high risk): 2.38 <i>t</i> -test(<i>p</i> value): 0.624	Spearman: 0.067 <i>p</i> = 0.532 Mean of 5-hmC (low risk): 0.15 Mean of 5-hmC (high risk): 0.145 <i>t</i> -test(<i>p</i> value): 0.857
Platelet count	Pearson: 0.060 <i>p</i> = 0.576 Mean of 5-mC ($\geq 100 \times 10^9/L$): 2.30 Mean of 5-mC ($< 100 \times 10^9/L$): 2.25 <i>t</i> -test(<i>p</i> value): 0.639	Pearson: 0.090 <i>p</i> = 0.399 Mean of 5-hmC ($\geq 100 \times 10^9/L$): 0.15 Mean of 5-hmC ($< 100 \times 10^9/L$): 0.13 <i>t</i> -test(<i>p</i> value): 0.333
Neutrophil count	Pearson: 0.015 <i>p</i> = 0.886 Mean of 5-mC ($\geq 0.8 \times 10^9/L$): 2.30 Mean of 5-mC ($< 0.8 \times 10^9/L$): 2.26 <i>t</i> -test(<i>p</i> value): 0.744	Pearson: 0.012 <i>p</i> = 0.907 Mean of 5-hmC ($\geq 0.8 \times 10^9/L$): 0.14 Mean of 5-hmC ($< 0.8 \times 10^9/L$): 0.20 <i>t</i> -test(<i>p</i> value): 0.221
Hb levels	Pearson: 0.101 <i>p</i> = 0.343 Mean of 5-mC ($\geq 100 g/L$): 2.31 Mean of 5-mC ($< 100 g/L$): 2.26 <i>t</i> -test(<i>p</i> value): 0.612	Pearson: -0.2 <i>p</i> = 0.059 Mean of 5-hmC ($\geq 100 g/L$): 0.14 Mean of 5-hmC ($< 100 g/L$): 0.16 <i>t</i> -test(<i>p</i> value): 0.326
BM blasts	Pearson: 0.137 <i>p</i> = 0.199 Mean of 5-mC ($\geq 10\%$): 2.44 Mean of 5-mC ($< 10\%$): 2.27 <i>t</i> -test(<i>p</i> value): 0.226	Pearson: -0.038 <i>p</i> = 0.725 Mean of 5-hmC ($\geq 10\%$): 0.13 Mean of 5-hmC ($< 10\%$): 0.15 <i>t</i> -test(<i>p</i> value): 0.387
Transfusion requirement	Mean of 5-mC (TR): 2.24 Mean of 5-mC (No TR): 2.33 <i>t</i> -test(<i>p</i> value): 0.362	Mean of 5-hmC (TR): 0.16 Mean of 5-hmC (No TR): 0.14 <i>t</i> -test(<i>p</i> value): 0.254

Abbreviations: MDS: myelodysplastic syndrome; IPSS: International Prognostic Scoring System; IPSS-R: Revised IPSS; WPSS: WHO classification-based Prognostic Scoring System; Hb: hemoglobin; BM: bone marrow; 5-mC %: 5-methylcytosine percentage in total DNA; 5-hmC %: 5-hydroxymethylcytosine percentage in total DNA; TR: transfusion requirement.

Statistical methods: (a) Pearson: Pearson correlation coefficient; (b) Spearman: Spearman correlation coefficient; (c) *t*-test: Student's *t*-test.

^a No significant association between the 5-mC or the 5-hmC levels and the classical prognostic factors was found.

Although there is few data investigating the association of single methylated genes or combination of genes and the probability of response to the DNA methyltransferase inhibitors [29], there are no studies showing if the global DNA methylation or hydroxymethylation status at diagnosis can be predictive of clinical response to hypomethylating agents. Folio et al. [37] showed that the phosphoinositide-phospholipase (PI-PL)Cbeta1 promoter is hypermethylated in high-risk MDS patients, and that the amount of PI-PLCbeta1 mRNA could predict the clinical response to azacitidine. Shen et al. [29] observed that reduced methylation over the course of treatment was associated with a better response to decitabine, however, they found no association between the response to decitabine and the methylation levels at baseline. It would be interesting to assess if global DNA methylation or hydroxymethylation at baseline could be predictive of response to hypomethylating agents.

On the other hand, the levels of global DNA hydroxymethylation had no prognostic impact in our series. The hypomethylating agents are the only treatment capable of significantly prolonging survival in high-risk MDS [32] by inducing direct cytotoxicity and global hypomethylation. Hydroxymethylation consists of adding a hydroxyl group at the 5' end of 5-mC and has been described as a passive DNA demethylation process inducing gene reexpression [20,23]. The transmission of methylation patterns from the parental cells to the daughter cells are lost due to this mechanism because DNA methyltransferases are not capable to recognize the hydroxymethylated DNA strands [38]. The conversion of 5-mC into 5-hmC, also called the "sixth base", is mediated by the ten-eleven translocation (TET) family of 5-mC hydroxylases, including TET1, 2 and 3 giving a new insight to the epigenetic regulation of DNA methylation [20–22]. In addition isocitrate dehydrogenases (IDHs) play a crucial role in the formation of the 5-hmCs catalyzing the oxidative decarboxylation of isocitrate producing α -ketoglutarate (α -KG) that is a cofactor of TET proteins required in the conversion of 5-mC into 5-hmC [39]. The gain-of-function mutations of IDH-1 or IDH-2 produce the metabolite 2-hydroxyglutarate (2-HG) which inhibits the TET-mediated conversion of 5-mC into 5-hmC acting as an antagonist of its cofactor, α -KG [40].

If as proposed, hydroxymethylation is a really passive demethylation process, we could expect that patients with the highest levels of hydroxymethylation would have a better outcome, nevertheless this fact was not found. Firstly it was believed that TET2 mutation had an independent good prognosis [41], however, this has not been confirmed in later studies [42]. TET2 mutational inactivation implies a decrease in the 5-hmC levels [31,43–45], therefore, according to the above mentioned it would be at least questionable that suppressed levels of 5-hmC would represent a feature of good prognosis. Liu et al. [31] showed that decreased 5-hmC levels are associated with TET2 mutation and, in contrast to the present study, they observed an unfavorable OS in the group of patients with lower 5-hmC levels. To the extent of our knowledge, this is the only study reporting that the reduction of hydroxymethylation levels implies a bad prognosis. Recently, it has been reported that "loss of 5-hmC" is an epigenetic hallmark of melanoma and that down regulation of IDH2 and TET family enzymes is more likely to be one of the mechanisms underlying 5-hmC loss [46]. Therefore, it is necessary to continue investigating the real biological meaning of the "sixth base".

In conclusion, the results shown in the present study may support the use of this feasible and inexpensive assay as a new prognostic tool in MDS. However, further studies would be necessary to corroborate these findings. According to our study, this assay could have a special interest for detecting low-risk MDS patients with high risk features. Furthermore, it would also be interesting to investigate if global DNA methylation at baseline, and specially

hydroxymethylation, could predict the response to hypomethylating agents.

Author contributions

X.C. designed the study, collected and analyzed data, performed the assays and statistical analysis and wrote the paper; M.N., D.C. and A.P. collected data, performed statistical analysis and reviewed the paper; A.N. performed the assays and statistical analysis; R.T. and C.M. performed the assays; O.P. collected data; R.M.R., M.M. and J.E. analyzed data and reviewed the paper; B.N. designed the study, analyzed data and reviewed the paper.

Conflict of interest statement

The authors declare no competing financial interests.

Acknowledgement

This work has been supported by the "Emili Letang" Grant (2011) from Hospital Clínic of Barcelona.

References

- [1] Tefferi A, Vardiman JW. Mechanisms of disease – myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* 2009;361:1872–85.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Córdoba I, González-Porras 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.
- [8] González-Porras JR, Córdoba 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.
- [9] Della Porta MG, Malcovati L, Boveri E, Travaglini 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.
- [10] Guías españolas de diagnóstico y tratamiento de los síndromes mielodisplásicos y la leucemia mielomonocítica crónica. Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos (GESMD), Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH). *Haematologica/edición española* 2012;97(Suppl. 5):11–4.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] Malcovati L, Papaemmanuil E, Bowen DT, Boultonwood J, Della Porta MG, Pascutto C, et al. Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2011;118(24):6239–46.
- [14] Graubert T, Walter MJ. Genetics of myelodysplastic syndromes: new insights. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program* 2011;2011:543–9.
- [15] Graubert TA, Shen D, Ding L, Okeyo-Owuor T, Lunn CL, Shao J, et al. Recurrent mutations in the U2AF1 splicing factor in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet* 2012;44(1):53–7.
- [16] 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.

- [17] Makishima H, Visconte V, Sakaguchi H, Jankowska AM, Abu Kar S, Jerez A, et al. Mutations in the spliceosome machinery, a novel and ubiquitous pathway in leukemogenesis. *Blood* 2012;119(14):3203–10.
- [18] Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003;349(21):2042–54.
- [19] Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002;3(6):415–28.
- [20] Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 2009;324(5929):930–5.
- [21] Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* 2010;466(7310):1129–33.
- [22] Zhang H, Zhang X, Clark E, Mulcahey M, Huang S, Shi YG. TET1 is a DNA-binding protein that modulates DNA methylation and gene transcription via hydroxylation of 5-methylcytosine. *Cell Res* 2010;20(12):1390–3.
- [23] Guo JU, Su Y, Zhong C, Ming GL, Song H. Emerging roles of TET proteins and 5-hydroxymethylcytosines in active DNA demethylation and beyond. *Cell Cycle Georget Tex* 2011;10(16):2662–8.
- [24] Lin J, Yao D, Qian J, Wang YL, Han LX, Jiang YW, et al. Methylation status of fragile histidine triad (FHIT) gene and its clinical impact on prognosis of patients with myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 2008;32(10):1541–5.
- [25] Quesnel B, Guillermin R, Vereecque R, Wattel E, Preudhomme C, Bauters F, et al. Methylation of the p15(INK4b) gene in myelodysplastic syndromes is frequent and acquired during disease progression. *Blood* 1998;91(8):2985–90.
- [26] Tien HF, Tang JH, Tsay W, Liu MC, Lee FY, Wang CH, et al. Methylation of the p15(INK4B) gene in myelodysplastic syndrome: it can be detected early at diagnosis or during disease progression and is highly associated with leukaemic transformation. *Br J Haematol* 2001;112(1):148–54.
- [27] Wu SJ, Yao M, Chou WC, Tang JL, Chen CY, Ko BS, et al. Clinical implications of SOCS1 methylation in myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 2006;135(3):317–23.
- [28] Aggerholm A, Holm MS, Guldberg P, Olesen LH, Hokland P. Promoter hypermethylation of p15INK4B, HIC1, CDH1, and ER is frequent in myelodysplastic syndrome and predicts poor prognosis in early-stage patients. *Eur J Haematol* 2006;76(1):23–32.
- [29] Shen L, Kantarjian H, Guo Y, Lin E, Shan J, Huang X, et al. DNA methylation predicts survival and response to therapy in patients with myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 2010;28(4):605–13.
- [30] Poloni A, Goteri G, Zizzi A, Serrani F, Trappolini S, Costantini B, et al. Prognostic role of immunohistochemical analysis of 5 mc in myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol* 2013;91(3):219–27.
- [31] Liu X, Guangsen Z, Yi Y, Xiao L, Pei M, Liu S, et al. Decreased 5-hydroxymethylcytosine levels are associated with TET2 mutation and unfavorable overall survival in myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphom* 2013 [Epub ahead of print, March 27, 2013].
- [32] Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol* 2009;10(3):223–32.
- [33] R: a language and environment for statistical computing. Vienna Austria: Computing RFFS; 2008. <http://www.R-project.org>
- [34] Grønbaek K, Müller-Tidow C, Perini G, Lehmann S, Bach Treppendahl M, Mills K, et al. A critical appraisal of tools available for monitoring epigenetic changes in clinical samples from patients with myeloid malignancies. *Haematologica* 2012;97(9):1380–8.
- [35] Yang AS, Estéicio MR, Doshi K, Kondo Y, Tajara EH, Issa JP. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucl Acids Res* 2004;32(3):e38.
- [36] Huang Y, Pastor WA, Shen Y, Tahiliani M, Liu DR, Rao A. The behaviour of 5-hydroxymethylcytosine in bisulfite sequencing. *PLoS ONE* 2010;5(1):e8888.
- [37] Folio MY, Russo D, Finelli C, Mongiorgi S, Clissa C, Fili C, et al. Epigenetic regulation of nuclear PI-PLCbeta1 signaling pathway in low-risk MDS patients during azacitidine treatment. *Leukemia* 2012;26(5):943–50.
- [38] Valinluck V, Sowers LC. Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer Res* 2007;67(3):946–50.
- [39] Reitman ZJ, Jin G, Karoly ED, Spasojevic I, Yang J, Kinzler KW, et al. Profiling the effects of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations on the cellular metabolome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108(8):3270–5.
- [40] Xu W, Yang H, Liu Y, Yang Y, Wang P, Kim SH, et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell* 2011;19(1):17–30.
- [41] Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Cheok M, Grabar S, Della-Valle V, Picard F, et al. TET2 mutation is an independent favorable prognostic factor in myelodysplastic syndromes (MDSs). *Blood* 2009;114(15):3285–91.
- [42] Smith AE, Mohamedali AM, Kulasekararaj A, Lim Z, Gäken J, Lea NC, et al. Next-generation sequencing of the TET2 gene in 355 MDS and CMML patients reveals low-abundance mutant clones with early origins, but indicates no definite prognostic value. *Blood* 2010;116(19):3923–32.
- [43] 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.
- [44] Langemeijer SM, 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.
- [45] Ko M, Huang Y, Jankowska AM, Pape UJ, Tahiliani M, Bandukwala HS, et al. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature* 2010;468(7325):839–43.
- [46] Lian CG, Xu Y, Ceol C, Wu F, Larson A, Dresser K, et al. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma. *Cell* 2012;150(6):1135–46.

Segon Treball

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

Resum

La classificació de l'OMS de les SMD es basa fonamentalment en el percentatge de blasts a MO. Aquest es considera en base a la cel·lularitat medul·lar total, excepte quan s'observa predominança eritroide, és a dir, quan els eritroblasts suposen el 50% o més de la cel·lularitat medul·lar. En aquest supòsit s'ha de realitzar el recompte de blasts de la cel·lularitat no eritroide (CNE) i si el percentatge és igual o superior al 20% s'hi estableix el diagnòstic d'eritroleucèmia, i si per contra el percentatge és inferior al 20% s'hi estableix el de SMD. En aquest últim cas, el percentatge de blasts ha d'ésser referit respecte de la cel·lularitat total.

S'avaluà el percentatge medul·lar de blasts respecte de la cel·lularitat total i de la CNE en 3692 pacients amb SMD del Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos (GESMD), 465 dels quals presentaven predominança eritroide (SMD-E). S'analitzà la rellevància d'ambdues quantificacions en la classificació i el pronòstic dels pacients. En considerar el percentatge de blasts respecte de la CNE, un 22% de pacients amb SMD-E classificats en categories sense excés de blasts foren reclassificats en categories amb excés de blasts i presentaren una pitjor supervivència global que els pacients que varen romandre en les categories inicials ($P=0,006$). A la nostra sèrie de pacients amb SMD-E no va ser possible establir el diagnòstic d'AREB-2, ja que seguint les recomanacions de l'OMS, els pacients amb un 50% o més d'eritroblasts i un 10-19% de blasts a MO foren diagnosticats d'eritroleucèmia. No vàrem detectar pacients amb menys d'un 10% de blasts a MO que presentessin un 5-19% de blasts a SP o blasts amb bastons d'Auer. No obstant, en realitzar el recompte de blasts de la CNE, 72 pacients foren recodificats com AREB-2 i mostraren una menor supervivència que les AREB-1 sense predominança eritroide de la sèrie global. De la mateixa manera, els pacients amb SMD-E recodificats com AREB-2 en base a la CNE presentaren una menor supervivència que les AREB-1 recodificades. És interessant destacar que totes les AREB-1 amb predominança

eritroide foren recodificades a AREB-2 quan es calculà el seu percentatge de blasts respecte de la CNE i que per tant, les noves AREB-1 recodificades provenien de pacients diagnosticats de SMD-E sense excés de blasts que presentaren un 5-9% de blasts quan es consideraren els blasts de la CNE. Finalment, una altre gran limitació de la recomanació actual de l'OMS era que els pacients amb SMD-E no podien ser adscrits a la categoria d'alt risc de l'IPSS, ja que com hem comentat prèviament, les SMD-E amb 10-19% blasts a MO de la cel·lularitat global foren diagnosticats d'eritroleucèmia i quedaren fora de l'anàlisi. Per contra, en considerar el percentatge medul·lar de blasts de la CNE, l'IPSS separava quatre grups de risc amb diferències significatives de supervivència. A més, un 11% de pacients amb SMD-E classificats en categories de baix risc de l'IPSS (baix, intermedi-1) foren reclassificats a categories d'alt risc (intermedi-2, alt) i presentaren una supervivència significativament menor que el grup del qual provenien. La mediana de supervivència d'aquest grup de pacients era l'esperable en els pacients d'alt risc (mediana estimada de supervivència inferior a 30 mesos). Per tant, enumerar els blasts de la CNE semblava un mètode excel·lent per detectar pacients catalogats de baix risc però amb un pronòstic propi dels pacients d'alt risc. Malgrat que les dades suggerien que l'estratificació pronòstica de les SMD-E podia millorar-se considerant els blasts de la cel·lularitat no eritroide, vàrem analitzar si aquesta estratègia podia servir per millorar l'estratificació de risc de totes les SMD. La mitjana d'eritroblasts a MO de les SMD sense predominança eritroide era d'un 30%, per tant aplicar el recompte de blasts de la CNE només a les SMD-E podria ocasionar un greuge comparatiu amb les SMD sense una expansió de la sèrie eritroide, ja que podríem subestimar-ne el seu percentatge. Realitzar el recompte de blasts de la CNE podria ser un bon mètode per homogeneïtzar el recompte de blasts entre ambdós grups de pacients. De la mateixa manera, quan l'anàlisi s'estengué a la sèrie global de pacients, un 12% de SMD classificats en les categories sense excés de blasts foren reclassificats en categories de major risc i mostraren una menor supervivència global ($P=0,001$). En recalculer l'IPSS considerant els blasts de la CNE un 8,4% de pacients amb SMD classificats en categories de baix risc de l'IPSS foren reclassificats a categories d'alt risc i presentaren una supervivència significativament menor que el grup del qual provenien. Novament, la mediana de

supervivència d'aquest grup de pacients era l'esperable en els pacients d'alt risc. El conjunt de dades exposades suggereixen que considerar el percentatge de blasts de MO respecte de la CNE millora l'avaluació pronòstica dels pacients amb SMD. Aquest fet hauria d'ésser considerat en futures revisions de la classificació de l'OMS.

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 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 de 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. 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@paradesalutmar.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).¹⁻⁵ 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.⁶ 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.^{7,8} 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.¹ 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 χ^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)	P
Median age (range), years	74.09 (26-94)	75.28 (20-101)	.027
< 60, No. (%)	59 (12.7)	361 (11.2)	
≥ 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), μ/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.

Improving Prognostic Evaluation of Myelodysplastic Syndromes

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				
	Low	Intermediate-1	Intermediate-2	High	Total
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 ν 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 ν 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 ≥ 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 ν 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 ν 8.4% upgraded group in the first period; 24% comparator group ν 27.8% upgraded group in the second period; and 66.9% comparator group ν 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

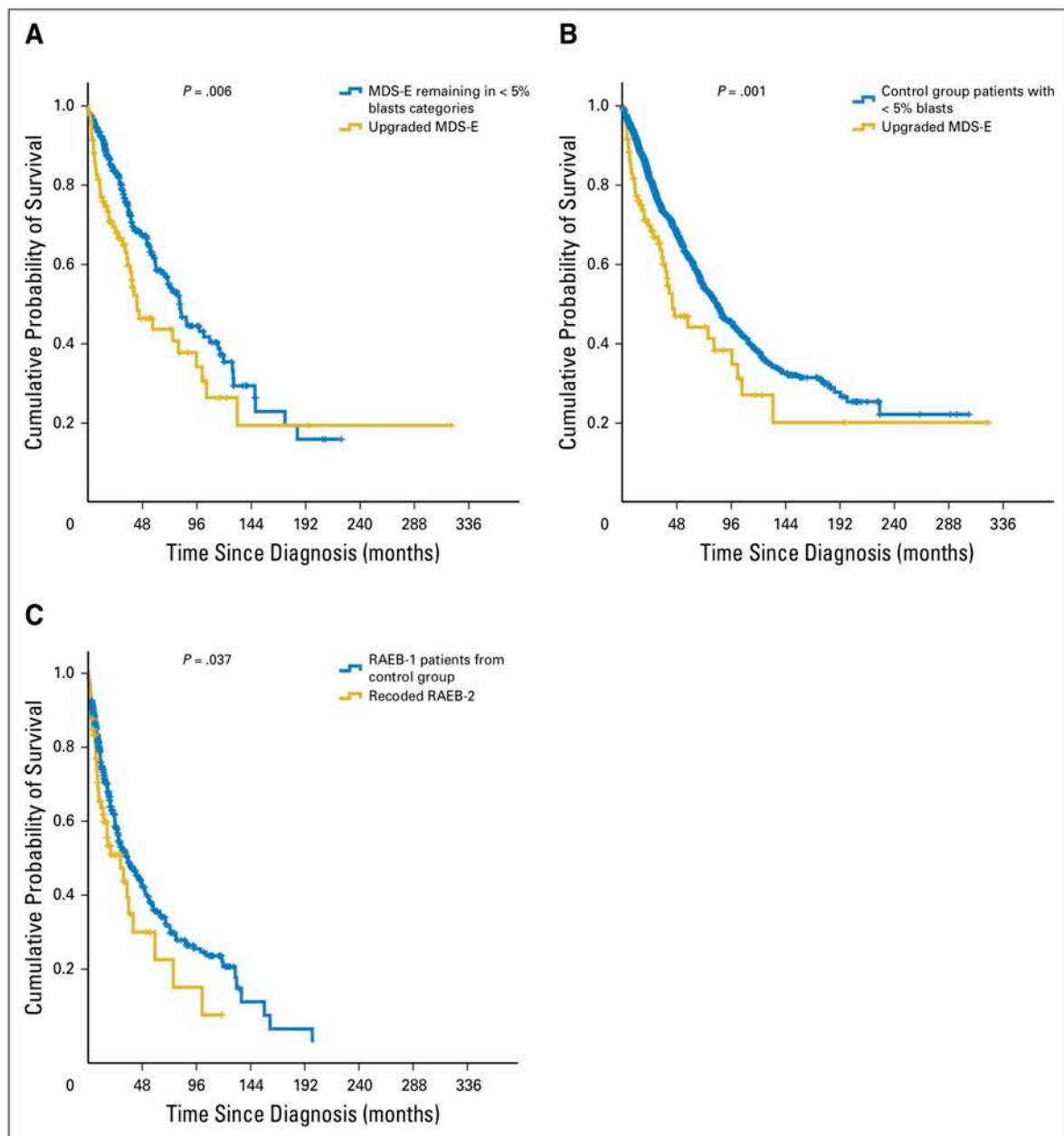


Fig 1. Overall survival (OS) by Kaplan-Meier analysis of patients with myelodysplastic syndromes with $\geq 50\%$ bone marrow (BM) erythroblasts (MDS-E). Of 406 patients, 89 with erythroid hyperplasia and $< 5\%$ BM blast cells in total BM cellularity were reclassified into higher BM blast categories 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.

Improving Prognostic Evaluation of Myelodysplastic Syndromes

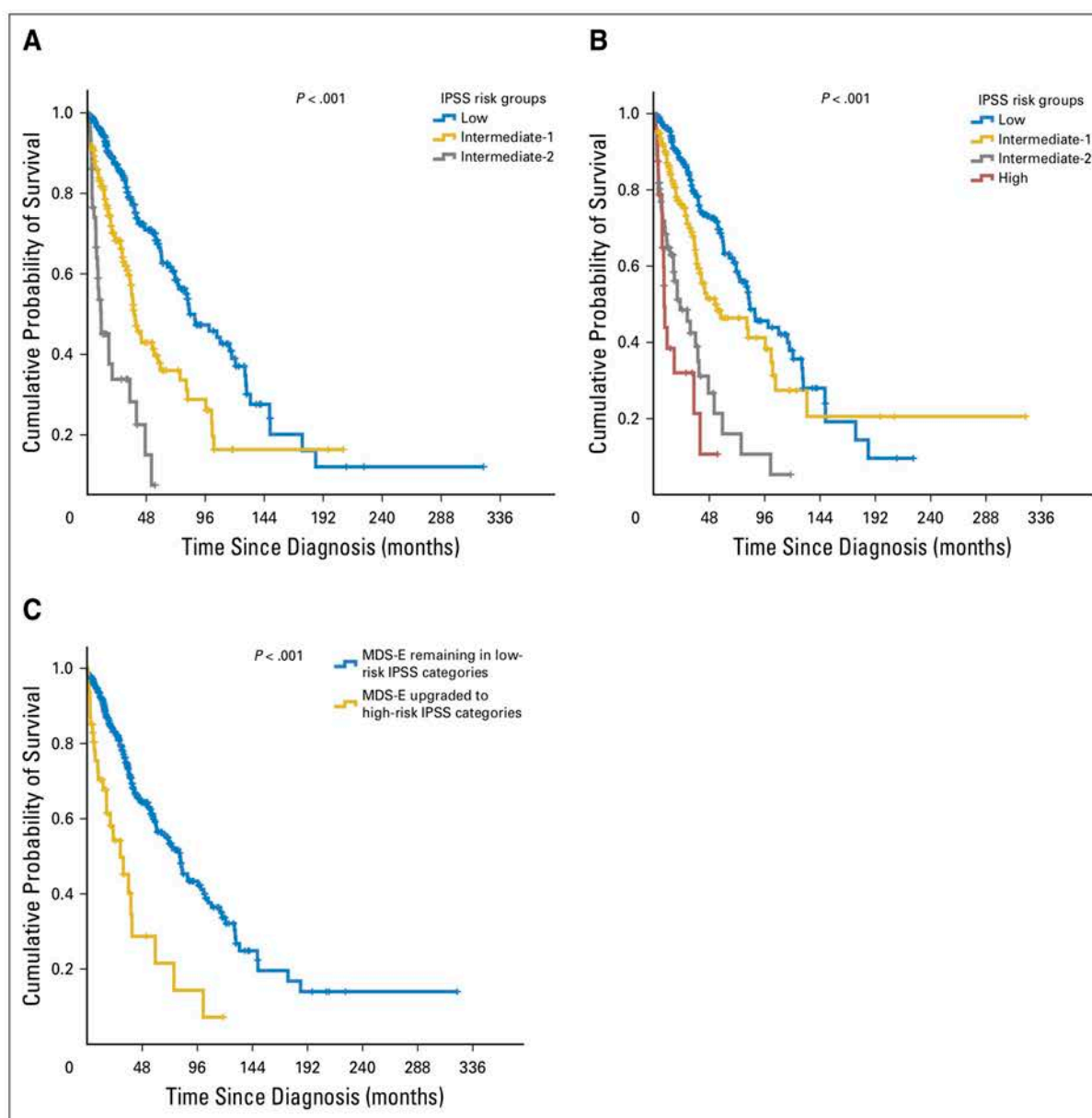


Fig 2. Overall survival (OS) by Kaplan-Meier analysis of patients with myelodysplastic syndromes with $\geq 50\%$ bone marrow (BM) erythroblasts (MDS-E) according to the International Prognostic Scoring System (IPSS). (A) OS by IPSS risk groups enumerating blasts from total BM cellularity. (B) OS by 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 v 80.6 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.^{1,9,10} 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.

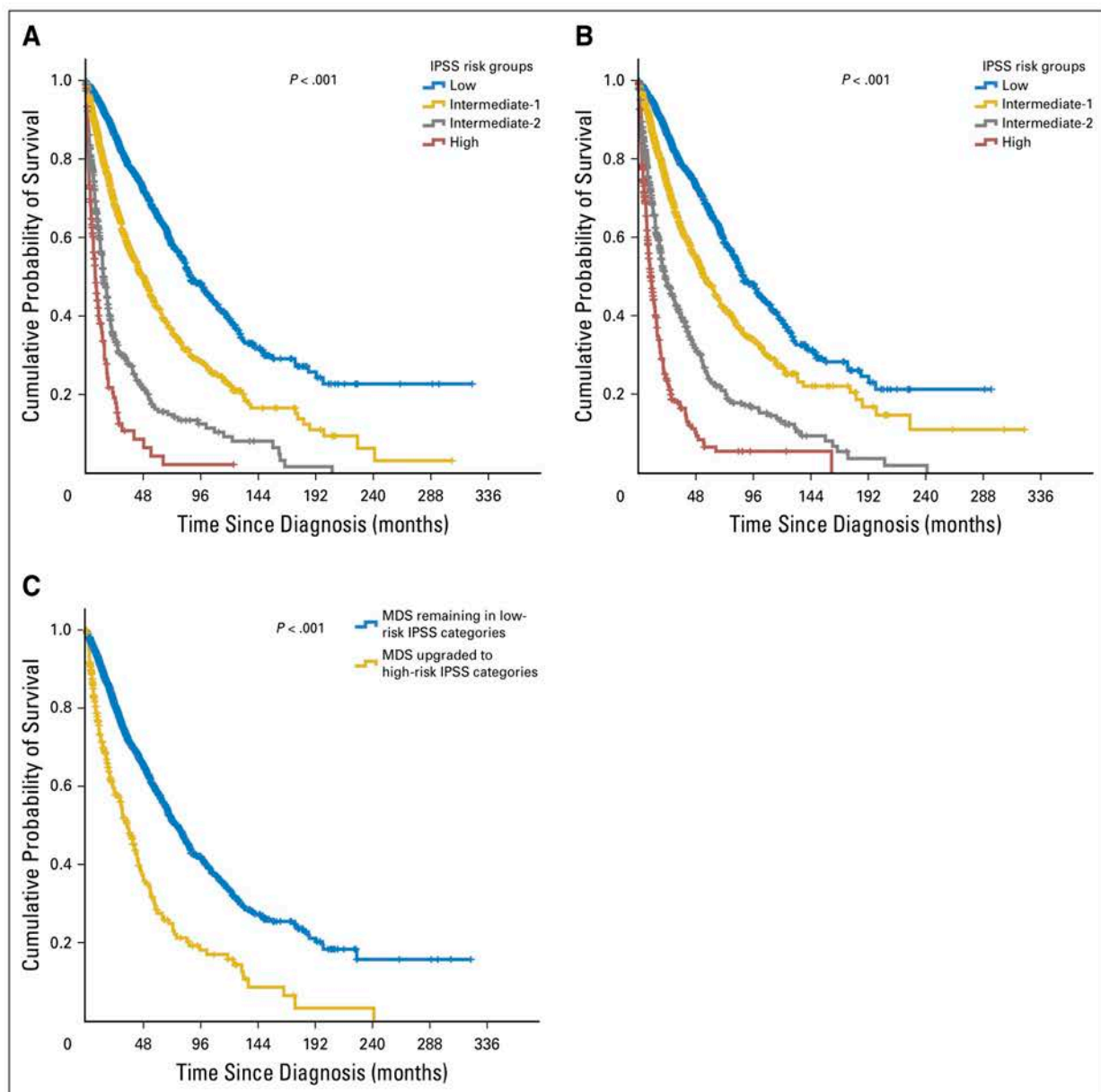


Fig 3. Overall survival (OS) by Kaplan-Meier analysis of all patients with myelodysplastic syndromes (MDS) according to the International Prognostic Scoring System (IPSS). (A) OS by IPSS risk groups enumerating blasts from total bone marrow cellularity. (B) OS by IPSS risk groups enumerating blasts from 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.

Improving Prognostic Evaluation of Myelodysplastic Syndromes

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 al⁶ 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,¹¹ 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.¹²⁻¹⁷

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.¹⁸⁻²²

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.²³ 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.

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?

Arenillas et al

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: Erythroleukaemia 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

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.

Improving Prognostic Evaluation of Myelodysplastic Syndromes

AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

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

The following represents disclosure information provided by authors of this manuscript. All relationships are considered compensated. Relationships are self-held unless noted. I = Immediate Family Member, Inst = My Institution. Relationships may not relate to the subject matter of this manuscript. For more information about ASCO's conflict of interest policy, please refer to www.asco.org/rwc or jco.ascopubs.org/site/ifc.

Leonor Arenillas

No relationship to disclose

Xavier Calvo

No relationship to disclose

Elisa Luño

No relationship to disclose

Leonor Senent

No relationship to disclose

Esther Alonso

No relationship to disclose

Fernando Ramos

No relationship to disclose

María Teresa Ardanaz

No relationship to disclose

Carme Pedro

No relationship to disclose

Mar Tormo

No relationship to disclose

Víctor Marco

No relationship to disclose

Julia Montoro

No relationship to disclose

María Díez-Campelo

No relationship to disclose

Salut Brunet

No relationship to disclose

Beatriz Arrizabalaga

No relationship to disclose

Blanca Xicoy

No relationship to disclose

Rafael Andreu

No relationship to disclose

Santiago Bonanad

No relationship to disclose

Andrés Jerez

No relationship to disclose

Benet Nomdedeu

No relationship to disclose

Ana Ferrer

No relationship to disclose

Guillermo F. Sanz

No relationship to disclose

Lourdes Florensa

No relationship to disclose

Arenillas et al

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

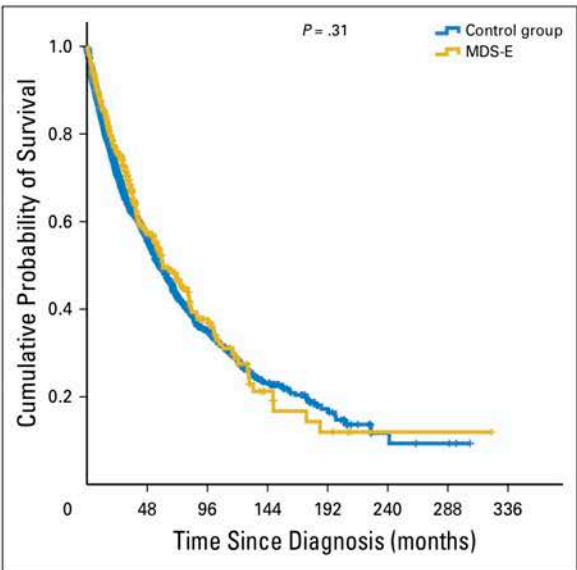


Fig A1. Overall survival (OS) by Kaplan-Meier analysis of patients with myelodysplastic syndromes with $\geq 50\%$ bone marrow (BM) erythroblasts (MDS-E) and comparison with control group. OS of 465 patients with MDS-E was similar to that observed in 3,227 patients with MDS with $< 50\%$ erythroblasts (median OS, 60.4 months ν 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
≥ 50	≥ 20 blasts in blood or of all nucleated cells	Case meets criteria for AML with myelodysplasia-related changes	AML with myelodysplasia-related changes
≥ 80 immature erythroid precursors with minimal maturation	Few, if any, myeloblasts	Minimal, if any, granulocytic component	Pure erythroid leukemia
≥ 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)
≥ 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 ⁹ /L < 30	< .001	1.61	1.32 to 1.97	< .001
Neutrophil count, ×10 ⁹ /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.

Arenillas et al

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 ⁹ /L < 30	< .001	1.58	1.29 to 1.93	< .001
Neutrophil count, ×10 ⁹ /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 Treball

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).

Resum

L'IPSS-R ha estat reconegut com l'índex amb la millor precisió pronòstica en les SMD. No obstant presenta l'inconvenient de que no clarifica si els pacients classificats en la categoria de risc intermedi han d'ésser considerats de baix o alt risc. Això suposa una important limitació ja que el tractament de les SMD és adaptada al risc. La correcta enumeració dels blasts a MO és essencial a l'hora d'establir el diagnòstic i el pronòstic dels pacients. Dades recents evidencien que considerar el percentatge de blasts en base a la cel·lularitat no eritroide (CNE) millora l'avaluació pronòstica dels pacients amb SMD tant si s'aplica a la classificació de l'OMS com a l'IPSS.

S'avaluà el percentatge medul·lar de blasts respecte de la cel·lularitat total i de la CNE en 3924 pacients amb SMD del Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos (GESMD), 498 dels quals presentaven predominança eritroide (SMD-E). Vàrem analitzar si recalculer l'IPSS-R considerant el percentatge de blasts a MO en base a la CNE permetia millorar la predicció pronòstica dels pacients amb SMD. Un 24% dels pacients classificats a la categoria de risc intermedi de l'IPSS-R foren reclassificats a categories de major risc (alt i molt alt) i presentaren una menor supervivència global i un menor temps a l'evolució leucèmica que els pacients del grup del qual provenien. De la mateixa manera, s'observà una millor distribució dels pacients, ja que els pacients de baix risc (molt baix, baix i intermedi) presentaven millors supervivències globals que quan els blasts foren enumerats en base a la cel·lularitat total, mentre que els pacients d'alt risc mantingueren el mal pronòstic esperable en aquest grup de pacients de mal pronòstic (medianes de supervivència estimades inferiors als 20 mesos). A més, el nostre mètode fou especialment útil per detectar els pacients amb un elevat risc de transformació leucèmica, avaluat com el percentatge de pacients morts que presentaren una

evolució a la LMA. Respecte als pacients amb SMD-E, l'enumeració dels blasts de la CNE va permetre reclassificar en categories d'alt risc un 51% de pacients prèviament classificats a la categoria de risc intermedi. Aquest grup de pacients va presentar una supervivència i un temps a la transformació leucèmica significativament menor. L'IPSS-R va aconseguir separar la sèrie de pacients amb SMD-E en cinc categories de risc amb supervivències significativament diferenciades només quan els blasts varen ser considerats de la CNE. En conclusió, enumerar els blasts de la CNE permet millorar l'avaluació pronòstica dels pacients amb SMD.

Received: 13 March 2017 | Revised: 16 March 2017 | Accepted: 20 March 2017

DOI: 10.1002/ajh.24732

RESEARCH ARTICLE



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)

Xavier Calvo^{1*} | Leonor Arenillas^{1*} | Elisa Luño² | Leonor Senent³ |
 Montserrat Arnan⁴ | Fernando Ramos⁵ | Carme Pedro⁶ | Mar Tormo⁷ |
 Julia Montoro⁸ | María Díez-Campelo⁹ | María Laura Blanco¹⁰ |
 Beatriz Arrizabalaga¹¹ | Blanca Xicoy¹² | Santiago Bonanad³ | Andrés Jerez¹³ |
 Meritxell Nomdedeu¹⁴ | Ana Ferrer¹ | Guillermo F Sanz³ | Lourdes Florensa¹

¹Laboratorio Citología Hematológica. Servicio Patología, GRETNHE, IMIM Hospital del Mar Research Institute, Barcelona, Spain; ²Servicio Hematología, Hospital Universitario Central Asturias, Oviedo, Spain; ³Servicio Hematología, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain; ⁴Servicio Hematología, ICO-Hospitalet de Llobregat, Spain; ⁵Servicio Hematología, Hospital Universitario de León, León, Spain; ⁶Servicio Hematología, IMIM Hospital del Mar Research Institute, Barcelona, Spain; ⁷Servicio Hematología, Hospital Clínico Universitario de Valencia, Valencia, Spain; ⁸Servicio Hematología, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; ⁹Servicio Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain; ¹⁰Servicio Hematología, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ¹¹Servicio Hematología, Hospital Universitario Cruces, Baracaldo, Spain; ¹²Servicio Hematología, ICO-Badalona, Badalona, Spain; ¹³Servicio Hematología y Oncología Médica, Hospital Morales Meseguer, IMIB-Arixaca, Murcia, Spain; ¹⁴Servicio Hematología, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

Correspondence

Xavier Calvo, Hospital del Mar Research Institute, Paseo Marítimo, 25, 08003 Barcelona, Spain.

Email: xcalvo@parcdesalutmar.cat

Leonor Arenillas, Hospital del Mar Research Institute, Paseo Marítimo, 25, 08003 Barcelona, Spain.

Email: larenillas@parcdesalutmar.cat

Funding information

Grant/Award Number: RD12/0036/0044; Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (FEDER); Grant/Award Number: 2014/SGR585; Agencia de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca of Generalitat de Catalunya.

Abstract

The Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R) has been recognized as the score with the best outcome prediction capability in MDS, but this brought new concerns about the accurate prognostication of patients classified into the intermediate risk category. The correct enumeration of blasts is essential in prognostication of MDS. Recent data evidenced that considering blasts from nonerythroid cellularity (NECs) improves outcome prediction in the context of IPSS and WHO classification. We assessed the percentage of blasts from total nucleated cells (TNCs) and NECs in 3924 MDS patients from the GESMD, 498 of whom were MDS with erythroid predominance (MDS-E). We assessed if calculating IPSS-R by enumerating blasts from NECs improves prognostication of MDS. Twenty-four percent of patients classified into the intermediate category were reclassified into higher-risk categories and showed shorter overall survival (OS) and time to AML evolution than those who remained into the intermediate one. Likewise, a better distribution of patients was observed, since lower-risk patients showed longer survivals than previously whereas higher-risk ones maintained the outcome expected in this poor prognostic group (median OS < 20 months). Furthermore, our approach was particularly useful for detecting patients at risk of dying with AML. Regarding MDS-E, 51% patients classified into the intermediate category were reclassified into higher-risk ones and showed shorter OS and time to AML. In this subgroup of MDS, IPSS-R was capable of splitting our series in five groups with significant differences in OS only when blasts were assessed from NECs. In conclusion, our easy-applicable approach improves prognostic assessment of MDS patients.

Xavier Calvo and Leonor Arenillas contributed equally to this work.

Presented in part at the 58th American Society of Hematology Annual Meeting, San Diego, CA, December 3-6, 2016.

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).^{1,2} The IPSS-R has been recognized as the score with the best prognostic capability in MDS,²⁻⁴ but some concerns exist about the real prognostic significance of the intermediate risk category.² 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.²⁻⁶ 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.^{7,8}

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.⁹ In the 2016 revision to the WHO classification of myeloid neoplasms, the nonerythroid blast cell count rule was eliminated.¹⁰ Despite this recommendation, as shown in our recent study by Arenillas et al.,¹¹ 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.¹² 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.¹³ 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,¹⁴⁻¹⁷ were reclassified according to the WHO proposals,⁹ 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: $[\% \text{BM blasts from TNCs} / (100 - \% \text{BM erythroblasts})] \times 100$. 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 $\geq 10\%$ 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)¹⁸ 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
Age, median (range), years	75.3 (16-101)
<65 years, n (%)	764 (19.5)
≥65 years, n (%)	3160 (80.5)
Male gender, n (%)	2306 (58.8)
Hemoglobin, median (range), g/L	10 (2.9-16.5)
Neutrophil count, median (range), $\times 10^9/L$	2.1 (0.01-13.8)
< $0.5 \times 10^9/L$, n (%)	261 (6.7)
≥ $0.5 \times 10^9/L$, n (%)	3663 (93.3)
Platelet count, median (range), $\times 10^9/L$	157 (1-1161)
< $30 \times 10^9/L$, n (%)	188 (4.8)
≥ $30 \times 10^9/L$, n (%)	3736 (95.2)
WHO categories, n (%)	
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)
Erythroblasts %, median (range)	33.4 (3.2-79)
MDS with ≥50% BM erythroblasts, n (%)	498 (12.7)
MDS with <50% BM erythroblasts, n (%)	3426 (87.3)
% Dyserythropoiesis, median (range)	30 (0-100)
% Dysgranulopoiesis, median (range)	30 (0-100)
% Dysthrombopoiesis, median (range)	20 (0-100)
% BM blasts from TNCs, median (range)	2 (0-19)
% BM blasts from NECs, median (range)	3.13 (0-34.7)
LDH serum level u/L, median (range)	320 (0-4502)
Karyotype, abnormal (%)	1319 (33.6)
IPSS cytogenetic group, n (%)	
Low	3129 (79.7)
Intermediate	460 (11.7)
High	327 (8.3)
IPSS-R cytogenetic group, n (%)	
Very Low	165 (4.2)
Low	3021 (77)
Intermediate	420 (10.7)
Poor	124 (3.2)
Very Poor	194 (4.9)
Treatments, n (%)	
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.^{19,20} 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 method²¹ 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

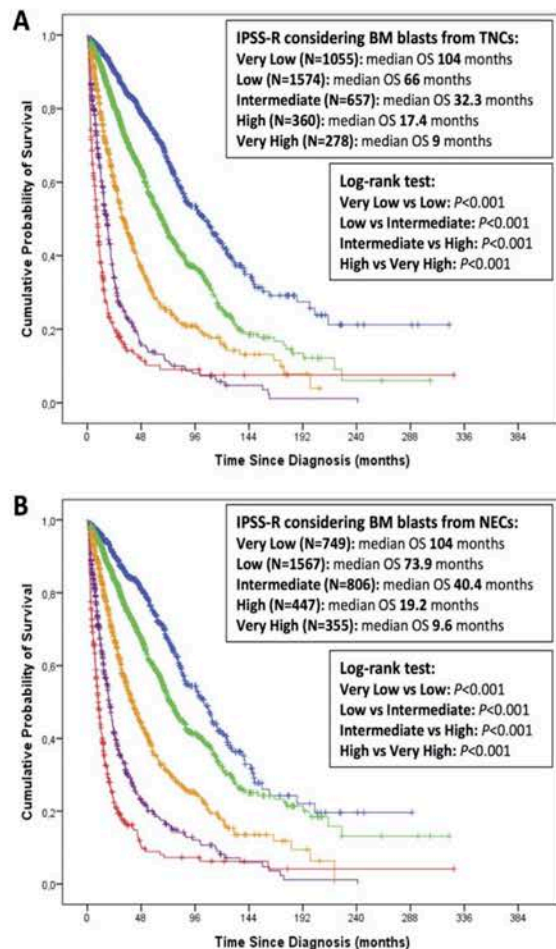


FIGURE 1 Overall survival (OS) by Kaplan-Meier analysis of patients with myelodysplastic syndromes (MDS) according to the Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R). (A) OS by IPSS-R risk groups enumerating blasts from total bone marrow cellularity. (B) OS by IPSS-R risk groups enumerating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

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 ($>2\text{--}5\%$: 1.29, $5\text{--}10\%$: 1.71, $>10\%$: 2.34, for the IPSS-R; $>2\text{--}5\%$: 1.12, $5\text{--}10\%$: 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.⁶ Interestingly, by applying the Maxstat,¹⁸ 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 $5\text{--}20\%$ 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)
Recoded IPSS-R	3924		
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)
IPSS-R	3924		
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)
Recoded IPSS	3915		
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)
IPSS	3915		
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)
Recoded IPSS-R	3912		
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)
IPSS-R	3912		
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)
Recoded IPSS	3904		
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)
IPSS	3904		
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,²¹ 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

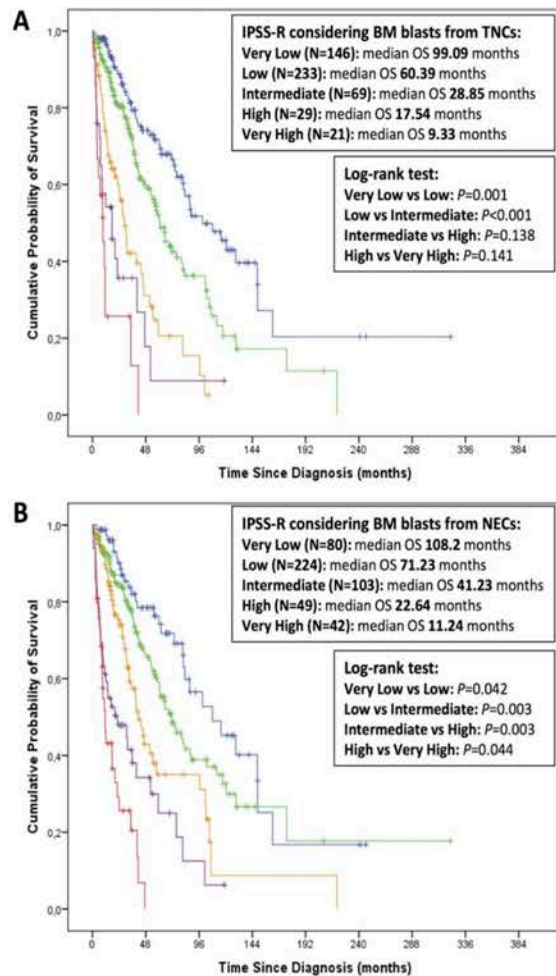


FIGURE 2 Overall survival (OS) by Kaplan-Meier analysis of patients with myelodysplastic syndromes (MDS) with $\geq 50\%$ BM erythroblasts (MDS-E) according to the Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R). (A) OS by IPSS-R risk groups enumerating blasts from total bone marrow cellularity. (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]

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 than 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.¹⁰ 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.¹¹ 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 studies¹⁻⁶ 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.² 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 certainly 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.²² 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.²³ 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).² 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 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.

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, Lausker 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
- [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;92:614–621. <https://doi.org/10.1002/ajh.24732>

ONLINE SUPPLEMENTARY MATERIAL**Table and Figure Legends**

Figure S1. Overall survival (OS) by Kaplan-Meier analysis of patients with myelodysplastic syndromes (MDS) according to the revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R). One hundred sixty-four lower-risk patients with MDS were upgraded to higher-risk categories when blasts were considered from nonerythroid cellularity. These upgraded patients achieved: **(A)** lower OS and **(B)** shorter time to AML evolution than did those who remained in lower-risk categories. OS was compared with two-sided log-rank test.

Figure S2. 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). Forty-one lower-risk patients with MDS-E were upgraded to higher-risk categories when blasts were considered from nonerythroid cellularity. These upgraded patients achieved: **(A)** lower OS and **(B)** shorter time to AML evolution than did those who remained in lower-risk categories. OS was compared with two-sided log-rank test.

Table S1. Distribution of MDS patients dying with AML among the IPSS-R and the recoded IPSS-R categories.

Figure S1.

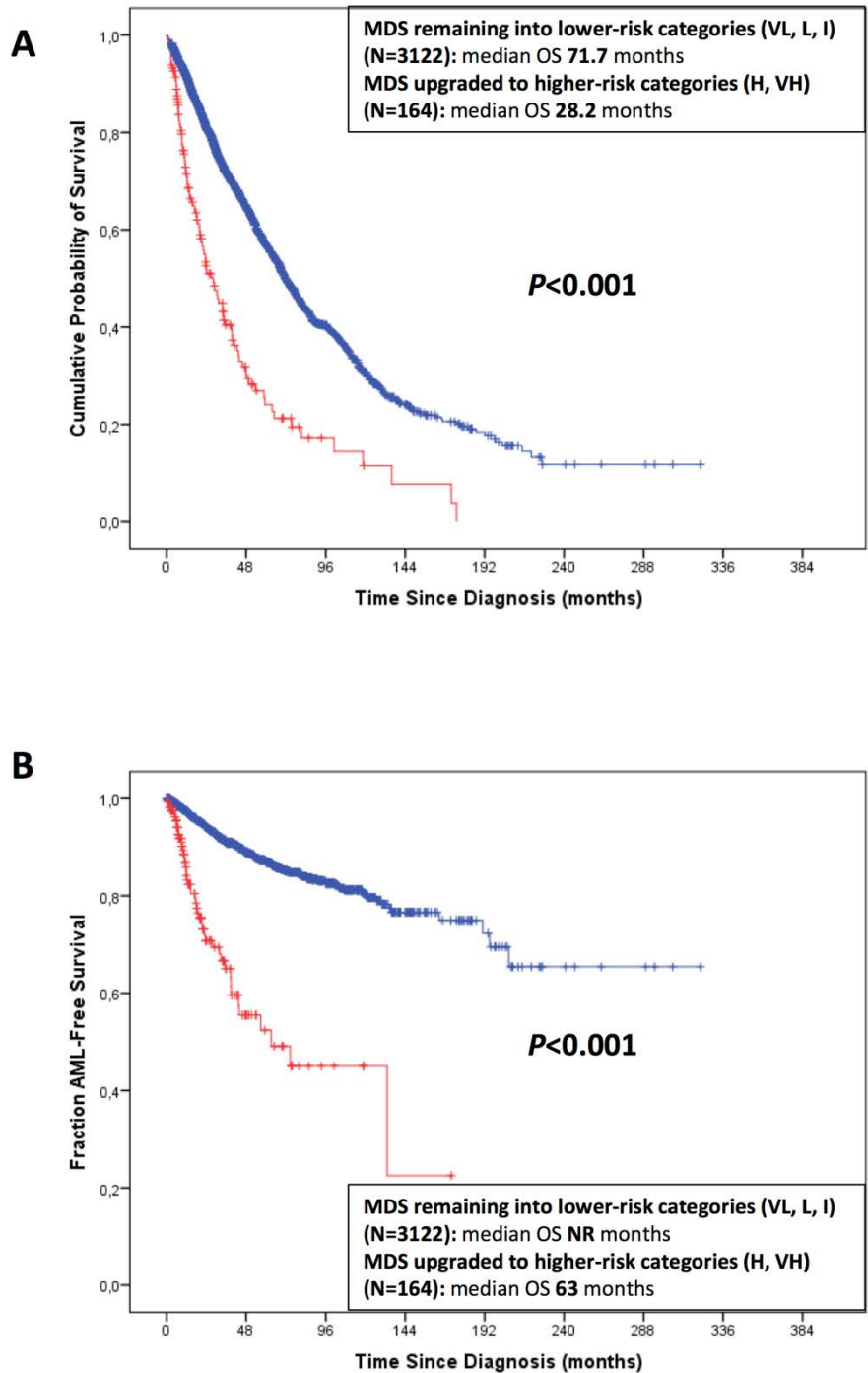


Figure S2.

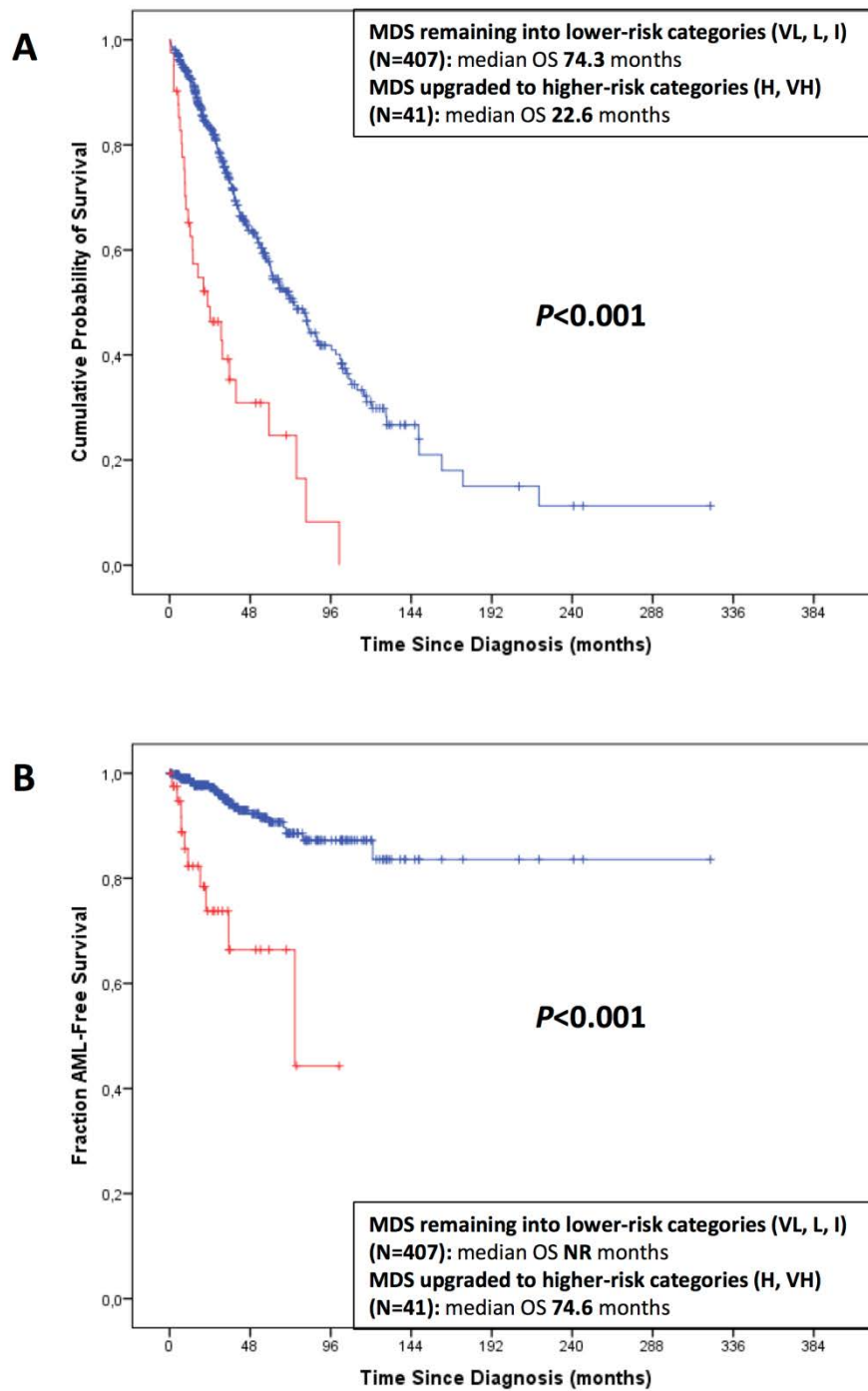


Table S1.

Risk category	IPSS-R considering BM blasts from TNCs			IPSS-R considering BM blasts from NECs		
	No. of patients	Died no.	Died with AML no. (%)	No. of patients	Died no.	Died with AML no. (%)
Very low	1055	309	36 (11.7)	749	220	24 (10.9)
Low	1574	623	111 (17.8)	1567	561	85 (15.2)
Intermediate*	657	378	124 (32.8)	806	423	120 (28.4)
High	360	257	88 (34.2)	447	304	112 (36.8)
Very high	278	218	74 (33.9)	355	277	92 (33.2)
Total	3924	1785	433 (24.3)	3924	1785	433 (24.3)

*The percentage of patients dying with leukemia was significantly higher in those intermediate patients who were upgraded into higher-risk categories: 42 died with AML/103 died (40.8%) vs. 82 died with AML/275 died (29.8%); $P=0.043$

Quart Treball

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

Resum

L'eritroleucèmia ha estat considerada un subtipus de LMA a la classificació de l'OMS 2008. Es defineix per presentar un 50% o més d'eritroblasts a MO i un 20% o més de blasts a MO respecte de la cel·lularitat no eritroide (CNE). En els pocs casos en què el percentatge de blasts de la cel·lularitat total sigui igual o superior al 20%, no s'hauran d'acomplir els criteris propis d'altres subtipus de LMA ni de les neoplàsies mieloides relacionades amb el tractament. L'eritroleucèmia comparteix característiques clínico-biològiques amb les SMD, especialment amb les SMD amb predominança eritroide (SMD-E), caracteritzades per la presència d'un 50% o més d'eritroblasts a MO. La classificació de l'OMS del 2017 proposa eliminar la regla del recompte de la CNE i reclassificar els pacients prèviament diagnosticats d'eritroleucèmia a la categoria apropiada de SMD en base al recompte de blasts de la cel·lularitat total. Es va portar a terme un estudi retrospectiu en què es compararen les característiques clínico-biològiques de les eritroleucèmies *de novo* amb les de les SMD *de novo*, focalitzant en la comparativa amb les SMD-E. La supervivència dels 405 pacients amb SMD-E sense excés de blasts fou significativament millor que la del grup de 57 pacients amb AREB-1 amb predominança eritroide i que la de les 59 eritroleucèmies, però no s'observaren diferències significatives de supervivència entre el grup de pacients amb AREB-1 amb predominança eritroide i el grup de pacients amb eritroleucèmia. En aquest grup de pacients amb predominança eritroide i excés de blasts (AREB-1 amb predominança eritroide i eritroleucèmia), la presència d'un cariotip d'alt risc definit per l'IPSS o l'IPSS-R va ser el principal factor pronòstic advers. De la mateixa manera, la supervivència de les 459 AREB-2 de la nostra sèrie, independentment de si presentaven un 20% o més de blasts de la CNE, va ser quasi idèntica a la del grup de 59 eritroleucèmies. Cal destacar que les 11 eritroleucèmies de la nostra sèrie amb 5-9% blasts de la cel·lularitat total, que seran considerades una SMD amb

excés de blasts tipus 1 a la classificació de l'OMS 2017, varen presentar una supervivència global similar a la de la resta d'eritroleucèmies de la nostra sèrie. Les nostres dades suggereixen que l'eritroleucèmia *de novo* es troba en l'espectre clínico-biològic de les SMD amb excés de blasts i recolzen la seva inclusió en futures classificacions de les SMD.

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^{1,16}, Leonor Arenillas^{1,16}, Elisa Luño², Leonor Senent³, Montserrat Arnan⁴, Fernando Ramos⁵, María Teresa Ardanaz⁶, Carme Pedro⁷, Mar Tormo⁸, Julia Montoro⁹, María Díez-Campelo¹⁰, Beatriz Arrizabalaga¹¹, Blanca Xicoy¹², Santiago Bonanad¹³, Andrés Jerez¹⁴, Benet Nomdedeu¹⁵, Ana Ferrer¹, Guillermo F Sanz³ and Lourdes Florensa¹; on behalf of Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos (GESMD)

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

¹⁶These 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 (2016) 29, 1541–1551; doi:10.1038/modpathol.2016.146; published online 26 August 2016

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.^{1,2}

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.^{3–10} 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.^{2,11–13} 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.^{6,8–10}

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*^{14,15} 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.² Those patients diagnosed initially by French–American–British classification criteria,^{16–19} 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 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 and erythroleukemia were followed strictly.² 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,²⁰ bone marrow biopsy was conducted only in those cases where fibrosis, hypoplastic myelodysplastic syndromes, or idiopathic cytopenias of undetermined significance were suspected.

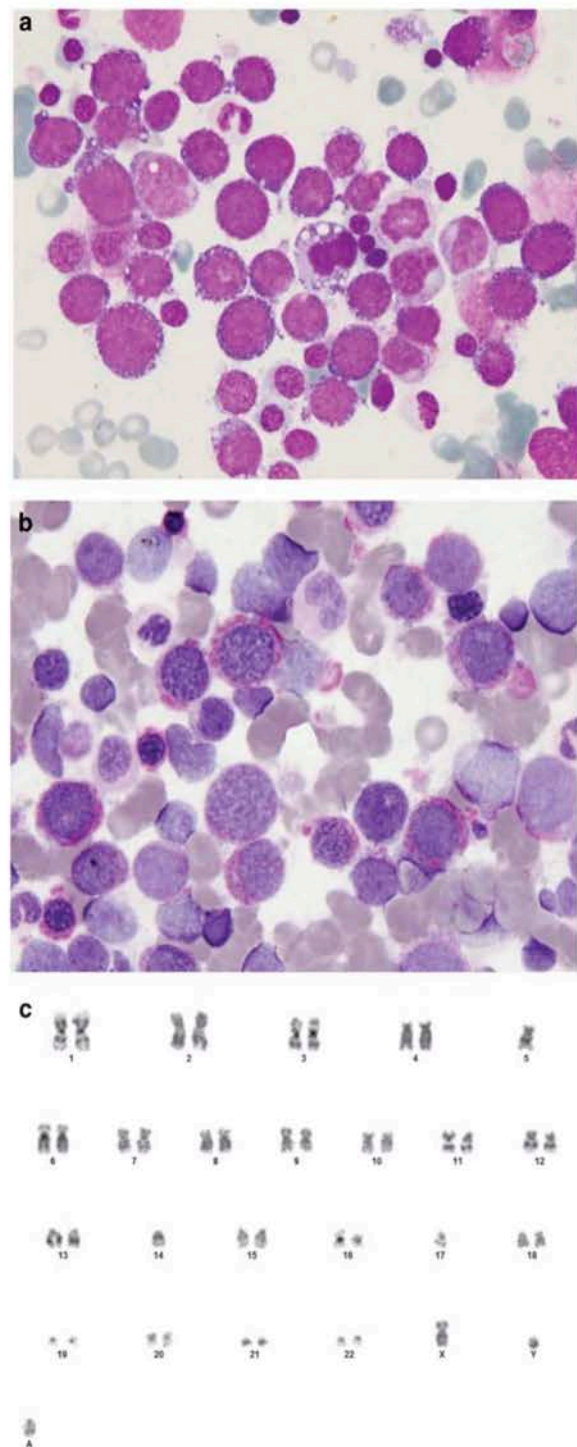


Figure 1 Morphologic features of *de novo* erythroleukemia. (a) Bone marrow smear shows immature erythroblasts with vacuolated cytoplasm (May–Grünwald–Giemsa). (b) Diffuse pattern in the cytoplasm of mature erythroblasts and granular and clumped pattern in earlier precursors by periodic acid–Schiff reaction (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.²¹

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 System²² or Revised International Prognostic Scoring System²³ 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)	< 0.001
Erythroblasts, median (range), %	58.6 (50–85)	55 (50–74)	0.063
BM blasts from TNCs, median (range), %	12 (5–19)	6 (5–9)	< 0.001
BM blasts from NECs, median (range), %	30.2 (20–67.9)	15 (10–19.4)	< 0.001
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
IPSS cytogenetic group, n (%)			0.449
Low	38 (64)	31 (54)	
Intermediate	10 (17)	10 (18)	
Poor	11 (19) ^a	16 (28) ^a	
IPSS-R cytogenetic group, n (%)			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) ^b	10 (18) ^b	

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.

^aNo significant differences were observed in the percentage of high-risk karyotypes defined by the IPSS between RAEB1-E and erythroleukemia (IPSS, 19 vs 28%, $P=0.230$).

^bNo 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

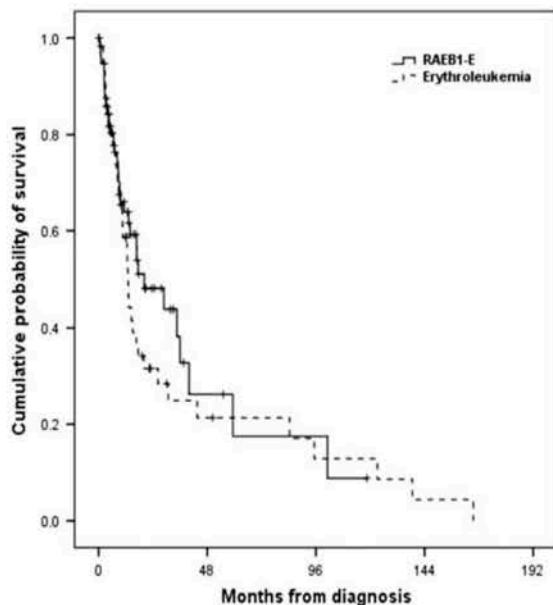


Figure 2 Overall survival by Kaplan–Meier analysis of 57 refractory anemias with excess blasts-1 with $\geq 50\%$ bone marrow erythroblasts (RAEB1-E) vs 59 *de novo* erythroleukemias. No significant difference in overall survival was observed (median overall survival, 20 vs 13 months; NS). Overall survival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

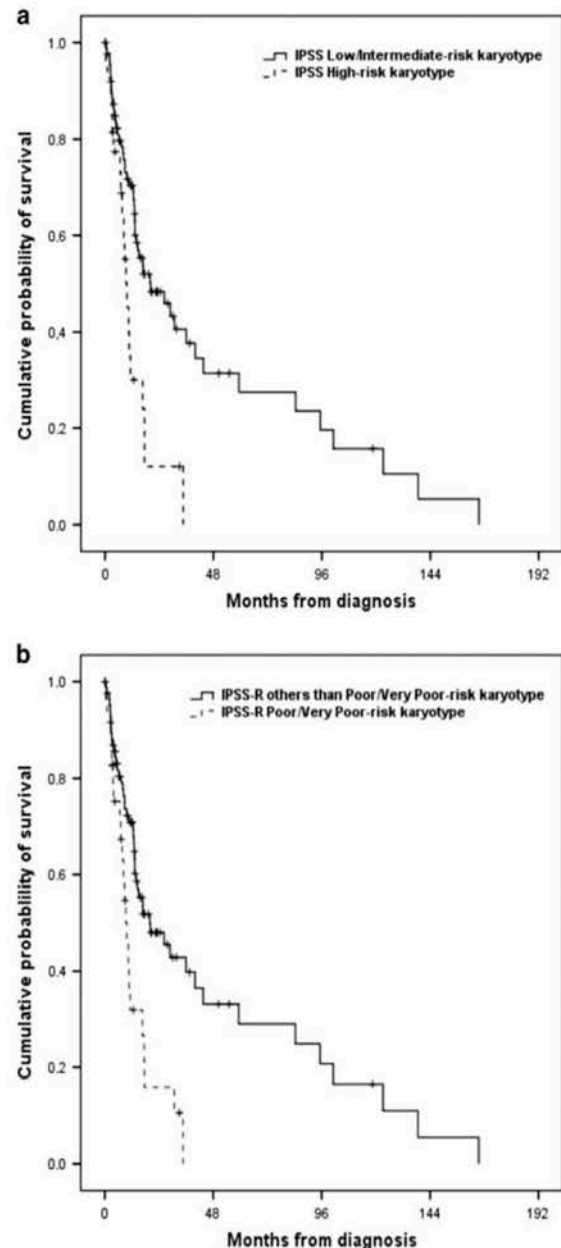


Figure 3 Overall survival by Kaplan–Meier analysis. (a) Survival according to the presence of an International Prognostic Scoring System (IPSS) high-risk karyotype or not (median overall survival, 10 vs 20 months, $P=0.001$). (b) Survival according to the presence of a Revised International Prognostic 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	2.10	1.19–3.71	0.011
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)	2.20	1.27–3.83	0.005
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 clinico-biological features of *de novo* erythroleukemia and refractory anemia with excess blasts-2 was carried

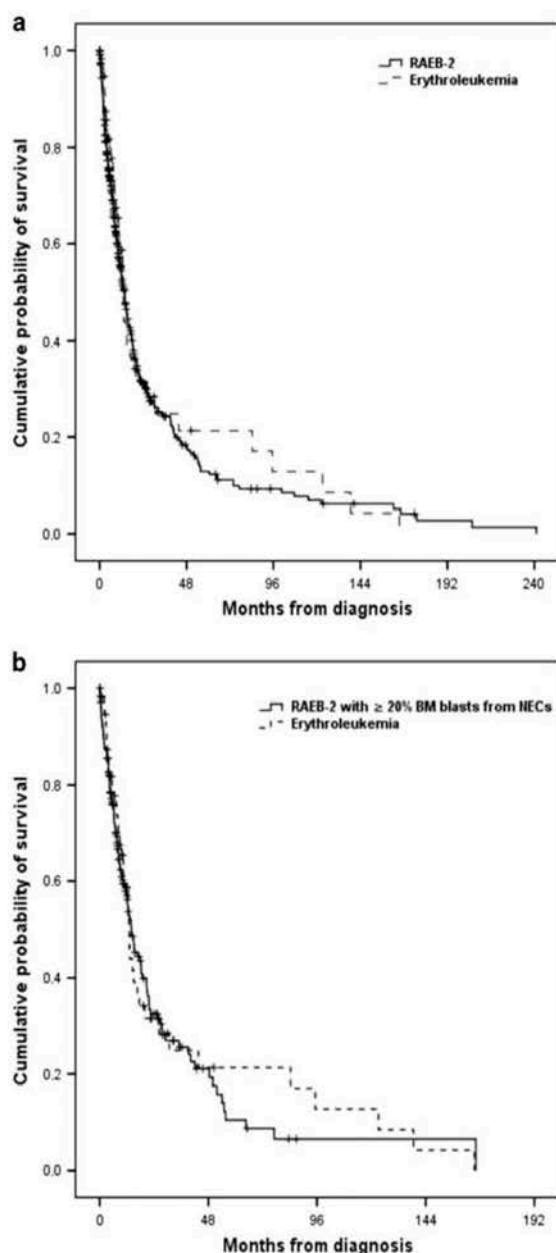


Figure 4 Overall survival by Kaplan-Meier analysis of (a) 59 *de novo* erythroleukemias vs 459 refractory anemias with excess blasts-2 (RAEB-2) (median overall survival, 13 vs 14 months; NS) and (b) 59 *de novo* erythroleukemias vs 175 refractory anemias with excess blasts-2 with equal or greater than 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.¹¹ 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.⁶⁻¹⁰

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.^{1-2,16-19} 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), $\times 10^9/l$	0.84 (0.05–9.12)	1.1 (0.04–21.7)	0.053
Platelet count, median (range), $\times 10^9/l$	65 (12–394)	79 (3–440)	0.145
Erythroblasts, median (range), %	58.6 (50–85)	27 (6–49)	< 0.001
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)	< 0.001
Dyserythropoiesis, median (range), %	40 (4–100)	30 (0–100)	0.085
Dysgranulopoiesis, median (range), %	20 (0–100)	50 (0–100)	0.038
Dys thrombopoiesis, median (range), %	25 (0–100)	33 (0–100)	0.369
Karyotype, abnormal/total cases (%)	24/59 (40.7)	230/459 (50.1)	0.173
IPSS cytogenetic group, n (%)			0.387
Low	38 (64)	260 (56.8)	
Intermediate	10 (17)	75 (16.4)	
Poor	11 (19) ^a	123 (26.9) ^a	
IPSS-R cytogenetic group, n (%)			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) ^b	94 (21.9) ^b	

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.

^aNo 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%, $P=0.175$).

^bNo 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.² 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.^{14,15}

Although in the 2008 WHO classification erythroleukemia was included into acute myeloid leukemias,² our results strongly support the future WHO recommendation of considering erythroleukemia as a myelodysplastic syndrome,^{14,15} 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.^{6,7,10} 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.^{14,15} 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.¹¹ 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-clinical pathological 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>)

ONLINE SUPPLEMENTARY MATERIAL

TABLES

Table S1. 2008 WHO classification of myeloid malignancies for patients with equal or greater than 50% erythroblasts from total nucleated cells in bone marrow.

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

Table S2. Distribution of patients among 2008 WHO categories.

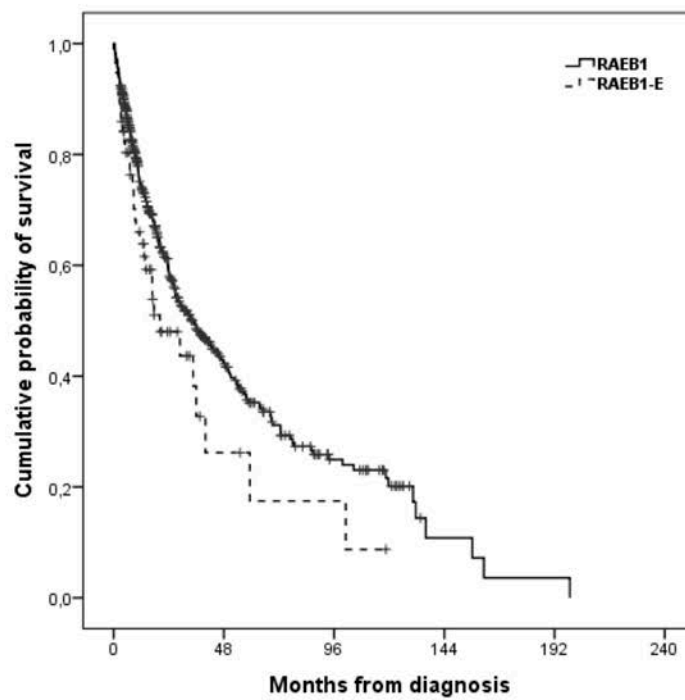
WHO subtypes	Erythroid-predominant MDS (N=462)	Control group (N=3225)
RCUD	42	338
RARS	139	413
RCMD	200	1272
5q-	12	192
MDS-U	12	62
RAEB-1	57	489
RAEB-2	0 [‡]	459
Erythroleukemia	59	

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

Abbreviations. MDS: myelodysplastic syndromes; Erythroid-predominant MDS: MDS with ≥50% bone marrow erythroblasts; RCUD: refractory cytopenia with unilineage dysplasia; RARS: refractory anemia with ring sideroblasts; RCMD: refractory cytopenia with multilineage dysplasia; 5q-: myelodysplastic syndromes with isolated del(5q); MDS-U: myelodysplastic syndrome-unclassified; RAEB-1: refractory anemia with excess blasts-1; RAEB-2: refractory anemia with excess of blasts-2.

Figure legend

Figure S1. Overall survival by Kaplan-Meier analysis of 57 refractory anemias with excess blasts type-1 with $\geq 50\%$ bone marrow erythroblasts (RAEB1-E) *versus* 489 refractory anemias with excess blasts type-1 (RAEB-1). RAEB1-E showed a significant shorter OS (median overall survival, 20 vs. 34 months; $P=0.042$). Overall survival is indicated in months and was compared with the 2-sided log-rank test.



Cinquè Treball

Comparison of three prognostic scoring systems in a series of 146 cases of chronic myelomonocytic leukemia (CMML): MD Anderson prognostic score (MDAPS), CMML-specific prognostic scoring system (CPSS) and Mayo prognostic model. A detailed review of prognostic factors in CMML.

Resum

Malgrat que existeixen índexs pronòstics específics per a la valoració de la LMMC, per la seva baixa prevalença molt pocs s'han basat en sèries llargues de pacients. De fet, l'IPSS ha estat l'score pronòstic més utilitzat per a la valoració de la LMMC, malgrat que no és aplicable a les variants proliferatives. L'any 2002 aparegué el MD Anderson Prognostic Scoring System (MDAPS), el primer índex basat en una sèrie llarga de pacients erigint-se com a l'eina pronòstica més valuosa. A causa de la recent aparició d'índexs específics com el *CMML-specific Prognostic Score* (CPSS) i el *Mayo prognostic model* es pretén avaluar la validesa d'aquests aplicada a una sèrie llarga de pacients amb LMMC i comparar la seva capacitat de predicció pronòstica. Cent quaranta-sis pacients diagnosticats de LMMC entre el 1998 i el 2014 foren analitzats retrospectivament. Totes les variables que composaven els índexs presentaren un impacte en l'anàlisi univariable de supervivència excepte la presència de cèl·lules mieloides immadures circulants (mielèmia). Pel que fa a la l'anàlisi univariable del temps a la transformació leucèmica, només presentaren impacte les variables que integrava el CPSS, el percentatge de blasts a MO igual o superior al 10% i el recompte de monòcits superior a $10 \times 10^9/L$. Els tres índexs pronòstics permeteren dividir adequadament els pacients en grups de baix i alt risc i van mantenir el seu impacte pronòstic per la supervivència en ésser contrastats en una anàlisi multivariable, observant-se valors de *hazard ratio* similars per a cada un d'ells. Es va analitzar la capacitat predictiva per a la supervivència i el risc de transformació leucèmica dels tres índex mitjançant el test de concordança C-índex i la implementació de corbes de ROC. El CPSS va demostrar una millor capacitat predictiva per a la supervivència i la transformació leucèmica. Les variables que integraven els índexs van ser comparades en una anàlisi multivariable per a la supervivència i només aquelles que composaven el CPSS i el recompte de

plaquetes inferior a $100 \times 10^9/L$ mantingueren la seva significació estadística. En base a aquestes troballes implementarem un nou índex, el CPSS-P, que integrava les variables del CPSS i el recompte plaquetari. El CPSS-P s'erigí com l'índex amb la millor capacitat de predicció de risc de la nostra sèrie. L'estudi reforça la validesa dels tres índexs pronòstics analitzats.



Contents lists available at ScienceDirect

Leukemia Research

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

Comparison of three prognostic scoring systems in a series of 146 cases of chronic myelomonocytic leukemia (CMML): MD Anderson prognostic score (MDAPS), CMML-specific prognostic scoring system (CPSS) and Mayo prognostic model. A detailed review of prognostic factors in CMML[☆]



Xavier Calvo^{a,c,**}, Meritxell Nomdedeu^{b,c}, Rodrigo Santacruz^d, Núria Martínez^b, Dolors Costa^a, Arturo Pereira^d, Natalia Estrada^{c,e}, Blanca Xicoy^{c,e}, Jordi Esteve^{b,c}, Benet Nomdedeu^{b,c,*}

^a Hematopathology Unit, Department of Pathology, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain

^b Hematology Department, Hospital Clínic, IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain

^c Josep Carreras Leukaemia Research Institute, Barcelona, Spain

^d Department of Hemotherapy and Hemostasis, Hospital Clínic, IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain

^e Hematology Department, ICO-Germans Trias i Pujol Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 March 2015

Received in revised form 18 May 2015

Accepted 21 May 2015

Available online 23 July 2015

Keywords:

CMML

CPSS

MDAPS

Mayo prognostic model

Prognostic factors

ABSTRACT

Although specific prognostic models for chronic myelomonocytic leukemia (CMML) exist, few are based on large series of patients. MD Anderson prognostic score (MDAPS) has been the most useful for CMML risk assessment. Due to recent emergence of CMML-specific prognostic scoring system (CPSS) and Mayo prognostic model, we compared the three scores.

One hundred forty-six CMML patients diagnosed between 1998 and 2014 were retrospectively analyzed. Univariate analysis was performed to assess prognostic impact on overall survival (OS) and leukemia-free survival (LFS) of the variables composing the scores and all items showed prognostic value on OS with the exception of the presence of circulating immature myeloid cells. Regarding LFS, only CPSS variables, bone marrow blast $\geq 10\%$ and an absolute monocyte count $>10 \times 10^9/L$ had an impact. When the scores were applied, all showed an impact on OS and retained their significance in multivariate analysis. By using ROC curves and C-index, CPSS showed a slightly better predictive value for mortality and leukemia transformation. Variables composing the three indexes were compared in multivariate analysis and only CPSS parameters and platelets $<100 \times 10^9/L$ retained their significance. Based on these findings, by adding platelet count to CPSS, a new score was implemented (CPSS-P) showing the best risk prediction capability in our series. This study reinforces the validity of the tested scores.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Chronic myelomonocytic leukaemia (CMML) is a clonal haematopoietic malignancy with overlapping features of myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic syndromes (MDS). It is characterized by persistent monocytosis (monocytes $>1 \times 10^9/L$ in peripheral blood for at least 3 months), absence of *BCR-ABL1* fusion gene, no rearrangement of *PDGFRA* or *PDGFRB* and fewer than 20% myeloblasts and promonocytes in the peripheral blood (PB) and bone marrow (BM). Dysplasia involving one or more myeloid lineages is almost always present but the diagnosis of CMML can still

[☆] Presented at the 56th annual meeting of the American Society of Hematology, San Francisco, CA, December 2014.

* Corresponding author at: Hospital Clínic, Hematology Department, Villarroel 170, Barcelona 8036, Spain. Fax: +34 93 227 98 11.

** Corresponding author at: Hematopathology Unit, Department of Pathology, Hospital Clínic, Villarroel 170, Barcelona 08036, Spain. Fax: +34 93 227 98 11.

E-mail addresses: xcalvo@clinic.ub.es (X. Calvo), nomdedeu@clinic.ub.es (B. Nomdedeu).

be made if the other requirements are met and dysplasia is not present [1].

The French–American–British (FAB) classification distinguished in 1994 two subtypes of CMML according to the leukocyte count in peripheral blood: the myelodysplastic subtype (CMML–MD) with $13 \times 10^9/L$ leukocytes or less, and the myeloproliferative subtype (CMML–MP) with a leukocyte count above $13 \times 10^9/L$ [2]. Based on the 2008 WHO classification, CMML is subdivided into CMML-1 (<5% PB blasts and <10% BM blasts) and CMML-2 (5–19% PB blasts and 10–19% BM blasts or when Auer rods are present irrespective of the blast count) [1].

Median survival of patients with CMML is reported to vary from 18 to 24 months and progression to AML occurs in approximately 15–30% of cases [3–9]. Although several prognostic models have been created to stratify CMML patients into different risk categories, there is a paucity of specific prognostic scores based in large series of patients [8–12]. In this regard, the MD Anderson prognostic scoring system (MDAPS) published in 2002 was the first score based in a large cohort of 213 CMML patients [13]. This identified four independent adverse prognostic factors: hemoglobin level <12 g/dL, absolute lymphocyte count (ALC) > $2.5 \times 10^9/L$, presence of circulating immature myeloid cells (IMC) and bone marrow (BM) blasts $\geq 10\%$. In the last two years four new specific prognostic scores have been developed to stratify risk of CMML patients: CMML-specific prognostic scoring system (CPSS) [14], *Groupe Français des Myélodysplasies* prognostic score (GFM prognostic score) [15], Mayo prognostic model for WHO-defined CMML [16] and Mayo molecular model (MMM) [17]. The CPSS was based in a cohort of 558 patients and included FAB classification (CMML–MD vs. CMML–MP), WHO classification (CMML-1 vs. CMML-2), red blood cell (RBC) transfusion dependency at diagnosis and the Spanish cytogenetic risk classification [5,14]. The GFM prognostic score was developed from a series of 312 patients and was the first that included gene mutation status information and clinical parameters, defining a prognostic score based on: age >65 years, leukocytes > $15 \times 10^9/L$, anemia (hemoglobin <10 g/dL in women and <11 g/dL in men), platelets < $100 \times 10^9/L$ and presence of *ASXL1* mutation [15–22]. The Mayo prognostic model was based in a series of 226 patients and, interestingly, the adverse independent prognostic impact of *ASXL1* mutation was not observed. This index identified three risk categories based on: absolute monocyte count (AMC) > $10 \times 10^9/L$, presence of circulating immature myeloid cells, hemoglobin <10 g/dL and platelet count < $100 \times 10^9/L$ [16]. Finally, after combining the data of 466 patients from the GFM and Mayo clinic group, *ASXL1* mutation (nonsense and frameshift) confirmed its independent prognostic value in terms of overall survival but not on leukemic transformation. By the inclusion of *ASXL1* mutational status to the Mayo prognostic model, the novel Mayo molecular model (MMM) was created [17].

A series of 146 CMML patients was used to assess the usefulness of the CPSS, the MDAPS and the Mayo prognostic model. These three scores, and not those based on clinical and molecular variables, were selected as the most easy-to-apply in normal clinical practice. The prognostic value of each variable that composed every score was tested and a comparison of the three indexes was made. A modified CPSS based on our results was performed in order to get a better risk stratification of patients.

2. Methods

2.1. Patients

From January 1997 to August 2013 a retrospective analysis including 146 patients diagnosed with CMML was performed in Hospital Clínic of Barcelona ($n = 134$) and Hospital Universitari Ger-

mans Trias i Pujol ($n = 12$). CMML was morphologically defined according to the FAB and WHO 2008 criteria.

In the analysis of prognostic factors, variables analyzed were those included in the CPSS [14], MDAPS [13] and Mayo prognostic model [16]: absolute monocyte count (AMC), hemoglobin levels, platelet count, absolute lymphocyte count (ALC), bone marrow (BM) blasts, peripheral blood (PB) blasts, presence of circulating immature myeloid cells (IMC), leukocyte count, transfusion requirement and cytogenetics. All complete blood count differentials and PB smears were evaluated for presence of circulating IMCs, defined by the presence of any of the following cells in PB: myeloblasts, promyelocytes, myelocytes and metamyelocytes. Transfusion requirement was defined as in the WHO-based prognostic scoring system (WPSS) [23] that is having at least 1 RBC transfusion every 8 weeks over a period of 4 months. Karyotype risk designation was according to the Spanish cytogenetic risk-stratification system [5] (low risk: normal karyotype or loss of chromosome Y as a single anomaly; intermediate risk: includes all the chromosomal abnormalities except those mentioned in low- and high-risk categories, and high risk: trisomy 8, abnormalities of chromosome 7 or complex karyotype (≥ 3 chromosomal abnormalities)).

The current study was approved by the institutional review boards.

2.2. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the statistical package for the social sciences (SPSS) software version 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). All p values were two-tailed and the threshold of statistical significance was p less than 0.05. Clinical and biological parameters were recorded at the time of diagnosis. Descriptive statistical analysis of the main characteristics of patients was performed. Categorical variables are reported as counts and relative frequencies and continuous variables are indicated as medians and ranges. To assess the prognostic impact of each of the variables that compose the score systems, 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; OS) or progression to acute myeloid leukemia (leukemia-free survival; LFS) and compared using the log-rank test. Multivariate analysis was performed (Cox model) to assess the independent impact of the variables that showed significance in the univariate analysis in order to select the variables with the best prognostic data in our series. The global prognostic scores were analyzed by univariate and multivariate analysis. In addition, Receiver Operating Characteristics (ROC) curves were plotted and the area under the ROC curve was calculated as an index for the predictive value of the model in terms of mortality and leukemia transformation. Lastly, the concordance index (C-index) was implemented to assess the score with the best discriminative power.

3. Results

3.1. Baseline characteristics

The main characteristics of 146 patients with WHO-defined CMML are shown in Table 1. The median age was 76 years (range 27–96 years) and 63% were males. One-hundred and twenty-nine (88%) had a CMML-1, 17 (12%) had a CMML-2, one-hundred and two (70%) had a CMML–MD and forty-four (30%) had a CMML–MP. Cytogenetic risk according to the Spanish CMML classification was assessed in one-hundred and twenty-six (86%) patients being low, intermediate, high or not available in 68%, 7%, 12% and 13%, respec-

Table 1
Main patient characteristics.

Characteristic	Median (range)	N (%)
Overall		146 (100)
Age, y	76 (27–96)	
<65		27 (18)
≥65		119 (82)
Gender		
Male		92 (63)
Female		54 (37)
WHO subtype		
CMML-1		129 (88)
CMML-2		17 (12)
Leukocyte count, $\times 10^9/L$	9 (1–98)	
$<13 \times 10^9/L$ (CMML-MD FAB subtype)		102 (70)
$\geq 13 \times 10^9/L$ (CMML-MP FAB subtype)		44 (30)
Hemoglobin level g/dL	11 (5–16)	
<10 g/dL		40 (27)
≥ 10 g/dL		106 (73)
Platelet count, $\times 10^9/L$	129 (7–1037)	
$<100 \times 10^9/L$		41 (28)
$\geq 100 \times 10^9/L$		105 (72)
Monocyte count, $\times 10^9/L$	1.5 (1–31)	
$<3 \times 10^9/L$		117 (80)
$\geq 3 \times 10^9/L$		29 (20)
Absolute lymphocyte count, $\times 10^9/L$	1.8 (0.3–14)	
$\leq 2.5 \times 10^9/L$		142 (97)
$>2.5 \times 10^9/L$		107 (75)
Presence of circulating IMC		
Absent		49 (34)
Present		94 (66)
Blasts in BM, %	2 (0–19)	
<5		109 (75)
5–9		22 (15)
10–19		15 (10)
RBC transfusion dependency		
No		114 (78)
Yes		32 (22)
AML evolution		31 (21)
Spanish cytogenetic risk stratification system		126 (86)
Low		99 (68)
Intermediate		10 (7)
High		17 (12)
MDAPS		127 (87)
Low		58 (46)
Intermediate-1		49 (39)
Intermediate-2		17 (13)
High		3 (2)
CPSS		126 (86)
Low		60 (48)
Intermediate-1		32 (25)
Intermediate-2		28 (22)
High		6 (5)
Mayo prognostic model		141 (97)
Low		32 (23)
Intermediate		57 (40)
High		52 (37)

WHO: World Health Organization; CMML: Chronic Myelomonocytic Leukemia; MD: Myelodysplastic; MP: Myeloproliferative; IMC: immature myeloid cells (myeloblasts, promyelocytes, myelocytes and metamyelocytes); BM: bone marrow; RBC transfusion dependency was defined as having at least 1 RBC transfusion every 8 weeks over a period of 4 months; AML: acute myeloid leukemia; Spanish cytogenetic risk-stratification system: low, normal and isolated -Y; intermediate, other abnormalities except those mentioned in low- and high-risk categories, and high, +8, abnormalities of chromosome 7 and complex karyotype (≥ 3 abnormalities); MDAPS: MD Anderson prognostic score; CPSS: CMML-specific prognostic scoring system.

tively. Circulating immature myeloid cells (IMC) were detected in 64% of patients.

The MDAPS could be calculated in 127 patients: 58 (46%) were classified as low, 49 (39%) as intermediate-1, 17 (13%) as intermediate-2 and 3 (2%) as high risk. The CPSS was assessed in 126 patients: 60 (48%) were classified as low, 32 (25%) as intermediate-1, 28 (22%) as intermediate-2 and 6 (5%) as high risk. Finally, the Mayo score was applied in 141 cases being low in 32 (23%), intermediate in 57 (40%) and high in 52 (37%). The median follow-up for surviving patients was 24.5 months and the median overall survival was 20 months (range 0–159 months).

3.2. Univariate and multivariate analysis of the variables that compose MDAPS, CPSS and Mayo prognostic model

Table 2 shows in detail the results of the univariate analysis for OS and LFS. All the variables that compose the CPSS (CMML-1 vs. CMML-2, transfusion requirement, CMML-MD vs. CMML-MP and Spanish CMML cytogenetic classification) had a prognostic impact in terms of OS ($p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$, $p=0.003$, respectively) and LFS ($p<0.001$, $p=0.007$, $p<0.001$, $p=0.012$, respectively). All of the MDAPS variables (Hb <120 g/L, ALC $>2.5 \times 10^9/L$, presence of circulating IMCs and BM blasts $\geq 10\%$) except the presence of circulating IMC impacted on OS ($p=0.006$, $p=0.042$, $p=0.339$, $p=0.002$, respectively) and only BM blasts $\geq 10\%$ was significantly associated with LFS ($p=0.273$, $p=0.167$, $p=0.098$, $p<0.001$, respectively). Lastly, each one of the variables that compose the Mayo prognostic model (AMC $>10 \times 10^9/L$, presence of circulating IMCs, Hb <100 g/L and platelet count $<100 \times 10^9/L$) had a prognostic impact in terms of OS with the exception of the presence of circulating IMC ($p=0.017$, $p=0.339$, $p<0.001$, $p=0.005$, respectively) and only AMC $>10 \times 10^9/L$ and Hb <100 g/L were significantly associated with LFS ($p<0.001$, $p=0.098$, $p=0.002$, $p=0.260$, respectively).

Table 3 shows in detail the results of Cox Regression analysis for OS. Five variables maintained their independent prognostic significance for OS after the multivariate analysis: platelet count $<100 \times 10^9/L$ (hazard ratio [HR], 3.63; 95% confidence interval [CI], 2.08–6.3; $p<0.001$), CMML-MP (HR, 3.62; 95% CI, 2–6.6; $p<0.001$), transfusion requirement (HR, 2.6; 95% CI, 1.3–5.1; $p=0.006$), CMML-2 (HR, 2.15; 95% CI, 1.07–4.3; $p=0.031$) and Spanish CMML cytogenetic classification (HR, 1.52; 95% CI, 1.11–2.07; $p=0.009$).

The variables that showed an independent adverse prognostic impact for LFS were: AMC $>10 \times 10^9/L$ (HR, 5.77; 95% CI, 1.04–32; $p=0.045$), CMML-2 (HR, 4.73; 95% CI, 1.54–14.6; $p=0.007$), platelet count $<100 \times 10^9/L$ (HR, 4.23; 95% CI, 1.6–11.16; $p=0.004$) and CMML-MP (HR, 4; 95% CI, 1.42–11.27; $p=0.009$).

It is of note that the variables referring to different levels of anemia (Hb <120 g/L, Hb <100 g/L and transfusion requirement) or BM blasts (CMML-2 and BM blasts $\geq 10\%$) were introduced in the multivariate analysis each time alone and the one with the highest HR and the lower p value was chosen for the definitive analysis.

3.3. Comparison of the prognostic scoring systems

MDAPS, CPSS and Mayo prognostic model were significantly associated with OS (Fig. 1A) and LFS in the univariate survival analysis (OS: $p<0.001$ for all of them; LFS: $p<0.001$, $p<0.001$, $p=0.002$, respectively). Although the MDAPS was capable to segregate the patients into four prognostic categories for the OS, the Mayo prognostic model could not differentiate between low and intermediate-risk groups ($p=0.711$) and the CPSS was not capable to significantly discriminate between intermediate-1 and intermediate-2 risk categories ($p=0.358$). Nevertheless, just as the MDAPS, these were excellent to distinguish between low and high-risk CMML patients (Fig. 1B). An accurate detection of low-risk patients is crucial in order to prevent them from

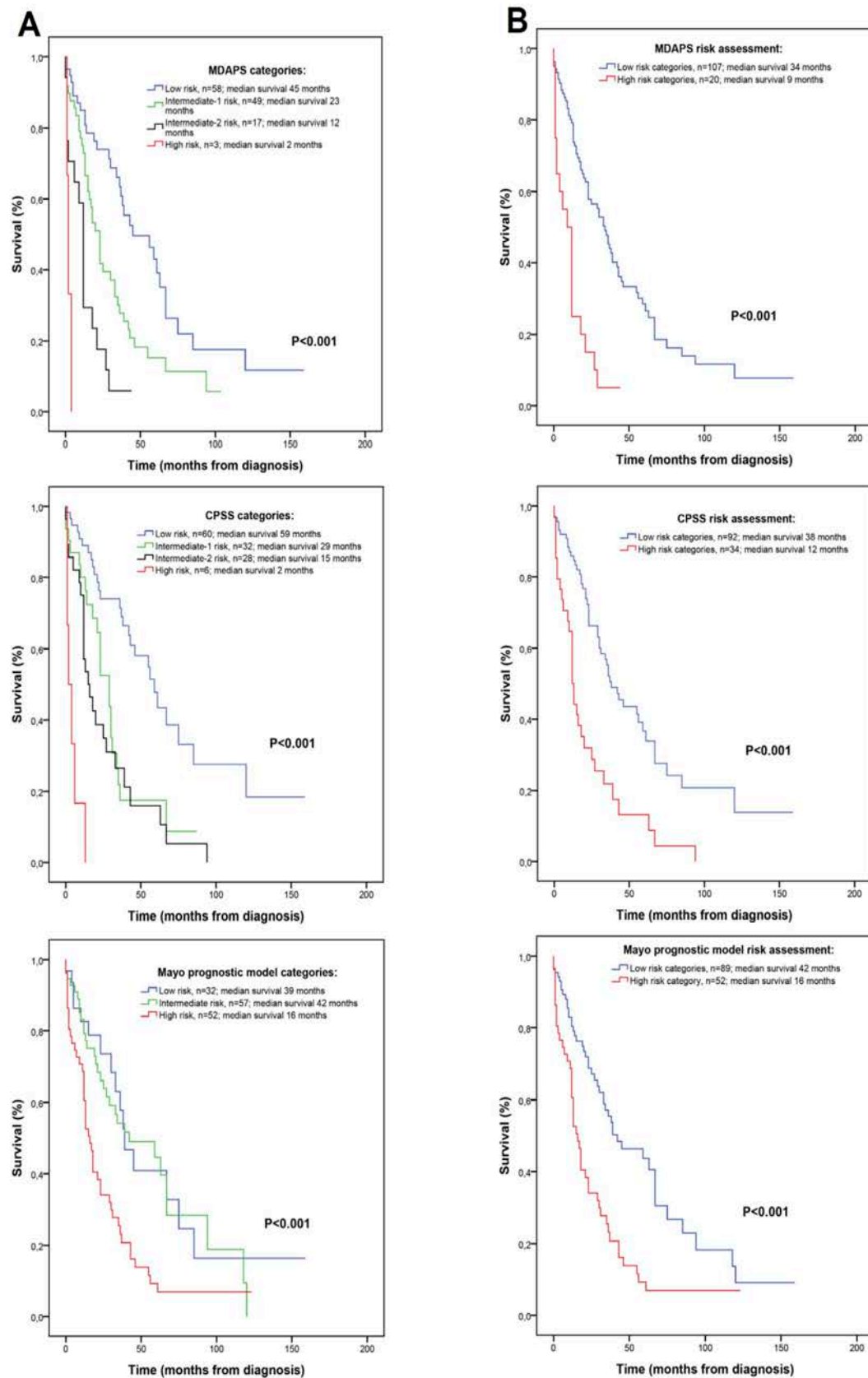


Fig. 1. A. Overall survival of CMML patients according to the MDAPS, CPSS and the Mayo prognostic model. B. Overall survival of high- and low-risk CMML patients according to the MDAPS, CPSS and the Mayo prognostic model.

Table 2

OS and LFS according to the variables that compose the MDAPS, the CPSS and the Mayo prognostic model.

Characteristic	N	(%)	OS		LFS	
			Median (mo)	Log-rank (P)	Median (mo)	Log-rank (P)
Overall	146	(100)	20		18.5	
CPSS						
CMML-1 vs. CMML-2	146	(100)	35 vs. 12	<0.001	NR vs 11	<0.001
CMML-MD vs. CMML-MP	146	(100)	43 vs. 13	<0.001	NR vs 22	<0.001
RBC transfusion dependency	146	(100)	36 vs. 13	<0.001	NR	0.007
Spanish cytogenetic risk-stratification system (low vs int. vs high)	126	(86)	36 vs 25 vs 12	0.003	NR vs 18 vs NR	0.012
MDAPS						
Hb < 120 g/L	146	(100)	43 vs 21	0.006	NR	0.273
ALC > 2.5 × 10 ⁹ /L	142	(97)	37 vs 23	0.042	NR	0.167
Circulating IMC (absent vs present)	143	(98)	36 vs 29	0.339	NR	0.098
Blasts in BM ≥ 10%	144	(99)	34 vs 12	<0.001	NR vs 11	<0.001
Mayo prognostic model						
Hb < 100 g/L	146	(100)	38 vs 13	<0.001	NR	0.002
Monocyte count > 10 × 10 ⁹ /L	143	(98)	33 vs 4	0.017	NR vs 3	<0.001
Platelet count < 100 × 10 ⁹ /L	146	(100)	36 vs 17	0.005	NR	0.260
Circulating IMC (absent vs present)	143	(98)	36 vs 29	0.339	NR	0.098

OS: overall survival; LFS: leukemia-free survival; CMML: Chronic myelomonocytic leukemia; CPSS: CMML-specific prognostic scoring system; MD: myelodysplastic, MP: myeloproliferative; RBC transfusion dependency: having at least 1 RBC transfusion every 8 weeks over a period of 4 months; Spanish cytogenetic risk-stratification system: low, normal and isolated -Y; intermediate, other abnormalities except those mentioned in low- and high-risk categories, and high, +8, abnormalities of chromosome 7 and complex karyotype (≥ 3 abnormalities); MDAPS: MD Anderson prognostic score; Hb: Hemoglobin; ALC: absolute lymphocyte count; IMC: immature myeloid cells (myeloblasts, promyelocytes, myelocytes and metamyelocytes); BM: bone marrow; NR: not reached.

treatment that potentially is not necessary avoiding needless toxicity (hypomethylating agents, intensive chemotherapy, allogeneic stem cell transplantation, ...).

The three prognostic scores were contrasted in a multivariate analysis and all of them maintained its significance for OS showing a very similar HR value. The variables introduced in the analysis were: age (HR, 1.02; 95% CI, 0.997–1.04; $p=0.088$), sex (HR, 1.53; 95% CI, 0.93–2.5; $p=0.094$), MDAPS (HR, 1.75; 95% CI, 1.18–2.6; $p=0.006$), CPSS (HR, 1.65; 95% CI, 1.25–2.18; $p<0.001$) and Mayo prognostic model (HR, 1.49; 95% CI, 1.01–2.18; $p=0.043$).

Finally, when comparing the prognostic value of the models using the concordance index (C-index) and the value of the area under the receiver operating characteristic (ROC) curve, the CPSS showed a slightly better predictive value for mortality and acute myeloid leukemia evolution (Table 4).

3.4. Proposal of a modified CPSS including platelet count information: CPSS-P.

After detecting the variables with the highest weight in the multivariate analysis, we developed a prognostic model based on those. It is worth mentioning that the variables selected were those that conform the CPSS plus platelet count < 100 × 10⁹/L. Based on this data and since platelet count < 100 × 10⁹/L presented the highest hazard ratio in the multivariate analysis, CPSS-P was constructed by recalculating the CPSS, upgrading one step up in terms of risk those patients with this particular feature (Table 5). After applying the CPSS-P to our series, this score showed an excellent capability to segregate four prognostic groups (Fig. 2) and presented the highest C-index value (OS: 0.78; LFS: 0.72) and the biggest area under the ROC curve (OS: 0.86; LFS: 0.73). After substituting CPSS for CPSS-P

Table 3

Multivariate OS and LFS analysis of the variables that compose the MDAPS, the CPSS and the Mayo prognostic model.

Characteristic	N	(%)	OS		LFS	
			Hazard Ratio (HR)	Cox analysis (P-value)	Hazard Ratio (HR)	Cox analysis (P-value)
CPSS						
CMML-1 vs. CMML-2 ²	146	(100)	2.15	0.031	4.73	0.007
CMML-MD vs. CMML-MP	146	(100)	3.62	<0.001	4	0.009
RBC transfusion dependency ¹	146	(100)	2.6	0.006	–	NS
Spanish cytogenetic risk-stratification system (low vs int. vs high)	126	(86)	1.52	0.009	–	NS
MDAPS						
Hb < 120 g/L ¹	146	(100)	–	NS	–	NS
ALC > 2.5 × 10 ⁹ /L	142	(97)	–	NS	–	NS
Circulating IMC (absent vs present)	143	(98)	–	NS	–	NS
Blasts in BM ≥ 10% ²	144	(99)	–	NS	–	NS
Mayo prognostic model						
Hb < 100 g/L ¹	146	(100)	–	NS	5.77	0.045
Monocyte count > 10 × 10 ⁹ /L	143	(98)	–	NS	4.23	0.004
Platelet count < 100 × 10 ⁹ /L	146	(100)	3.63	<0.001	–	–
Circulating IMC (absent vs present)	143	(98)	–	NS	–	–

OS: overall survival; LFS: leukemia-free survival; CMML: Chronic myelomonocytic leukemia; CPSS: CMML-specific prognostic scoring system; MD: myelodysplastic, MP: myeloproliferative; RBC transfusion dependency: having at least 1 RBC transfusion every 8 weeks over a period of 4 months; Spanish cytogenetic risk-stratification system: low, normal and isolated -Y; intermediate, other abnormalities except those mentioned in low- and high-risk categories, and high, +8, abnormalities of chromosome 7 and complex karyotype (≥ 3 abnormalities); MDAPS: MD Anderson prognostic score; Hb: Hemoglobin; ALC: absolute lymphocyte count; IMC: immature myeloid cells (myeloblasts, promyelocytes, myelocytes and metamyelocytes); AML: acute myeloid leukemia.

The variables referring to different levels of anemia¹ or bone marrow blasts² were introduced in the multivariable analysis each time alone and those with the highest HR and the lower p value (RBC transfusion dependency and CMML-2) were chosen for the definitive analysis.

Table 4

Comparison of the prognostic value for mortality and AML evolution of the MDAPS, the CPSS and the Mayo prognostic model using the concordance index (C-index) and receiver operating characteristic (ROC) curves.

Characteristic	Mortality			AML evolution		
	ROC (area)	CI 95%	C-index	ROC (area)	CI 95%	C-index
CPSS	0.803	0.72–0.88	0.726	0.700	0.59–0.81	0.699
MDAPS	0.732	0.64–0.83	0.713	0.644	0.52–0.77	0.639
Mayo prognostic model	0.724	0.63–0.82	0.682	0.676	0.57–0.78	0.675

AML: acute myeloid leukemia; MDAPS: MD Anderson prognostic score; CPSS: CMML-specific prognostic scoring system; CI: confidence interval.

Table 5

CPSS-P: modified CMML-specific prognostic scoring system (CPSS) including platelet count information ($<100 \times 10^9/L$).

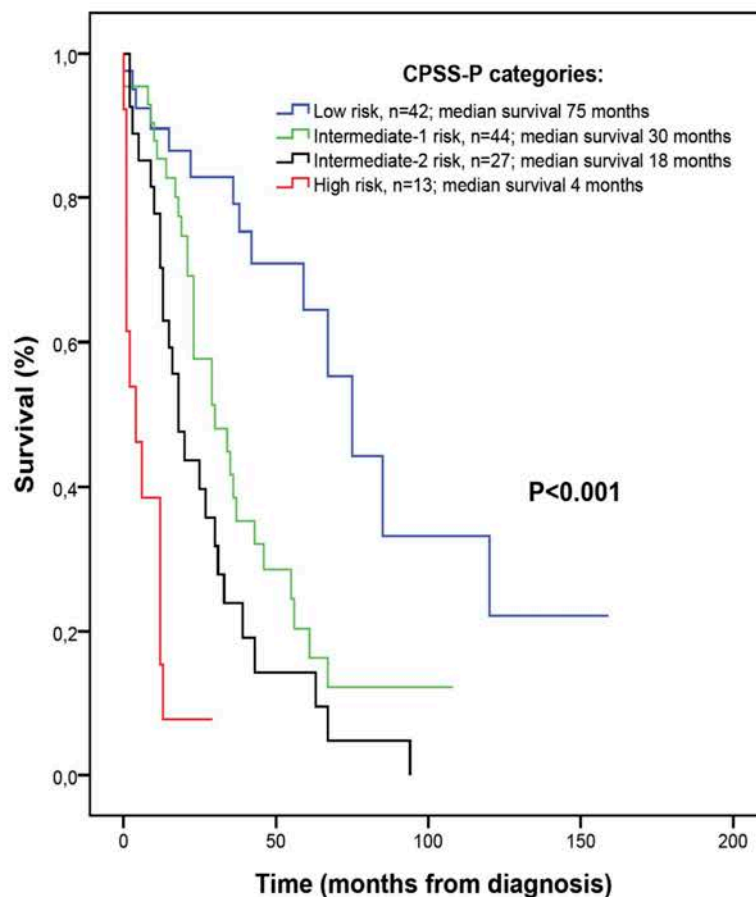
Variable	Values		
	0	1	2
WHO subtype	CMML-1	CMML-2	-
FAB subtype	CMML-MD	CMML-MP	-
CMML-specific cytogenetic risk classification	Low	Intermediate	High
RBC transfusion dependency	No	Yes	-

CPSS	
Risk group	Overall score
Low	0
Intermediate-1	1
Intermediate-2	2–3
High	4–5

If platelets $<100 \times 10^9/L$
upgrade one risk category

CPSS-P	
Risk group	Risk group
Low	Intermediate-1
Intermediate-1	Intermediate-2
Intermediate-2	High
High	High

CMML-Specific cytogenetic risk classification: low, normal and isolated -Y; intermediate, other abnormalities; and high, trisomy 8, complex karyotype (≥ 3 abnormalities) and abnormalities of chromosome 7. RBC transfusion dependency was defined as having at least 1 RBC transfusion every 8 weeks over a period of 4 months. CMML-1: blasts (including promonocytes) $<5\%$ in the PB and $<10\%$ in the BM. CMML-2: blasts (including promonocytes) from 5% to 19% in the PB and from 10% to 19% in the BM, or when Auer rods are present irrespective of blast count. CMML-MD (WBC count $<13 \times 10^9/L$). CMML-MP (WBC count $\geq 13 \times 10^9/L$).

**Fig. 2.** Overall survival of CMML patients according to CPSS-P.

in the multivariate analysis, it maintained its significance showing the highest HR and the lowest *p* value (HR, 1.98; 95% CI, 1.45–2.68; *p* < 0.001). In future studies, it would be interesting to validate the modified CPSS in an independent cohort of CMML patients.

4. Discussion

This study, based on a series of 146 CMML patients, confirms the prognostic value of the scores assessed: CPSS, MDAPS and Mayo prognostic model.

CMML patients present overlapping features of myeloproliferative neoplasms and MDS adding increasing ambiguity in terms of diagnosis and prognosis. Despite the existence of specific prognostic scoring systems [8,9,13–17,24], IPSS [11] has been the most used score for the evaluation of CMML, although it is not applicable for proliferative variants. Since the publication of the MDAPS [13] in 2002, it has been the most specific and powerful prognostic tool for CMML. Due to the recent emergence of the CPSS [14] and the Mayo prognostic model [16], we sought to determine their usefulness in our series and these scores were compared with MDAPS to identify the index with the best capability to discriminate between high and low-risk patients. In spite of the recent publication of prognostic scores based on clinical and molecular variables (*ASXL1* mutation status) [15,17], we considered of interest to compare those scores based only on clinical variables, since they are realistically the only ones applicable to daily clinical practice. On the other hand, the GFM group supported *ASXL1* mutation as an independent adverse prognostic factor for CMML, but it was not initially supported by the Mayo Clinic group [16]. Nonetheless, as it has been showed in a recent publication [17], after combining the data of these two groups, *ASXL1* mutation (nonsense and frameshift) confirmed its independent prognostic value in terms of overall survival (OS) but not on leukemic transformation. The inclusion of *ASXL1* mutational status to the Mayo prognostic model gave way to the Mayo Molecular Model (MMM), a new robust index that was superior in stratifying risk in low-risk patients than the GFM model [17].

Our data confirmed the prognostic validity of all variables that compose the three scores with the exception of circulating immature myeloid cells (IMC), which is a shared variable by the MDAPS and the Mayo prognostic model. This feature was common in the 64% of our patients, which is in the normal range based on the one observed in the Mayo Clinic series (49% of patients) or in the MD-Anderson series (78% of patients). In the same line with our findings, the Düsseldorf group of MDS did not confirm the adverse prognostic value of this variable [25]. It is of note that the value of peripheral blood lymphocytosis (lymphocyte count >2500/ μ l) was significantly associated with survival in our series as it was previously shown in the CMML M.D. Anderson Cancer Center, Mayo Clinic and Düsseldorf cohorts. This suggests that lymphocytes could be specifically relevant to the biology of CMML and therefore it would be interesting to study functionally the lymphocyte populations in CMML patients.

All three prognostic scoring systems were a strong effective tool for the discrimination between high and low-risk patients in our series. All of them showed a good capability for the prediction of survival or AML transformation, but the CPSS presented a slightly better predictive value. It is worth mentioning that in line with the new guidelines of the Spanish group of MDS (GESMD), which considered as low-risk MDS patients those with an expected median overall survival above 30 months [26], the low-risk CMML patients defined by the three scores presented a median overall survival over 30 months (Fig. 1B).

The parameters composing the three prognostic scores were compared in a multivariate analysis in our series in an attempt

to define those variables with the higher strength in terms of OS and LFS. All the variables that compose the CPSS and a platelet count <100 $\times$ 10⁹/L retained their significance. Based on this data and since platelet count <100 $\times$ 10⁹/L presented the highest hazard ratio in the multivariate analysis, CPSS-P was constructed by recalculating the CPSS, upgrading one step up in terms of risk those patients with this particular feature. Unquestionably, cytogenetics give valuable prognostic information about CMML patients, but since the majority of patients do not have cytogenetic alterations [5] the prognostic information that it provides is only useful for a small number of patients. Based on our findings platelet count should be taken into account by clinicians for a better risk assessment of CMML patients. In our series, CPSS-P emerged as the index with the higher capability for predicting survival and AML transformation of CMML patients.

The present study reinforces the validity of the CPSS, the MDAPS and the Mayo prognostic model for the risk assessment of CMML patients. Moreover, by including the platelet count information to the CPSS improved the prediction capacity for overall and leukemia-free survival. It is of importance to remark that platelet count information could help to better stratify CMML patients, being of special value in the subset of patients with normal karyotype. However, further studies would be necessary to corroborate the use of CPSS-P as an improved version of CPSS.

Conflict of interests

None of the authors have any conflicts of interest or disclosures.

Author contributions

XC designed the study, collected data, performed statistical analysis and wrote the paper. MN, RS, NM and DC collected data and reviewed the paper. AP performed statistical analysis and reviewed the paper. NE, BX and JE collected data and reviewed the paper. BN designed the study, analyzed data and reviewed the paper.

Acknowledgements

This work has been supported by the “Emili Letang” Grant (2011) from Hospital Clínic of Barcelona.

References

- [1] A. Orazi, J.M. Bennett, U. Germing, R.D. Brunning, B.J. Bain, J. Thiele, Chronic myelomonocytic leukaemia, in: WHO Classif. Tumours Haematop. Lymphoid Tissues, France: IARC Press, Lyon, 2008, pp. 76–79.
- [2] J.M. Bennett, D. Catovsky, M.T. Daniel, G. Flandrin, D.A. Galton, H. Gralnick, et al., The chronic myeloid leukaemias: guidelines for distinguishing chronic granulocytic, atypical chronic myeloid, and chronic myelomonocytic leukaemia. Proposals by the French-American-British cooperative leukaemia group, *Br. J. Haematol.* 87 (1994) 746–754.
- [3] M. Breccia, R. Latagliata, A. Mengarelli, F. Biondo, F. Mandelli, G. Alimena, Prognostic factors in myelodysplastic and myeloproliferative types of chronic myelomonocytic leukemia: a retrospective analysis of 83 patients from a single institution, *Haematologica* 89 (2004) 866–868.
- [4] U. Germing, C. Strupp, S. Knipp, A. Kuendgen, A. Giagounidis, B. Hildebrandt, et al., Chronic myelomonocytic leukemia in the light of the WHO proposals, *Haematologica* 92 (2007) 974–977.
- [5] E. Such, J. Cervera, D. Costa, F. Solé, T. Vallespi, E. Luño, et al., Cytogenetic risk stratification in chronic myelomonocytic leukemia, *Haematologica* 96 (2011) 375–383.
- [6] P. Fenaux, R. Beuscart, J.L. Lai, J.P. Jouet, F. Bauters, Prognostic factors in adult chronic myelomonocytic leukemia: an analysis of 107 cases, *J. Clin. Oncol.* 6 (1988) 1417–1424.
- [7] U. Germing, A. Kündgen, N. Gattermann, Risk assessment in chronic myelomonocytic leukemia (CMML), *Leuk. Lymphoma* 45 (2004) 1311–1318.
- [8] A. Worsley, D.G. Oscier, J. Stevens, S. Darlow, A. Figs, G.J. Mufti, et al., Prognostic features of chronic myelomonocytic leukaemia: a modified Bournemouth score gives the best prediction of survival, *Br. J. Haematol.* 68 (1988) 17–21.

- [9] I. González-Medina, J. Bueno, A. Torrecabrada, A. López, T. Vallespi, I. Massagué, Two groups of chronic myelomonocytic leukaemia: myelodysplastic and myeloproliferative. Prognostic implications in a series of a single center, *Leuk. Res.* 26 (2002) 821–824.
- [10] C. Aul, N. Gattermann, A. Heyll, U. Germing, G. Derigs, W. Schneider, Primary myelodysplastic syndromes: analysis of prognostic factors in 235 patients and proposals for an improved scoring system, *Leukemia* 6 (1992) 52–59.
- [11] P. Greenberg, C. Cox, M.M. LeBeau, P. Fenau, P. Morel, G. Sanz, et al., International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes, *Blood* 89 (1997) 2079–2088.
- [12] P.L. Greenberg, H. Tuechler, J. Schanz, G. Sanz, G. Garcia-Manero, F. Solé, et al., Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes, *Blood* 120 (2012) 2454–2465.
- [13] F. Onida, H.M. Kantarjian, T.L. Smith, G. Ball, M.J. Keating, E.H. Estey, et al., Prognostic factors and scoring systems in chronic myelomonocytic leukemia: a retrospective analysis of 213 patients, *Blood* 99 (2002) 840–849.
- [14] E. Such, U. Germing, L. Malcovati, J. Cervera, A. Kuendgen, M.G. Della Porta, et al., Development and validation of a prognostic scoring system for patients with chronic myelomonocytic leukemia, *Blood* 121 (2013) 3005–3015.
- [15] R. Itzykson, O. Kosmider, A. Renneville, V. Gelsi-Boyer, M. Meggendorfer, M. Morabito, et al., Prognostic score including gene mutations in chronic myelomonocytic leukemia, *J. Clin. Oncol.* 31 (2013) 2428–2436.
- [16] M.M. Patnaik, E. Padron, R.R. LaBorde, T.L. Lasho, C.M. Finke, C.A. Hanson, et al., Mayo prognostic model for WHO-defined chronic myelomonocytic leukemia: ASXL1 and spliceosome component mutations and outcomes, *Leukemia* 27 (2013) 1504–1510.
- [17] M.M. Patnaik, R. Itzykson, T.L. Lasho, O. Kosmider, C.M. Finke, C.A. Hanson, et al., ASXL1 and SETBP1 mutations and their prognostic contribution in chronic myelomonocytic leukemia: a two-center study of 466 patients, *Leukemia* 28 (11) (2014) 2206–2212.
- [18] V. Gelsi-Boyer, V. Trouplin, J. Roquain, J. Adélaïde, N. Carbuccion, B. Esterni, et al., ASXL1 mutation is associated with poor prognosis and acute transformation in chronic myelomonocytic leukaemia, *Br. J. Haematol.* 151 (4) (2010) 365–375.
- [19] O. Abdel-Wahab, A. Pardanani, J. Patel, M. Wadleigh, T. Lasho, A. Heguy, et al., Concomitant analysis of EZH2 and ASXL1 mutations in myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and blast-phase myeloproliferative neoplasms, *Leukemia* 25 (7) (2011) 1200–1202.
- [20] N. Cervera, R. Itzykson, E. Coppin, T. Prebet, A. Murati, S. Legall, et al., Gene mutations differently impact the prognosis of the myelodysplastic and myeloproliferative classes of chronic myelomonocytic leukemia, *Am. J. Hematol.* 89 (6) (2014) 604–609.
- [21] E.A. Wassie, R. Itzykson, T.L. Lasho, O. Kosmider, C.M. Finke, C.A. Hanson, et al., Molecular and prognostic correlates of cytogenetic abnormalities in chronic myelomonocytic leukemia: a Mayo clinic-French consortium study, *Am. J. Hematol.* 89 (12) (2014) 1111–1115.
- [22] V. Gelsi-Boyer, M. Brecqueville, R. Devillier, A. Murati, M.-J. Mozziconacci, D. Birnbaum, Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases, *J. Hematol. Oncol.* 5 (2012) 12.
- [23] L. Malcovati, U. Germing, A. Kuendgen, M.G. Della Porta, C. Pascutto, R. Invernizzi, et al., Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes, *J. Clin. Oncol.* 25 (2007) 3503–3510.
- [24] M. Beran, S. Wen, Y. Shen, F. Onida, J. Jelinek, J. Cortes, et al., Prognostic factors and risk assessment in chronic myelomonocytic leukemia: validation study of the M.D. Anderson prognostic scoring system, *Leuk. Lymphoma* 48 (2007) 1150–1160.
- [25] U. Germing, C. Strupp, M. Aivado, N. Gattermann, New prognostic parameters for chronic myelomonocytic leukemia, *Blood* 100 (2002) 731–732.
- [26] 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, *Haematol. Esp.* 97 (2012) 11–14.

IV. DISCUSSIÓ

Les SMD són un grup de patologies clonals de la cèl·lula mare hematopoètica que presenten una elevada heterogeneïtat fenotípica que es reflecteix en una elevada diversitat pronòstica. Els diferents subtipus de SMD s'agrupen per la presència de: citopènies, displàsia morfològica, anomalies genètiques recurrents i increment en el percentatge medul·lar de blasts. Aquestes característiques definitòries permetran establir-ne el seu diagnòstic i han estat reconegudes com els principals determinants pronòstics de la malaltia. Realitzar una adequada estratificació pronòstica dels pacients és fonamental, ja que sota el mateix diagnòstic s'inclouen des de pacients amb supervivències estimades de més d'una dècada a formes molt agressives amb supervivències projectades de menys d'un any. En la pràctica clínica habitual l'elecció de tractament dependrà de la categoria de risc a la qual assignem els pacients, és a dir, fonamentalment si considerem al pacient de baix o d'alt risc. Establir aquesta distinció de forma adequada és cabdal ja que l'objectiu del tractament varia entre aquests dos grups de pacients: l'objectiu principal del tractament dels pacients de baix risc és millorar la qualitat de vida que estarà condicionada, sobretot, pel seu grau d'anèmia; mentre que en els pacients d'alt risc l'objectiu primordial es focalitzarà en intentar perllongar la seva supervivència i endarrerir la transformació leucèmica. Els diferents índexs pronòstics prèviament exposats són eines molt efectives per a la predicció del risc de les SMD, però és fonamental desenvolupar estratègies per a la detecció de pacients adscrits a les categories de baix risc però que en realitat presenten un comportament clínic més propi dels de les categories d'alt risc.

De la mateixa manera que succeeix amb les SMD, els pacients diagnosticats amb LMMC també presenten una elevada heterogeneïtat pronòstica i, per tant, les decisions de tractament també seran adaptades al risc. En aquest sentit, l'índex pronòstic proposat pel GESMD, el CPSS, ha estat l'eina amb la millor acceptació internacional per a l'estratificació pronòstica dels pacients amb LMMC (Such *et al*, 2013). Tot i així la recerca de nous factors pronòstics que permetin millorar la precisió pronòstica dels índexs existents és fonamental per establir el risc individual de cada pacient de forma més exacta.

A continuació es discuteixen les aportacions que els diferents treballs que componen la present tesi han aportat a l'avaluació pronòstica de les SMD i de la LMMC.

Primer treball

Es va avaluar l'impacte pronòstic dels nivells globals de metilació i hidroximetilació utilitzant anticossos específics contra les 5-mC i les 5-hmC de l'ADN total de moll d'os extret al diagnòstic de 90 pacients amb SMD *de novo*. Es va observar que els pacients amb els nivells més elevats de metilació global de l'ADN presentaven una menor supervivència i temps a la transformació leucèmica. Així mateix, el seu impacte pronòstic advers es va mantenir en ajustar-lo per l'edat, sexe, IPSS i requeriment transfusional en una anàlisi multivariable (regressió de Cox). Per tant, els nivells elevats de metilació global de l'ADN es van erigir com un factor pronòstic advers independent per a la supervivència i el temps a la transformació leucèmica en la nostra sèrie. La troballa més interessant de l'estudi fou que el nostre mètode va permetre detectar pacients adscrits a les categories de baix risc de l'IPSS, WPSS i IPSS-R que presentaven supervivències globals pròpies dels pacients d'alt risc. Així mateix, els nivells elevats de metilació global de l'ADN no es van correlacionar significativament amb cap dels factors pronòstics clàssics analitzats: categories pronòstiques de l'IPSS, WPSS o IPSS-R; categories de risc citogenètic de l'IPSS o IPSS-R; recompte de plaquetes; xifra de neutròfils; nivell d'hemoglobina; percentatge medul·lar de blasts, i requeriment transfusional. Això suggereix que el seu impacte pronòstic advers no es recull de forma indirecta per cap dels determinants pronòstics principals en les SMD. Si aquestes troballes fossin corroborades en sèries més llargues de pacients, aquest mètode senzill i econòmic podria integrar-se en l'estratificació pronòstica basal dels pacients.

La majoria de les dades publicades sobre la influència de la metilació de l'ADN en el pronòstic dels pacients amb SMD es basen en estudis de gens únics (Lin *et al*, 2008; Tien *et al*, 2001; Wu *et al*, 2006; Quesnel *et al*, 1998; Fan *et al*, 2012, 2014; Chaubey *et al*, 2015; Zhang *et al*, 2016; Wu *et al*, 2017; Wang *et al*, 2017) o de conjunts de gens (Aggerholm *et al*, 2006; Shen *et al*, 2010; Zhao *et al*, 2014). Per contra, existeixen molt poques dades sobre l'impacte pronòstic dels nivells globals

de metilació al diagnòstic (Poloni *et al*, 2013; Figueroa *et al*, 2009; Jiang *et al*, 2009), i alguns dels estudis que ho han investigat presenten el principal inconvenient que les tècniques d'anàlisi utilitzades, basades en la conversió per bisulfit, no permeten diferenciar entre les 5-mC i les 5-hmC (Huang *et al*, 2010). Poloni i col·laboradors publicaren l'any 2013, l'únic estudi que analitzà l'impacte dels nivells globals de metilació en les SMD i que permetia diferenciar adequadament entre 5-mC i 5-hmC. En línia amb les nostres troballes, els autors observaren que la presència d'uns nivells elevats de metilació global de l'ADN, analitzats per immunohistoquímica (anticossos anti-5-mC) a les biòpsies de moll d'os (BMO), era un factor pronòstic advers independent per a la supervivència en la seva sèrie de pacients (Poloni *et al*, 2013). Recentment, Chandra i col·laboradors analitzaren els nivells globals de 5-mC per immunohistoquímica a les BMO de 59 pacients amb SMD i reproduïren els resultats de Poloni i col·laboradors en observar un impacte pronòstic advers per a la supervivència i per a la progressió a LMA (Chandra *et al*, 2017).

Malgrat que els resultats obtinguts són prometedors, la principal debilitat de les nostres troballes és que el mètode d'ELISA utilitzat no ha estat comparat amb altres mètodes ben establerts d'anàlisi de la metilació basats en la conversió per bisulfit (microarrays de metilació, NGS, piroseqüenciació) (Grønbæk *et al*, 2012), malgrat que com hem comentat, aquests últims no diferencien adequadament les 5-mC de les 5-hmC (Huang *et al*, 2010). En aquest sentit, Poloni i col·laboradors trobaren una bona correlació entre els nivells de metilació global de l'ADN analitzats per immunohistoquímica i els nivells de metilació de les seqüències LINE1 utilitzant el mètode COBRA i la piroseqüenciació (Poloni *et al*, 2013). El grau de la metilació de les seqüències repetitives LINE1 (*long interspersed nuclear element*) es considera com un subrogat directe de la metilació global de l'ADN i és un dels mètodes d'estudi de la metilació global de l'ADN més àmpliament acceptat (Grønbæk *et al*, 2012).

Existeixen molts pocs estudis a la literatura que analitzin la influència de la metilació de gens únics (Follo *et al*, 2009a, 2009b, 2011, 2012) o de grups de gens (Shen *et al*, 2010) en la resposta als fàrmacs inhibidors de la DNA metiltransferasa i no n'hi ha cap que avaluï si els nivells globals de metilació o de hidroximetilació

al diagnòstic poden ser un bon predictor de resposta als fàrmacs hipometilants. Follo i col·laboradors mostraren que el promotor del gen PI-PLCbeta1 es troba hipermetilat en les SMD d'alt risc i que uns nivells incrementats de RNA missatger de PI-PLCbeta1 podien predir la resposta a azacitidina (Follo *et al*, 2009b). Shen i col·laboradors observaren que la reducció dels nivells de metilació durant el tractament amb decitabina s'associava a una millor resposta al fàrmac, tot i així, no trobaren cap associació entre els nivells basals de metilació i la resposta a decitabina (Shen *et al*, 2010).

La hidroximetilació ha estat descrit com un mecanisme de desmetilació passiva (Guo *et al*, 2011). Els nivells d'hidroximetilació global de l'ADN no impactaren ni en la supervivència ni en la transformació leucèmica dels pacients de la nostra sèrie. Partint de l'evidència indirecta dels fàrmacs hipometilants, únic tractament capaç d'allargar la supervivència de forma significativa en les SMD d'alt risc (Fenaux *et al*, 2009) en induir citotoxicitat directa i hipometilació global, era plausible pensar que els nivells elevats d'hidroximetilació podrien haver-se erigit com un factor de bon pronòstic. El mecanisme de la hidroxilació de les 5-mC depèn de que la via funcional en què s'integren els gens *TET2* i *IDH* funcioni de forma adequada. Diferents estudis han demostrat que les mutacions de *TET2* s'associen a la reducció dels nivells globals d'hidroximetilació (Ko *et al*, 2010; Delhommeau *et al*, 2009). En els primers estudis analitzant l'impacte pronòstic de la mutació de *TET2*, aquesta es va mostrar com un factor independent de bon pronòstic (Kosmider *et al*, 2009), però aquesta troballa no es va confirmar en estudis posteriors (Smith *et al*, 2010; Bejar *et al*, 2011b; Papaemmanuil *et al*, 2013; Haferlach *et al*, 2014). L'any 2013, Liu i col·laboradors mostraren que la disminució dels nivells d'hidroximetilació s'associava a la mutació de *TET2* i, en contra de l'observat al nostre estudi, els pacients amb els nivells més baixos d'hidroximetilació presentaven una menor supervivència global (Liu *et al*, 2013). Fins on arriba el nostre coneixement, aquest i el nostre estudi són els únics de la literatura que analitzen l'impacte pronòstic dels nivells d'hidroximetilació global de l'ADN.

La presència de mutacions a *TET2* permet predir la resposta als fàrmacs hipometilants (Itzykson *et al*, 2011; Bejar *et al*, 2014a), especialment en absència de mutacions d'*ASXL1* (Bejar *et al*, 2014a). Aquesta troballa permet inferir que els

nivells baixos d'hidroximetilació global de l'ADN podrien ser un bon predictor de resposta a aquests tractaments. No obstant això, no hi ha estudis a la literatura que hagin investigat aquest aspecte.

En conclusió, els resultats del nostre estudi recolzen l'ús d'aquest mètode senzill, ràpid i barat per a la determinació dels nivells globals de metilació. Si l'impacte pronòstic advers dels nivells elevats de metilació global de l'ADN són corroborats per sèries més llargues de pacients, aquesta informació podria ser integrada dintre de la rutina pronòstica de les SMD. La troballa més important del nostre estudi és que mitjançant aquesta mesura podem detectar pacients catalogats de baix risc amb supervivències estimades pròpies dels pacients d'alt risc.

Segon treball

En aquest estudi s'analitzaren les característiques clínico-biològiques de 465 SMD amb predominança eritroide (SMD-E), la sèrie més llarga de publicada a la literatura. S'entén per predominança eritroide a la presència d'un 50% o més d'eritroblasts a MO. Tanmateix s'estudià un grup control de 3227 pacients amb SMD sense expansió de la sèrie eritroide. La presència d'un 50% o més eritroblasts a MO no és una troballa infreqüent en les SMD, observant-se aproximadament en el 15% dels casos. Malgrat això, les SMD-E no representen un subgrup específic a la classificació de la OMS 2008, ja que no presenten característiques clíniques o citogenètiques distintives (Wong & Juneja, 2015; Mazzella *et al*, 2006). A la OMS 2017, tot i que continuen sense representar un subtipus específic, es dedica un subapartat sencer dintre de les SMD amb excés de blasts a les "SMD amb excés de blasts i predominança eritroide". En aquest subapartat s'esmenta que la significació de la predominança eritroide en aquests casos és incerta i que el percentatge medul·lar d'eritroblasts pot presentar fluctuacions basades en factors exògens com el tractament o les deficiències metabòliques (Wang & Hasserjian, 2012). S'especifica, a més, que les SMD amb excés de blasts i predominança eritroide acostumen a presentar cariotips d'alt risc i mutacions associades a un mal pronòstic com *RUNX1*, *TP53* o *ASXL1* (Grossmann *et al*, 2013; Hasserjian *et al*, 2010). Com comentarem específicament al quart treball de la present tesi, la majoria de les eritroleucèmies passaran a considerar-se SMD amb excés de blasts

amb predominança eritroide a la classificació de l'OMS 2017 (Swerdlow *et al*, 2017). A la nostra sèrie, els pacients amb SMD-E presentaren una supervivència global similar a la dels pacients del grup control, encara que aquests últims mostraren una mitjana del percentatge de blasts a MO que doblava a la dels SMD-E (3,99% vs. 1,82%). Aquesta troballa era esperable ja que els pacients amb SMD-E amb 10-19% de blasts acomplien els criteris diagnòstics de l'eritroleucèmia i foren exclosos de l'anàlisi. Ens va semblar rellevant, però, que no s'observessin diferències significatives de supervivència entre els dos grups, ja que l'impacte pronòstic advers del percentatge de blasts a MO ha estat àmpliament reportat a la literatura. Quan s'analitzà la mitjana del percentatge de blasts a MO en base a la cel·lularitat no eritroide, el grup control continuava presentant una mitjana significativament més elevada, però la diferència era menys marcada (5,73% vs. 4,38%) (anàlisi no realitzada en el moment de la confecció de l'article). Aquest fet permetia inferir que considerar el percentatge de blasts de la cel·lularitat no eritroide (CNE) podia ser un bon mètode per homogeneïtzar el comptatge medul·lar de blasts entre els casos que presentaven grans diferències en el seu percentatge medul·lar d'eritroblasts. A més permetia deduir que podria tractar-se d'una bona estratègia a nivell pronòstic.

El comitè d'experts que elaboraren la classificació de l'OMS 2008 va transmetre una falta de consens sobre quin era el millor mètode per establir el percentatge de blasts en les SMD-E, si fer-ho en base a la CNE, com en l'eritroleucèmia, o bé en base a la totalitat cel·lular (TC). La recomanació final va ser que ens les SMD-E el recompte s'havia de realitzar en base a la cel·lularitat total, com en la resta de les SMD. Aquesta recomanació presentava l'inconvenient que el diagnòstic d'AREB-2 només es podia establir en aquells pocs pacients amb SMD-E en què el percentatge de blasts a MO fos menor d'un 10% però que presentessin 5-19% blasts a SP o blasts amb bastons d'Auer, ja que la presència d'un 10% de blasts a MO en el context de la predominança eritroide implica almenys un 20% de blasts de la CNE i obliga a establir el diagnòstic d'eritroleucèmia. En la nostra extensa sèrie de pacients no vàrem poder establir el diagnòstic d'AREB-2 segons els criteris de l'OMS 2008 a cap SMD-E. Per tot l'exposat, l'objectiu principal de l'estudi fou avaluar l'impacte d'ambdues maneres d'enumerar els blasts a MO en la

classificació i el pronòstic dels pacients amb SMD, inicialment en les SMD-E i posteriorment en totes les SMD de la nostra sèrie.

En realitzar el recompte de blasts de la CNE, un 22% de pacients amb SMD-E classificats en categories sense excés de blasts foren reclassificats en categories amb excés de blasts i presentaren una pitjor supervivència global que els pacients amb SMD-E que varen romandre en les categories inicials i que els pacients del grup control classificats en les categories sense excés de blasts. A més, mitjançant aquest mètode, 72 SMD-E foren recodificats com AREB-2. Aquest grup el conformaven 12 pacients que provenien de categories sense excés de blasts i tots els pacients diagnosticats d'AREB-1. Els 60 pacients amb AREB-1 amb predominança eritroide presentaven 5-9% blasts a MO en base a la cel·lularitat total i, per tant, varen ser considerats AREB-2 quan els blasts foren considerats de la CNE. Aquest fet implicava que les noves AREB-1 recodificades provenien del grup de SMD sense excés de blasts. Les AREB-2 recodificades mostraren una menor supervivència que les AREB-1 sense predominança eritroide del grup control. De la mateixa manera, els pacients amb SMD-E recodificats com AREB-2 en base a la CNE presentaren una menor supervivència que les AREB-1 recodificades. Aquestes troballes suggereixen que considerar els blasts de la cel·lularitat total en les SMD-E provoca una infravaloració del seu risc en assignar-los a una categoria de l'OMS. Els nostres resultats es troben en línia amb un estudi previ de Wang i col·laboradors en què estudiaren 74 pacients amb SMD-E i conclouien que enumerar els blasts de la CNE proporciona una millor estratificació pronòstica als pacients amb SMD-E (Wang *et al*, 2008).

La mitjana del percentatge d'eritroblasts a MO de les SMD-E era de 58%, però el grup de SMD sense predominança eritroide presentava una mitjana del 30%. Per tant aplicar el recompte de blasts de la CNE només a les SMD-E podria ocasionar un greuge comparatiu amb les SMD del grup control, ja que llavors podríem incórrer en l'error de subestimar el pes real del percentatge de blasts en aquest grup de pacients. Realitzar el recompte de blasts de la CNE, tal i com comentàvem prèviament, podria ser un bon mètode per homogeneïtzar el recompte de blasts entre ambdós grups de pacients. En base a aquest raonament vàrem analitzar la repercussió pronòstica de realitzar el comptatge de blasts de la CNE en tots els

pacients de la nostra sèrie. Això ens va permetre reassignar els pacients a les diferents categories de l'OMS 2008, que presentaven diferències significatives de supervivència. Cal destacar que no s'observaren diferències significatives de supervivència en cada una de les noves categories de l'OMS pel fet de presentar predominança eritroide. Aquesta troballa era especialment interessant en el grup de pacients que presentaven un 20% o més de blasts de la CNE. Les AREB-2 sense predominança eritroide amb un 20% o més de blasts de la CNE no mostraren diferències de supervivència significatives amb un grup d'eritroleucèmies incloses al registre del GESMD. Aquesta troballa demostra l'absència d'impacte pronòstic *per se* de la predominança eritroide i a més permet inferir que l'eritroleucèmia es troba en el contínuum de les SMD amb excés de blasts. Aquest aspecte serà àmpliament comentat en el quart treball de la present tesi. Un 12% de SMD classificades en les categories sense excés de blasts foren reclassificades en categories de major risc i mostraren una menor supervivència global que els pacients que varen romandre en les categories inicials.

Una altra limitació de la recomanació de l'OMS del 2008 era que no permetia classificar als pacients amb SMD-E en la categoria d'alt risc de l'IPSS. En recalculant l'IPSS considerant els blasts de la CNE en el grup de SMD-E, un 11% de pacients classificats en categories de baix risc de l'IPSS (baix, intermedi-1) foren reclassificats a categories d'alt risc (intermedi-2, alt) i presentaren una supervivència significativament menor que el grup del qual provenien. De la mateixa manera, en recalculant l'IPSS en tota la sèrie de pacients, un 8,4% de pacients classificats en categories de baix risc de l'IPSS foren reclassificats a categories d'alt risc i també presentaren una supervivència significativament menor. La mediana de supervivència del grup de pacients que van ascendir de categoria era l'esperable en els pacients d'alt risc (mediana de supervivència d'aproximadament 30 mesos). Aquests resultats estan en línia amb la proposta del GESMD, que considera a un pacient d'alt risc si presenta una mediana estimada de supervivència global inferior a 30 mesos.

Per tal de reforçar els resultats de l'estudi en què es recollien retrospectivament dades de pacients diagnosticats entre els anys 1972 i 2015, vàrem analitzar si els canvis dels diferents estàndards terapèutics al llarg dels anys podrien haver

artefactat les troballes descrites. Vàrem dividir la sèrie en tres períodes temporals: 1972-1999, 2000-2007 i 2008-fins a l'actualitat. Aquestes franges pretenien reflectir l'increment de la indicació de transplantaments al·logènics en el període 2000-2007 i l'ús de l'azacitidina com a estàndard de tractament de les SMD d'alt risc a Espanya a partir del 2008. No s'observaren diferències significatives en comparar els pacients que van ascendir de categoria OMS quan es consideraren els blasts de la CNE amb els que no van ascendir-ne pel que fa a la distribució dels seus diagnòstics entre els períodes temporals prèviament esmentats. Aquesta troballa posa de manifest que la pitjor supervivència observada en el grup de pacients que van ascendir de categoria no s'explica perquè es diagnostiquessin en èpoques significativament diferents que els que van romandre a les categories inicials i que, per tant, no es pot argumentar que ambdós grups de pacients rebessin estàndards de tractament diferents.

Malgrat que les troballes descrites suggereixen que considerar els blasts de la CNE permet millorar l'estratificació pronòstica dels pacients amb SMD, la classificació de l'OMS 2017 ha eliminat la regla del comptatge de la cel·lularitat no eritroide. Tot i que aquesta mesura permet reclassificar els pacients amb eritroleucèmia en subtipus específics de SMD, va en contra de l'exposat al nostre treball, que aporta l'única evidència sòlida sobre la idoneïtat de considerar els blasts de la CNE. A més, assignar a una categoria OMS de SMD als pacients amb eritroleucèmia en base a la cel·lularitat medul·lar total pot fer que infravalorem el risc del subgrup d'eritroleucèmies amb un percentatge de blasts a MO inferior al 10%. Aquestes seran reassignades a la categoria de SMD-EB-1 o inclús a categories sense excés de blasts. Aquest punt serà àmpliament comentat en la discussió del quart article de la tesi.

Recentment han aparegut dues publicacions avaluant la idoneïtat de considerar els blasts de la CNE. Yu i col·laboradors estudiaren una extensa sèrie de 1283 SMD, 346 de les quals eren SMD-E. Varen basar el diagnòstic de les SMD en els criteris de l'OMS 2017, fet pel qual van incloure 90 antigues eritroleucèmies al seu anàlisi (26% de les SMD-E). Els autors, en línia amb els nostres resultats, van concloure que considerar els blasts de la CNE permet millorar l'avaluació pronòstica dels pacients amb SMD-E (Yu *et al*, 2017). Per contra, Bennett i col·laboradors no

trobaren avantatges significatives a nivell pronòstic en considerar els blasts de MO de la CNE en el context de la classificació de l'OMS ni en el de l'IPSS-R (Bennett *et al*, 2016). L'estudi es basava en una llarga sèrie de 1448 pacients del grup de Düsseldorf, però presentava el gran inconvenient que més de 900 pacients no disposaven d'informació citogenètica. Els autors van decidir assignar-los-hi un cariotip normal. Finalment l'IPSS-R va ser calculat en 1245 pacients. Això implica que en el supòsit que el 50% dels pacients dels quals es disposava d'informació citogenètica tinguessin un cariotip alterat, el percentatge de pacients de la sèrie analitzada amb cariotip normal seria d'aproximadament un 90%. Atès que un 30-50% de les SMD presenten anomalies citogenètiques, el biaix metodològic introduït en assumir un nombre tan elevat de pacients amb cariotip normal sembla molt gran. D'altra banda, la sèrie presentava nombrosos pacients amb un probable diagnòstic de leucèmia aguda eritroide. En aquest sentit, segons els autors un 20,5% de les seves AREB-2 presentaven predominança eritroide. És poc probable que es diagnosticuessin un 20,5% de les AREB-2 amb menys d'un 10% de blasts a MO però amb 5-19% blasts a SP o que fossin diagnosticades en aquest context per la presència de bastons d'Auer. Finalment, la idoneïtat de realitzar el recompte de blasts de la CNE l'analitzaren en base a un test estadístic de concordança, concretament amb el mètode *Dxy* per dades censurades a la dreta. Aquest es basa en el més habitualment utilitzat C-index ($Dxy=2x(C-index-0,5)$) i permet avaluar la precisió predictiva dels índexs pronòstics en termes de supervivència o transformació leucèmica. L'avantatge dels mètodes de concordança per dades censurades es que permeten comparar tant pacients que hagin presentat l'event a estudi com aquells que han estat censurats sense presentar l'event durant el seguiment. Aquests tests comparen parelles de pacients i consideren encerts del mètode analitzat (parells concordants) si els pacients classificats en categories de més alt risc presenten l'event a estudi (mort, transformació leucèmica) abans que aquells classificats en categories de més baix risc. Es poden comparar dos pacients que hagin mort i un pacient censurat amb un pacient que hagi mort si aquesta ha ocorregut abans que s'acabés el seguiment del pacient amb què es compara. En canvi, no es poden comparar dos pacients censurats ni un pacient que hagi mort més enllà del seguiment del pacient censurat amb què es compara (Katzman *et al*,

2016). El resultat del C-index es pot interpretar com el percentatge d'encerts del mètode pronòstic analitzat, mentre que el *Dxy* expressa la diferència entre els encerts i les errades. Per exemple, un *Dxy* de 0,3 s'interpreta com que el mètode detecta un 30% més de parells concordants que discordants. Com més relacionada està la causa de la mort d'un pacient amb la progressió de la seva malaltia, més precisos seran aquests tipus de tests per determinar quin és l'índex pronòstic amb major capacitat predictiva. Malauradament, la supervivència de les SMD pot estar condicionada per molts factors aliens a la malaltia (edat avançada, presència d'abundants comorbiditats, etc.), especialment en les SMD de baix risc, i per tant la informació que aporten els tests de concordança per a la predicció de la supervivència en les SMD, malgrat ser valuosa, ha d'ésser interpretada amb molta cautela. Per exemple, aquest tipus de tests interpretaria com a parell discordant si un pacient de 85 anys mort per un ictus isquèmic amb una SMD de baix risc diagnosticada fa mig any es comparés amb un pacient de 70 anys diagnosticat amb una SMD d'alt risc que mor a l'any del diagnòstic després d'haver evolucionat a una LMA. En aquest sentit, l'únic *outcome* que pot ser directament relacionat amb la progressió de la malaltia en les SMD és la transformació leucèmica, però aquesta es dona en un percentatge molt baix de pacients. Com veurem en el tercer treball de l'actual tesi, considerar el percentatge de blasts de la CNE per a calcular l'IPSS-R va permetre millorar l'estratificació pronòstica dels pacients amb SMD de la nostra sèrie.

Tercer treball

A l'OMS 2017 s'ha eliminat la regla del comptatge de blasts de la CNE. Tant els resultats comentats al segon treball de l'actual tesi com els que se n'extreuen d'aquest tercer treball no recolzen aquesta recomanació.

Els resultats d'aquest estudi es basen en una sèrie de 3924 pacients amb SMD, 498 dels quals presentaven predominança eritroide (SMD-E), la sèrie més llarga publicada a la literatura de pacients amb SMD amb informació sobre el percentatge medul·lar d'eritroblasts. Tal i com mostrà l'estudi prèviament comentat, considerar el percentatge de blasts medul·lars de la CNE millorà la predicció de risc de les SMD tant si s'aplicava per reassignar els pacients a les

categories de l'OMS 2008, com si s'usava per calcular l'IPSS. Malgrat la solidesa dels resultats exposats, avaluar la idoneïtat de la seva aplicació per calcular l'IPSS-R sembla una qüestió cabdal, ja que l'IPSS-R ha demostrat ser l'índex amb la major precisió pronòstica de tots els existents. No obstant presenta l'inconvenient de que no clarifica si els pacients classificats en la categoria de risc intermedi han d'ésser considerats de baix o alt risc, cosa que suposa una important limitació ja que el tractament de les SMD és adaptada al risc. Per tant, aplicar la regla del recompte de blasts de la CNE sembla una bona oportunitat per intentar millorar aquest conflictiu aspecte de l'IPSS-R.

En recalculer l'IPSS-R, un 24% dels pacients classificats a la categoria de risc intermedi de l'IPSS-R foren reclassificats a categories de major risc (alt i molt alt) i presentaren una menor supervivència global i un menor temps a l'evolució leucèmica que els pacients del grup del qual provenien. Els pacients de risc intermedi que van ascendir de categoria presentaven una mediana de supervivència de 24 mesos. Per tant, el mètode sembla una eina excel·lent per detectar pacients catalogats de baix risc que presenten supervivències estimades pròpies dels pacients d'alt risc. De la mateixa manera, s'observà una millor distribució dels pacients, ja que els pacients de baix risc (molt baix, baix i intermedi) presentaven millors supervivències globals que quan els blasts foren enumerats en base a la cel·lularitat total, mentre que els pacients d'alt risc mantingueren el mal pronòstic esperable en aquest grup de pacients de mal pronòstic (medianes de supervivència inferiors als 20 mesos). Cal destacar, que la mediana de supervivència del grup de pacients de risc intermedi millorà dels 32,3 mesos als 40,4 mesos quan els blasts foren considerats de la CNE enlloc de la cel·lularitat total. En restringir l'anàlisi a les SMD-E els resultats obtinguts foren similars. Un 51% de pacients prèviament classificats a la categoria de risc intermedi ascendiren a categories d'alt risc i presentaren una menor supervivència global i un menor temps a l'evolució leucèmica. Tal i com succeïa en analitzar els pacients de tota la sèrie, l'aplicació del mètode va permetre que la mediana de supervivència dels pacients del grup intermedi ascendís dels 28,9 als 41,2 mesos. Per tant els pacients recodificats de risc intermedi presentaven una supervivència similar a la dels pacients classificats en la categoria intermedi-1 de l'IPSS. Aquests, que han

presentat supervivències entorn als 40 mesos en diferents estudis (Greenberg *et al*, 1997, 2012; Della Porta *et al*, 2015; Pfeilstöcker *et al*, 2016; Neukirchen *et al*, 2014; Voso *et al*, 2013), han estat ben acceptats històricament com a pacients de baix risc. Globalment, la idoneïtat del mètode sembla evident, ja que els pacients que ascendiren de categoria presentaren un pitjor pronòstic que els pacients que no ascendiren, i els que no ascendiren mostraven un millor pronòstic que abans, ja que el mètode permetia detectar i avançar de categoria de risc al grup de pacients amb un pronòstic significativament pitjor.

Des de la gènesi de l'IPSS-R, els mateixos autors van posar l'accent en la necessitat de clarificar si els pacients de risc intermedi havien de ser considerats d'alt o baix risc. La seva recomanació va ser la de considerar-los de baix risc ja que les seves medianes de supervivència estimades eren més properes a la dels pacients del grup de risc intermedi-1 de l'IPSS que als de l'intermedi-2. No obstant, el percentatge de pacients del grup intermedi morts amb leucèmia aguda era més proper al dels grups d'alt risc (13%, 17%, 26%, 33%, 31%; pels grups molt baix, baix, intermedi, alt i molt alt, respectivament). Aquesta mesura permet objectivar de forma més precisa el risc de transformació leucèmica de cada grup, ja que només considera aquells pacients que han completat el temps de seguiment. En aquest sentit, el nostre mètode fou especialment útil per detectar els pacients classificats dintre del grup de risc intermedi amb un elevat risc de transformació leucèmica, avaluat com el percentatge de pacients morts que presentaren una evolució a LMA. Dels pacients del grup intermedi que ascendiren a categories de més alt risc en considerar els blasts de la cel·lularitat no eritroide, el 40,8% moriren havent-se transformat a leucèmia prèviament, mentre que dels que van romandre a la categoria de risc intermedi moriren aguditzats un 29,8%. La idoneïtat del mètode en aquest sentit és evident, ja que els pacients de baix risc (molt baix, baix, intermedi) presentaren un percentatge més baix de pacients morts amb LMA que quan els blasts foren considerats de la cel·lularitat total, mentre que les categories d'alt risc (alt, molt alt) mostraren un percentatge més elevat de pacients morts amb LMA. Aquests resultats poden consultar-se a la taula S1 del material suplementari de l'article.

Globalment, els resultats exposats demostren que comptar els blasts de la CNE sembla una estratègia idònia per depurar l'avaluació pronòstica dels pacients classificats en la categoria de risc intermedi. En aquest sentit, la nova categoria recodificada de risc intermedi pot ésser considerada una vertadera categoria pronòstica de baix risc.

En conclusió, aquesta senzilla estratègia permet una millor estratificació pronòstica dels pacients amb SMD, ja que permet una diferenciació més adequada dels pacients de baix i d'alt risc, que hauria de ser el principal objectiu de qualsevol eina de predicció pronòstica en les SMD. Els resultats del segon i el tercer treball recolzen fermament considerar a la cel·lularitat no eritroide com a denominador pel càlcul del percentatge de blasts a MO.

Quart treball

Les SMD i LMA amb un percentatge d'eritroblasts a MO igual o superior al 50% suposen aproximadament el 15% i el 5% de les SMD i LMA respectivament (Wang *et al*, 2008). En aquest treball es compararen les característiques morfològiques, analítiques i citogenètiques, així com el pronòstic, de dues llargues sèries de pacients amb SMD *de novo* amb predominança eritroide (SMD-E) i de pacients amb eritroleucèmia *de novo* diagnosticats en base als criteris de l'OMS 2008. Les característiques clíniques, morfològiques, citogenètiques i moleculars de l'eritroleucèmia han estat àmpliament reportades en diferents estudis retrospectius, però la majoria d'aquests inclouïa casos d'eritroleucèmies secundàries i de neoplàsies mieloides relacionades amb el tractament (Bacher *et al*, 2011; Grossmann *et al*, 2013; Hasserjian *et al*, 2010; Santos *et al*, 2009; Zuo *et al*, 2012). La classificació de les neoplàsies mieloides amb predominança eritroide és difícil i requereix la integració de dades morfològiques, analítiques i citogenètiques. La definició i classificació de l'eritroleucèmia ha variat al llarg dels anys (Bennett *et al*, 1976; Bennett & Begg, 1981; Bennett *et al*, 1982, 1985; Jaffe *et al*, 2001; Swerdlow *et al*, 2008, 2017). La classificació de l'OMS 2008 recomanava enumerar els blasts de MO en base a la cel·lularitat no eritroide (CNE) en els casos amb predominança eritroide. En aquest context s'establí el diagnòstic d'eritroleucèmia quan el percentatge de blasts a MO era igual o superior al 20% i el de SMD-E quan el

percentatge de blasts era inferior al 20%. En aquest últim cas, el percentatge de blasts havia de considerar-se de la cel·lularitat total. En la revisió de la quarta edició de l'OMS, publicada l'any 2017, es proposa eliminar la regla del recompte de la CNE i reclassificar els pacients prèviament diagnosticats d'eritroleucèmia a la categoria apropiada de SMD en base al recompte de blasts de la cel·lularitat total. Això, òbviament, implica que l'eritroleucèmia desaparegui com a entitat i que la majoria de pacients siguin adscrits a les categories de SMD amb excés de blasts, sobretot a la categoria amb excés de blasts 2. Malgrat que l'eritroleucèmia va ser considerada un subtipus de LMA a les diferents edicions de l'OMS (Jaffe *et al*, 2001; Swerdlow *et al*, 2008, 2017), les nostres troballes recolzen la decisió de l'OMS de considerar a l'eritroleucèmia com una SMD, però tenim dubtes sobre la desaparició d'aquesta com a entitat específica. Tal i com es demostra al nostre treball, l'eritroleucèmia presenta freqüentment displàsia multilínia, anomalies citogenètiques típiques de les SMD i un pronòstic similar al de les SMD amb excés de blasts. A més, en estudis recents s'ha observat que l'eritroleucèmia presenta un perfil molecular més pròxim al de les SMD que al de les LMA sense predominança eritroide (Grossmann *et al*, 2013; Bacher *et al*, 2011; Zuo *et al*, 2012). Com hem comentat prèviament, el diagnòstic d'AREB-2 en les SMD-E és extraordinàriament infreqüent, ja que els pacients haurien de tenir menys d'un 10% de blasts a MO i al mateix temps presentar 5-19% blasts a SP i/o bastons d'Auer. A la nostra llarga sèrie de 462 SMD-E, cap pacient rebé el diagnòstic d'AREB-2. Per tant, l'eritroleucèmia suposaria la següent categoria de risc de l'AREB-1 amb predominança eritroide si aquesta fos considerada un subtipus específic de SMD-E. Per aquest motiu vàrem voler comparar específicament aquestes dues entitats. No observarem diferències significatives de supervivència entre el grup de 59 eritroleucèmies i el grup de 57 AREB-1 amb predominança eritroide. En aquest grup de 116 pacients amb predominança eritroide i excés de blasts, la presència d'un cariotip d'alt risc definit per l'IPSS o l'IPSS-R va ser el principal factor pronòstic advers. Tampoc s'observaren diferències significatives de supervivència en comparar el grup d'eritroleucèmies amb el grup de 459 AREB-2 de la nostra sèrie. De la mateixa manera, no s'observaren diferències significatives de supervivència amb un grup de 175 AREB-2 que presentaven un 20% o més blasts a MO en base a la CNE, però que

òbviament presentaven menys d'un 50% d'eritroblasts a MO. Aquesta troballa posa de manifest l'absència d'impacte pronòstic *per se* de la predominança eritroide i l'arbitrarietat del punt de tall que es va consensuar per definir a les neoplàsies mieloides amb expansió de la sèrie eritroide. A més, aporta una nova evidència al fet que considerar la CNE com el denominador comú pel càlcul del percentatge medul·lar de blasts sembla el millor mètode per homogeneïtzar el seu impacte pronòstic entre els pacients amb SMD.

Tal i com hem comentat, seguint les recomanacions actuals de l'OMS, la majoria d'eritroleucèmies seran considerades SMD amb excés de blasts 2. No obstant, un percentatge de pacients seran considerats SMD amb excés blasts 1 o inclús seran adscrits a categories sense excés blasts si l'expansió de la sèrie eritroide és molt marcada. Això podria suposar una infravaloració del pronòstic d'aquests pacients. Cal destacar que un 19% de les eritroleucèmies de la nostra sèrie presentaven un percentatge de blasts a MO entre 5-9%. Actualment, aquests casos serien considerats SMD amb excés de blasts 1, però tal i com demostrarem al nostre estudi, aquestes 11 eritroleucèmies *low-blast count* presentaren una supervivència global similar a la resta d'eritroleucèmies. En la mateixa línia les AREB-1 amb predominança eritroide presentaren una supervivència significativament inferior que les AREB-1 amb menys d'un 50% d'eritroblasts a MO. Novament, aquestes troballes reforcen la importància de considerar el percentatge de blasts de la CNE per evitar una infraestimació del risc d'aquest grup de pacients. En la nostra opinió, considerar l'eritroleucèmia com un subtipus específic de SMD d'alt risc podria ser una mesura adequada per solucionar aquest problema. En un treball recent, Wang i col·laboradors estudiaren una llarga sèrie de 77 eritroleucèmies i 279 AREB i conclogueren que les característiques biològiques i el pronòstic del grup d'eritroleucèmies era molt proper al de les AREB i que s'allunyava del de les LMA (Wang *et al*, 2016).

En conclusió, les nostres dades suggereixen que l'eritroleucèmia es troba en el contínuum clínic-biològic de les SMD amb excés de blasts i recolzen la seva inclusió en futures classificacions de SMD més que no pas de LMA. Considerar aquests pacients, habitualment d'edat avançada i no aptes per rebre quimioteràpia tipus LMA, com un subtipus específic de SMD permetria que es beneficiessin d'una

avaluació pronòstica orientada a les SMD i de que poguessin ser inclosos en assaigs clínics específics de SMD.

Cinquè treball

L'estudi es basà en una sèrie de 146 pacients diagnosticats de LMMC *de novo*, 134 pacients provenien de l'Hospital Clínic de Barcelona i 12 pacients de l'Hospital Germans Trias i Pujol de Badalona. L'objectiu principal del treball era avaluar la precisió pronòstica i la capacitat d'estratificació de risc dels índexs específics per a la LMMC: *MD Anderson Prognostic Scoring System* (MDAPS), *Mayo prognostic model* i *CMML-specific Prognostic Score* (CPSS).

El primer índex desenvolupat de forma específica per a l'avaluació pronòstica de la LMMC aparegué l'any 1988 (Worsley *et al*, 1988), no obstant, tant aquest com d'altres que aparegueren posteriorment estaven basats en sèries curtes de pacients (Aul *et al*, 1992; González-Medina *et al*, 2002). De fet, l'IPSS ha estat l'índex pronòstic més utilitzat per a la valoració de la LMMC, malgrat que no és aplicable a les variants proliferatives (Greenberg *et al*, 1997). L'any 2002, Onida i col·laboradors publicaren el MDAPS, el primer índex pronòstic específic per a la LMMC basat en una llarga sèrie de 213 pacients, erigint-se com l'eina pronòstica més valuosa. L'índex estratificava els pacients en quatre grups de risc amb supervivències significativament diferenciades però no permetia fer una separació efectiva dels pacients d'alt i baix risc, ja que tots els grups presentaven medianes de supervivència molt dolentes, inclús en la categoria de baix risc (mediana estimada de supervivència global de 24 mesos). Tal i com succeeix amb les SMD, les decisions terapèutiques en la LMMC són adaptades al risc, per això, sembla cabdal avaluar la validesa real d'aquest índex per a l'estratificació de risc dels pacients en una sèrie alternativa a la que va servir per implementar-lo. L'any 2013 van aparèixer tres índexs pronòstics específics per a la LMMC: el CPSS (Such *et al*, 2013), que ha estat l'eina d'estratificació pronòstica més àmpliament acceptada, el *Mayo prognostic model* (Patnaik *et al*, 2013) i el *Groupe Français des Myélodysplasies (GFM) prognostic score* (GFM Score) (Itzykson *et al*, 2013a). L'any 2014 aparegué el *Mayo Molecular Model* (MMM) (Patnaik *et al*, 2014) i l'any 2016 el *Molecular CMML-specific Prognostic Scoring System* (CPSS-Mol) (Elena *et al*,

2016). El GFM Score i el MMM són índexs composts per variables clíniques i moleculars (estat mutacional d'ASXL1), i el CPSS-Mol s'integra per variables clíniques, citogenètiques i moleculars (estat mutacional d'ASXL1, *NRAS*, *SETBP1* i *RUNX1*).

En aquest cinquè treball ens vàrem centrar en comparar la capacitat predictiva de la supervivència i dels temps a la transformació leucèmica dels tres índexs composts únicament per variables clíniques, ja que en el moment en què publicarem l'article eren els únics que es podien aplicar a la pràctica clínica diària de forma realista. De la mateixa manera, vàrem emfatitzar en analitzar la capacitat discriminativa dels tres índexs per separar de forma efectiva els pacients d'alt i baix risc. A més, vàrem avaluar l'impacte pronòstic de les diferents variables que composaven els tres índexs, per seleccionar entre totes elles les que presentaven un impacte pronòstic advers independent en la nostra sèrie amb l'objectiu final de dissenyar un nou índex pronòstic per a la LMMC.

Les nostres dades confirmaren el valor pronòstic advers de totes les variables que composaven els índexs en una anàlisi univariable de supervivència, amb l'excepció de la presència de cèl·lules mieloides immadures circulants (mielèmia), que es una de les variables que componen el MDAPS i el *Mayo prognostic model*. La mielèmia s'observà en el 64% dels nostres pacients, en la línia de l'observat a la sèrie de la Clínica Mayo (49% dels pacients) i a la del MD Anderson (78% dels pacients). En un estudi del grup de Düsseldorf tampoc es va confirmar l'impacte pronòstic advers de la mielèmia (Germing *et al*, 2002). D'altra banda, sí que vàrem confirmar l'impacte pronòstic advers per a la supervivència de la presència d'una xifra de limfòcits superior a $2,5 \times 10^9/L$, troballa prèviament observada pel grup del MD Anderson, de la Clínica Mayo i de Düsseldorf (Germing *et al*, 2002). Aquesta troballa permet hipotetitzar sobre mecanismes de desregulació immune en la LMMC i obre les portes a la confecció d'estudis en què s'analitzin la distribució de les subpoblacions limfocitàries a la SP dels pacients amb LMMC.

Els tres índexs permeteren separar adequadament els pacients d'alt i baix risc a la nostra sèrie, a més les supervivències medianes estimades dels grups de baix risc estaven per sobre del 30 mesos en tots els casos. Com s'ha anat comentant al llarg de la tesi, el GESMD considera a un pacient d'alt risc si la seva supervivència

mediana estimada es situa per sota dels 30 mesos (Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos, 2012). Aquesta troballa és cabdal, ja que reforça la utilitat dels tres índexs per a la presa de decisions terapèutiques adaptades al risc. Els tres índexs presentaren una bona capacitat predictiva de la supervivència i dels temps a la transformació leucèmica, però el CPSS mostrà un valor del *C-statistic* lleugerament superior.

Les variables que componen els tres índexs foren enfrontades en una regressió de Cox per a la supervivència i pel temps a la transformació leucèmica. Només una de les variables que reflectien diferents graus d'anèmia o de percentatge de blasts fou introduïda de forma independent en l'anàlisi multivariable. Vàrem seleccionar per a la regressió de Cox final aquelles que mostraven una major associació amb la supervivència (*hazard ratio* més elevada), que foren: el requeriment transfusional pel que fa als graus d'anèmia i la LMMC-2 per les variables que reflectien el percentatge medul·lar de blasts. Les variables que van mantenir la seva significació estadística en l'anàlisi multivariable per a la supervivència, erigint-se com els factors pronòstics adversos independents amb major pes pronòstic en la nostra sèrie, foren les variables que componen el CPSS i el recompte de plaquetes $<100 \times 10^9/L$. Basant-nos en aquesta informació vàrem implementar l'índex CPSS-P, que addiciona el recompte de plaquetes $<100 \times 10^9/L$ a les variables que conformen el CPSS. Com que la xifra de plaquetes $<100 \times 10^9/L$ va ser la variable amb el major impacte pronòstic en la supervivència de la nostra sèrie, vàrem decidir calcular el CPSS-P avançant una categoria pronòstica del CPSS als pacients que presentaven aquesta característica. A la nostra sèrie, el CPSS-P s'erigí com l'índex amb una major capacitat predictiva de la supervivència i del temps a la transformació leucèmica.

El present estudi reforça la validesa dels tres índexs analitzats i pot servir com una sèrie de validació externa pel MDAPS i pel *Mayo prognostic model*. Alguns dels pacients de la nostra sèrie s'utilitzaren per implementar el CPSS original, pel que no permet complir les funcions de sèrie externa de validació. El CPSS-P s'erigí com l'índex amb el millor valor predictiu de la supervivència i del temps a la transformació leucèmica. Tot i així es requereixen estudis basats en sèries llargues

Discussió

de pacients amb LMMC que corroborin que el CPSS-P podria tractar-se d'una versió millorada del CPSS.

V. CONCLUSIONS

1. L'estudi en què s'avalua l'impacte pronòstic dels nivells de metilació i hidroximetilació globals de l'ADN en els pacients amb SMD mostra que:
 - 1.1. Els nivells elevats de metilació global de l'ADN són un factor pronòstic advers independent per a la supervivència i la transformació leucèmica en els pacients amb SMD.
 - 1.2. Els pacients de baix risc segons l'IPSS que mostren els nivells més elevats de metilació global de l'ADN (>2,73%) presenten una supervivència global similar a la dels pacients amb SMD d'alt risc (mediana de supervivència global estimada de 19 mesos).
 - 1.3. Els pacients de baix risc segons l'IPSS-R que mostren els nivells més elevats de metilació global de l'ADN (>2,73%) presenten una supervivència global similar a la dels pacients amb SMD d'alt risc (mediana de supervivència global estimada de 19 mesos).
 - 1.4. Els pacients de baix risc segons el WPSS que mostren els nivells més elevats de metilació global de l'ADN (>2,73%) presenten una supervivència global propera a la dels pacients amb SMD d'alt risc (mediana de supervivència global estimada de 30,4 mesos).
 - 1.5. No es detecta una associació significativa entre els nivells d'hidroximetilació global de l'ADN i el pronòstic dels pacients amb SMD de la nostra sèrie.
 - 1.6. Els nivells de metilació i hidroximetilació globals de l'ADN no es correlacionen significativament amb cap dels factors pronòstics clàssics analitzats: categories pronòstiques de l'IPSS, WPSS o IPSS-R; categories de risc citogenètic de l'IPSS o IPSS-R; recompte de plaquetes; xifra de neutròfils; nivell d'hemoglobina; percentatge medul·lar de blasts, i requeriment transfusional.
2. Els dos estudis en què s'avalua l'impacte pronòstic de considerar el percentatge medul·lar de blasts en base a la cel·lularitat no eritroide mostren que:
 - 2.1. Aproximadament el 13% de les SMD de la nostra sèrie presenta predominança eritroide, és a dir, un percentatge d'eritroblasts a moll d'os igual o superior al 50%.

- 2.2. Les SMD amb predominança eritroide presenten una supervivència global similar a la dels pacients amb menys d'un 50% d'eritroblasts a moll d'os, encara que aquests últims mostren una mitjana del percentatge de blasts a moll d'os significativament superior que la dels pacients amb SMD amb predominança eritroide (3,99% vs. 1,82%).
- 2.3. Considerar el percentatge medul·lar de blasts en base a la cel·lularitat no eritroide, enlloc de en base a la cel·lularitat total, millora la predicció de risc de les SMD amb predominança eritroide, tant si s'aplica per reassignar els pacients a les categories de l'OMS 2008, com si s'usa per calcular l'IPSS i l'IPSS-R.
- 2.4. Considerar el percentatge medul·lar de blasts en base a la cel·lularitat no eritroide, enlloc de en base a la cel·lularitat total, millora la predicció de risc de totes les SMD, tant si s'aplica per reassignar els pacients a les categories de l'OMS 2008, com si s'usa per calcular l'IPSS i l'IPSS-R.
- 2.5. En considerar el percentatge medul·lar de blasts de la cel·lularitat no eritroide per reassignar els pacients a les categories de l'OMS 2008, no s'observen diferències significatives de supervivència dintre de cada categoria quan es comparen els pacients amb i sense predominança eritroide. Aquesta troballa demostra l'absència d'impacte pronòstic *per se* de la predominança eritroide.
- 2.6. Considerar el percentatge medul·lar de blasts de la cel·lularitat no eritroide permet redefinir el risc dels pacients classificats en la categoria de risc intermedi de l'IPSS-R. En aplicar aquest mètode, els pacients recodificats de risc intermedi de l'IPSS-R presenten el pronòstic esperable en les SMD de baix risc (medianes de supervivència global estimades de 40,4 mesos).
3. L'estudi en què es comparen les característiques clínico-biològiques de l'eritroleucèmia amb les de les SMD amb excés de blasts mostra que:
 - 3.1. No s'observen diferències significatives de supervivència entre L'AREB-1 amb predominança eritroide i l'eritroleucèmia.
 - 3.2. No s'observen diferències significatives de supervivència entre L'AREB-2 i l'eritroleucèmia.

- 3.3. No s'observen diferències significatives de supervivència entre L'AREB-2 amb un 20% o més de blasts a moll d'os de la cel·lularitat no eritroide i l'eritroleucèmia.
 - 3.4. L'AREB-1 amb predominança eritroide presenta una supervivència global significativament menor que l'AREB-1 sense predominança eritroide.
 - 3.5. No s'observen diferències significatives de supervivència entre el grup d'eritroleucèmies amb 5-9% blasts a moll d'os (SMD amb excés de blasts 1 segons l'OMS 2017) i el grup d'eritroleucèmies amb 10-19% blasts a moll d'os (SMD amb excés de blasts 2 segons l'OMS 2017).
 - 3.6. No s'observen diferències significatives entre l'AREB-1 amb predominança eritroide i l'eritroleucèmia pel que fa a: la xifra de neutròfils, el grau d'anèmia, el percentatge de displàsia de les diferents sèries mieloides, el percentatge de pacients amb cariotip alterat i la distribució de les alteracions citogenètiques segons les categories de l'IPSS o l'IPSS-R. L'eritroleucèmia presenta una xifra de plaquetes significativament inferior que l'AREB-1 amb predominança eritroide.
 - 3.7. No s'observen diferències significatives entre l'AREB-2 i l'eritroleucèmia pel que fa a: la xifra de neutròfils, el grau d'anèmia, el recompte de plaquetes, el percentatge de disritropoesi, el percentatge de dismegacariopoesi, el percentatge de pacients amb cariotip alterat i la distribució de les alteracions citogenètiques segons les categories de l'IPSS o l'IPSS-R. L'AREB-2 presenta un percentatge de disgranulopoesi a moll d'os significativament superior que el de l'eritroleucèmia.
 - 3.8. En el grup pacients amb predominança eritroide i excés de blasts (eritroleucèmia i AREB-1 amb predominança eritroide), la presència d'un cariotip d'alt risc definit per l'IPSS o l'IPSS-R va ser el principal factor pronòstic advers.
4. L'estudi en què es comparen tres índexs pronòstics específics per a la LMMC: MDAPS, CPSS i *Mayo prognostic model*, mostra que:
 - 4.1. Es confirma el valor pronòstic advers per a la supervivència de totes les variables que componen el CPSS.

- 4.2. Es confirma el valor pronòstic advers per a la supervivència de les variables que componen el MDAPS i el *Mayo prognostic model* a excepció de l'ítem: "presència de cèl·lules mieloides immadures circulants".
- 4.3. Els tres índexs permeten discriminar adequadament entre pacients d'alt i baix risc.
- 4.4. Els tres índexs mostren una bona capacitat predictiva de la supervivència i dels temps a la transformació leucèmica, però el CPSS presenta un valor lleugerament superior.
- 4.5. Les variables que componen el CPSS i una xifra de plaquetes $<100 \times 10^9/L$ són els factors pronòstics adversos amb valor independent a la nostra sèrie.
- 4.6. L'addició de l'ítem xifra de plaquetes $<100 \times 10^9/L$ a les variables que componen el CPSS permet implementar el nou índex pronòstic CPSS-P. Aquest presenta la major capacitat predictiva de la supervivència i del temps a la transformació leucèmica de tots els índexs analitzats.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Abel, G.A. & Buckstein, R. (2016) Integrating Frailty, Comorbidity, and Quality of Life in the Management of Myelodysplastic Syndromes. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, **36**, e337–e344.
- Aggerholm, A., Holm, M.S., Guldberg, P., Olesen, L.H. & Hokland, P. (2006) Promoter hypermethylation of p15INK4B, HIC1, CDH1, and ER is frequent in myelodysplastic syndrome and predicts poor prognosis in early-stage patients. *European Journal of Haematology*, **76**, 23–32.
- Apperley, J.F., Gardembas, M., Melo, J. V, Russell-Jones, R., Bain, B.J., Baxter, E.J., Chase, A., Chessells, J.M., Colombat, M., Dearden, C.E., Dimitrijevic, S., Mahon, F.-X., Marin, D., Nikolova, Z., Olavarria, E., Silberman, S., Schultheis, B., Cross, N.C.P. & Goldman, J.M. (2002) Response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloproliferative diseases with rearrangements of the platelet-derived growth factor receptor beta. *The New England journal of medicine*, **347**, 481–7.
- Arber, D.A. (2017) Revisiting erythroleukemia. *Current opinion in hematology*, **24**, 146–151.
- Arber, D.A. & Hasserjian, R.P. (2015) Reclassifying myelodysplastic syndromes: what's where in the new WHO and why. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, **2015**, 294–8.
- Arber, D.A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M.J., Le Beau, M.M., Bloomfield, C.D., Cazzola, M. & Vardiman, J.W. (2016) The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, **127**, 2391–405.
- Aribi, A., Borthakur, G., Ravandi, F., Shan, J., Davisson, J., Cortes, J. & Kantarjian, H. (2007) Activity of decitabine, a hypomethylating agent, in chronic myelomonocytic leukemia. *Cancer*, **109**, 713–7.
- Aul, C., Gattermann, N., Heyll, A., Germing, U., Derigs, G. & Schneider, W. (1992) Primary myelodysplastic syndromes: analysis of prognostic factors in 235 patients and proposals for an improved scoring system. *Leukemia*, **6**, 52–9.
- Avivi, I., Rosenbaum, H., Levy, Y. & Rowe, J. (1999) Myelodysplastic syndrome and associated skin lesions: a review of the literature. *Leukemia research*, **23**, 323–30.
- Bacher, U., Haferlach, C., Alpermann, T., Kern, W., Schnittger, S. & Haferlach, T. (2011) 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**, 1284–92.
- Bagby, G.C. & Meyers, G. (2007) Bone marrow failure as a risk factor for clonal evolution: prospects for leukemia prevention. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 40–6.
- Bagby, G.C. & Meyers, G. (2009) Myelodysplasia and acute leukemia as late complications of marrow failure: future prospects for leukemia prevention. *Hematology/oncology clinics of North America*, **23**, 361–76.

- Balduini, C.L., Guarnone, R., Pecci, A., Centenara, E. & Ascari, E. (1998) Multilineage dysplasia without increased blasts identifies a poor prognosis subset of myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, **12**, 1655–6.
- Balleari, E., Salvetti, C., Del Corso, L., Filiberti, R., Bacigalupo, A., Bellodi, A., Beltrami, G., Bergamaschi, M., Berisso, G., Calzamiglia, T., Carella, A.M., Cavalleri, M., Da Col, A., Favorini, S., Forni, G.L., Goretti, R., Miglino, M., Mitscheuning, L., Molinari, E., Racchi, O., et al (2015) Age and comorbidities deeply impact on clinical outcome of patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia research*, **39**, 846–52.
- Barraco, D., Cerquozzi, S., Gangat, N., Patnaik, M.M., Lasho, T., Finke, C., Hanson, C.A., Ketterling, R.P., Pardanani, A. & Tefferi, A. (2017) Monocytosis in polycythemia vera: Clinical and molecular correlates. *American Journal of Hematology*, **92**, 640–645.
- Bejar, R. (2015) Myelodysplastic Syndromes Diagnosis: What Is the Role of Molecular Testing? *Current Hematologic Malignancy Reports*, **10**, 282–291.
- Bejar, R. (2017a) Implications of molecular genetic diversity in myelodysplastic syndromes. *Current opinion in hematology*, **24**, 73–78.
- Bejar, R. (2017b) CHIP, ICUS, CCUS and other four-letter words. *Leukemia*, **31**, 1869–1871.
- Bejar, R., Levine, R. & Ebert, B.L. (2011a) Unraveling the molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **29**, 504–15.
- Bejar, R., Lord, A., Stevenson, K., Bar-natan, M., Pérez-ladaga, A., Wang, H., Caughey, B., Stojanov, P., Getz, G., Garcia-manero, G., Chen, R., Stone, R.M., Neuberg, D., Steensma, D.P. & Ebert, B.L. (2014a) TET2 mutations predict response to hypomethylating agents in myelodysplastic syndrome patients. **124**, 2705–2712.
- Bejar, R., Papaemmanuil, E., Haferlach, T., Garcia-Manero, G., Maciejewski, J.P., Sekeres, M.A., Walter, M.J., Graubert, T.A., Cazzola, M., Malcovati, L., Campbell, P.J., Ogawa, S., Boulton, J., Bowen, D., Tauro, S., Groves, M.J., Fontenay, M., Shih, L.-Y., Tüchler, H., Stevenson, K.E., et al (2014b) TP53 Mutation Status Divides MDS Patients with Complex Karyotypes into Distinct Prognostic Risk Groups: Analysis of Combined Datasets from the International Working Group for MDS-Molecular Prognosis Committee. *Blood*, **124**,.
- Bejar, R. & Steensma, D.P. (2014) Recent developments in myelodysplastic syndromes. **124**, 2793–2804.
- Bejar, R., Stevenson, K., Abdel-Wahab, O., Galili, N., Nilsson, B., Garcia-Manero, G., Kantarjian, H., Raza, A., Levine, R.L., Neuberg, D. & Ebert, B.L. (2011b) Clinical Effect of Point Mutations in Myelodysplastic Syndromes. *New England Journal of Medicine*, **364**, 2496–2506.
- Bejar, R., Stevenson, K.E., Caughey, B.A., Abdel-Wahab, O., Steensma, D.P., Galili, N.,

- Raza, A., Kantarjian, H., Levine, R.L., Neuberg, D., Garcia-Manero, G. & Ebert, B.L. (2012) Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **30**, 3376–82.
- Bennett, J.M. & Begg, C.B. (1981) Eastern Cooperative Oncology Group study of the cytochemistry of adult acute myeloid leukemia by correlation of subtypes with response and survival. *Cancer research*, **41**, 4833–7.
- Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R. & Sultan, C. (1976) Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *British journal of haematology*, **33**, 451–8.
- Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R. & Sultan, C. (1982) Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *British journal of haematology*, **51**, 189–99.
- Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R. & Sultan, C. (1985) Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Annals of internal medicine*, **103**, 620–5.
- Bennett, J.M. & Orazi, A. (2009) Diagnostic criteria to distinguish hypocellular acute myeloid leukemia from hypocellular myelodysplastic syndromes and aplastic anemia: recommendations for a standardized approach. *Haematologica*, **94**, 264–268.
- Bennett, J.M., Tuechler, H., Aul, C., Strupp, C. & Germing, U. (2016) Dysplastic erythroid precursors in the myelodysplastic syndromes and the acute myeloid leukemias: Is there biologic significance? (How should blasts be counted?). *Leukemia Research*, **47**, 63–69.
- Beran, M., Wen, S., Shen, Y., Onida, F., Jelinek, J., Cortes, J., Giles, F. & Kantarjian, H. (2007) Prognostic factors and risk assessment in chronic myelomonocytic leukemia: validation study of the M.D. Anderson Prognostic Scoring System. *Leukemia & lymphoma*, **48**, 1150–60.
- Billström, R., Thiede, T., Hansen, S., Heim, S., Kristoffersson, U., Mandahl, N. & Mitelman, F. (1988) Bone marrow karyotype and prognosis in primary myelodysplastic syndromes. *European journal of haematology*, **41**, 341–6.
- Block, M., Jacobson, L.O. & Bethard, W.F. (1953) Preleukemic acute human leukemia. *Journal of the American Medical Association*, **152**, 1018–28.
- Bouchliou, I., Miltiades, P., Nakou, E., Spanoudakis, E., Goutzouvelidis, A., Vakalopoulou, S., Garypidou, V., Kotoula, V., Bourikas, G., Tsatalas, C. & Kotsianidis, I. (2011) Th17 and Foxp3(+) T regulatory cell dynamics and distribution in myelodysplastic syndromes. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, **139**, 350–9.

- Braun, T. & Fenaux, P. (2013) Myelodysplastic Syndromes (MDS) and autoimmune disorders (AD): cause or consequence? *Best practice & research. Clinical haematology*, **26**, 327–36.
- Braun, T., Itzykson, R., Renneville, A., de Renzis, B., Dreyfus, F., Laribi, K., Bouabdallah, K., Vey, N., Toma, A., Recher, C., Royer, B., Joly, B., Vekhoff, A., Lafon, I., Sanhes, L., Meurice, G., Orear, C., Preudhomme, C., Gardin, C., Ades, L., et al (2011) Molecular predictors of response to decitabine in advanced chronic myelomonocytic leukemia: a phase 2 trial. *Blood*, **118**, 3824–3831.
- Breccia, M., Federico, V., Latagliata, R., Mercanti, C., D’Elia, G.M., Cannella, L., Loglisci, G., Salaroli, A., Santopietro, M. & Alimena, G. (2011) Evaluation of comorbidities at diagnosis predicts outcome in myelodysplastic syndrome patients. *Leukemia research*, **35**, 159–62.
- Brunner, A.M., Blonquist, T.M., Hobbs, G.S., Amrein, P.C., Neuberg, D.S., Steensma, D.P., Abel, G.A. & Fathi, A.T. (2017) Risk and timing of cardiovascular death among patients with myelodysplastic syndromes. *Blood Advances*, **1**, 2032–2040.
- Buckstein, R., Wells, R.A., Zhu, N., Leitch, H.A., Nevill, T.J., Yee, K.W.L., Leber, B., Sabloff, M., St Hilaire, E., Kumar, R., Geddes, M., Shamy, A., Storrington, J., Kew, A., Elemery, M., Levitt, M., Lenis, M., Mamedov, A., Zhang, L., Rockwood, K., et al (2016) Patient-related factors independently impact overall survival in patients with myelodysplastic syndromes: an MDS-CAN prospective study. *British journal of haematology*, **174**, 88–101.
- Buesche, G., Teoman, H., Wilczak, W., Ganser, A., Hecker, H., Wilkens, L., Göhring, G., Schlegelberger, B., Bock, O., Georgii, A. & Kreipe, H. (2008) Marrow fibrosis predicts early fatal marrow failure in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, **22**, 313–22.
- Cabrero, M., Wei, Y., Yang, H., Ganan-Gomez, I., Bohannon, Z., Colla, S., Marchesini, M., Bravo, G.M., Takahashi, K., Bueso-Ramos, C. & Garcia-Manero, G. (2016) Down-regulation of EZH2 expression in myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research*, **44**, 1–7.
- Cazzola, M. & Malcovati, L. (2005) Myelodysplastic syndromes--coping with ineffective hematopoiesis. *The New England journal of medicine*, **352**, 536–8.
- Cazzola, M., Della Porta, M.G. & Malcovati, L. (2008) Clinical relevance of anemia and transfusion iron overload in myelodysplastic syndromes. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, **2008**, 166–75.
- Cazzola, M., Della Porta, M.G. & Malcovati, L. (2013) The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance.
- Challen, G.A., Sun, D., Jeong, M., Luo, M., Jelinek, J., Berg, J.S., Bock, C., Vasanthakumar, A., Gu, H., Xi, Y., Liang, S., Lu, Y., Darlington, G.J., Meissner, A., Issa, J.-P.J., Godley, L.A., Li, W. & Goodell, M.A. (2011) Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. *Nature genetics*, **44**, 23–31.

- Chamuleau, M.E.D., Westers, T.M., van Dreunen, L., Groenland, J., Zevenbergen, A., Eeltink, C.M., Ossenkoppele, G.J. & van de Loosdrecht, A.A. (2009) Immune mediated autologous cytotoxicity against hematopoietic precursor cells in patients with myelodysplastic syndrome. *Haematologica*, **94**, 496–506.
- Chandra, D., Tyagi, S., Singh, J., Deka, R., Manivannan, P., Mishra, P., Pati, H.P. & Saxena, R. (2017) Utility of 5-Methylcytosine Immunohistochemical Staining to Assess Global DNA Methylation and Its Prognostic Impact in MDS Patients. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, **18**, 3307–3313.
- Chaubey, R., Sazawal, S., Mahapatra, M., Chhikara, S. & Saxena, R. (2015) Prognostic relevance of aberrant SOCS-1 gene promoter methylation in myelodysplastic syndromes patients. *International Journal of Laboratory Hematology*, **37**, 265–271.
- Cheah, C.Y., Burbury, K., Apperley, J.F., Huguet, F., Pitini, V., Gardembas, M., Ross, D.M., Forrest, D., Genet, P., Rousselot, P., Patton, N., Smith, G., Dunbar, C.E., Ito, S., Aguiar, R.C.T., Odenike, O., Gimelfarb, A., Cross, N.C.P. & Seymour, J.F. (2014) Patients with myeloid malignancies bearing PDGFRB fusion genes achieve durable long-term remissions with imatinib. *Blood*, **123**, 3574–7.
- Cilloni, D., Gottardi, E., Messa, F., Fava, M., Scaravaglio, P., Bertini, M., Girotto, M., Marinone, C., Ferrero, D., Gallamini, A., Levis, A., Saglio, G. & Piedmont Study Group on Myelodysplastic Syndromes (2003) Significant Correlation Between the Degree of WT1 Expression and the International Prognostic Scoring System Score in Patients With Myelodysplastic Syndromes. *Journal of Clinical Oncology*, **21**, 1988–1995.
- Cordoba, I., Gonzalez-Porras, J.R., Such, E., Nomdedeu, B., Luño, E., de Paz, R., Carbonell, F., Vallespi, T., Ardanaz, M., Ramos, F., Marco, V., Bonanad, S., Sanchez-Barba, M., Costa, D., Bernal, T., Sanz, G.F. & Cañizo, M.C. (2012) The degree of neutropenia has a prognostic impact in low risk myelodysplastic syndrome. *Leukemia research*, **36**, 287–92.
- Costa, D., Muñoz, C., Carrió, A., Nomdedeu, M., Calvo, X., Solé, F., Luño, E., Cervera, J., Vallespi, T., Berneaga, D., Gómez, C., Arias, A., Such, E., Sanz, G., Grau, J., Insunza, A., Calasanz, M.J., Ardanaz, M.T., Hernández, J.M., Azaceta, G., et al (2013) Reciprocal translocations in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemias: Review of 5,654 patients with an evaluable karyotype. *Genes, Chromosomes and Cancer*, **52**, 753–763.
- Costa, R., Abdulhaq, H., Haq, B., Shadduck, R.K., Latsko, J., Zenati, M., Atem, F.D., Rossetti, J.M., Sahovic, E.A. & Lister, J. (2011) Activity of azacitidine in chronic myelomonocytic leukemia. *Cancer*, **117**, 2690–2696.
- Cremers, E.M.P., Westers, T.M., Alhan, C., Cali, C., Visser-Wisselaar, H.A., Chitu, D.A., van der Velden, V.H.J., Te Marvelde, J.G., Klein, S.K., Muus, P., Vellenga, E., de Greef, G.E., Legdeur, M.-C.C.J.C., Wijermans, P.W., Stevens-Kroef, M.J.P.L., Silva-Coelho, P. da, Jansen, J.H., Ossenkoppele, G.J., van de Loosdrecht, A.A. & A study on behalf of the HOVON89 study group (2017) Implementation of erythroid

- lineage analysis by flow cytometry in diagnostic models for myelodysplastic syndromes. *Haematologica*, **102**, 320–326.
- Cuneo, A., Van Orshoven, A., Michaux, J.L., Boogaerts, M., Louwagie, A., Doyen, C., Dal Cin, P., Fagioli, F., Castoldi, G. & Van den Berghe, H. (1990) Morphologic, immunologic and cytogenetic studies in erythroleukaemia: evidence for multilineage involvement and identification of two distinct cytogenetic-clinicopathological types. *British journal of haematology*, **75**, 346–54.
- David, M., Cross, N.C.P., Burgstaller, S., Chase, A., Curtis, C., Dang, R., Gardembas, M., Goldman, J.M., Grand, F., Hughes, G., Huguet, F., Lavender, L., McArthur, G.A., Mahon, F.X., Massimini, G., Melo, J., Rousselot, P., Russell-Jones, R.J., Seymour, J.F., Smith, G., et al (2007) Durable responses to imatinib in patients with PDGFRB fusion gene-positive and BCR-ABL-negative chronic myeloproliferative disorders. *Blood*, **109**, 61–4.
- Delhommeau, F., Dupont, S., Valle, V. Della, James, C., Trannoy, S., Massé, A., Kosmider, O., Le Couedic, J.-P., Robert, F., Alberdi, A., Lécluse, Y., Plo, I., Dreyfus, F.J., Marzac, C., Casadevall, N., Lacombe, C., Romana, S.P., Dessen, P., Soulier, J., Vigué, F., et al (2009) Mutation in *TET2* in Myeloid Cancers. *New England Journal of Medicine*, **360**, 2289–2301.
- Dinmohamed, A.G., Visser, O., Van Norden, Y., Huijgens, P.C., Sonneveld, P., Van De Loosdrecht, A.A. & Jongen-Lavrencic, M. (2014) Trends in incidence, initial treatment and survival of myelodysplastic syndromes: A population-based study of 5144 patients diagnosed in the Netherlands from 2001 to 2010. *European Journal of Cancer*, **50**, 1004–1012.
- Duncavage, E.J., Jacoby, M.A., Miller, C., Chang, G.S., Shao, J., Elliot, K., Fronick, C., O’Laughlin, M., Fulton, R., Wilson, R.K., Graubert, T.A. & Walter, M.J. (2016) Rare Pre-Existing MDS Subclones Contribute to Secondary AML Progression. *Blood*, **128**,.
- Dunkley, S.M., Manoharan, A. & Kwan, Y.L. (2002) Myelodysplastic syndromes: prognostic significance of multilineage dysplasia in patients with refractory anemia or refractory anemia with ringed sideroblasts. *Blood*, **99**, 3870–1; author reply 3871.
- Duong, V.H., Padron, E., Al Ali, N.H., Lancet, J.E., Hall, J., Kwok, B., Zhang, L., Epling-Burnette, P.K., List, A.F. & Komrokji, R.S. (2018) The prognostic value of circulating myeloblasts in patients with myelodysplastic syndromes. *Annals of Hematology*, **97**, 247–254.
- Dutt, S., Narla, A., Lin, K., Mullally, A., Abayasekara, N., Megerdichian, C., Wilson, F.H., Currie, T., Khanna-Gupta, A., Berliner, N., Kutok, J.L. & Ebert, B.L. (2011) Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. *Blood*, **117**, 2567–76.
- Ebert, B.L., Pretz, J., Bosco, J., Chang, C.Y., Tamayo, P., Galili, N., Raza, A., Root, D.E., Attar, E., Ellis, S.R. & Golub, T.R. (2008) Identification of RPS14 as a 5q- syndrome

- gene by RNA interference screen. *Nature*, **451**, 335–9.
- Efficace, F., Gaidano, G., Breccia, M., Voso, M.T., Cottone, F., Angelucci, E., Caocci, G., Stauder, R., Selleslag, D., Sprangers, M., Platzbecker, U., Ricco, A., Sanpaolo, G., Beyne-Rauzy, O., Buccisano, F., Palumbo, G.A., Bowen, D., Nguyen, K., Niscola, P., Vignetti, M., et al (2015) Prognostic value of self-reported fatigue on overall survival in patients with myelodysplastic syndromes: a multicentre, prospective, observational, cohort study. *The Lancet Oncology*, **16**, 1506–1514.
- Elbæk, M.V., Sørensen, A.L. & Hasselbalch, H.C. (2016) Chronic inflammation and autoimmunity as risk factors for the development of chronic myelomonocytic leukemia? *Leukemia & lymphoma*, **57**, 1793–9.
- Elena, C., Galli, A., Such, E., Meggendorfer, M., Germing, U., Rizzo, E., Cervera, J., Molteni, E., Fasan, A., Schuler, E., Ambaglio, I., Lopez-Pavia, M., Zibellini, S., Kuendgen, A., Travaglino, E., Sancho-Tello, R., Catricalà, S., Vicente, A.I., Haferlach, T., Haferlach, C., et al (2016) Integrating clinical features and genetic lesions in the risk assessment of patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*, **128**, 1408–17.
- Elliott, M.A., Verstovsek, S., Dingli, D., Schwager, S.M., Mesa, R.A., Li, C.Y. & Tefferi, A. (2007) Monocytosis is an adverse prognostic factor for survival in younger patients with primary myelofibrosis. *Leukemia Research*, **31**, 1503–1509.
- Epling-Burnette, P.K., Bai, F., Painter, J.S., Rollison, D.E., Salih, H.R., Krusch, M., Zou, J., Ku, E., Zhong, B., Boulware, D., Moscinski, L., Wei, S., Djeu, J.Y. & List, A.F. (2007) Reduced natural killer (NK) function associated with high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) and reduced expression of activating NK receptors. *Blood*, **109**, 4816–24.
- Epperson, D.E., Nakamura, R., Sauntharajah, Y., Melenhorst, J. & Barrett, A.J. (2001) Oligoclonal T cell expansion in myelodysplastic syndrome: evidence for an autoimmune process. *Leukemia research*, **25**, 1075–83.
- Falantes, J.F., Márquez-Malaver, F.J., Knight, T., Calderón-Cabrera, C., Martino, M.L., González, J., Montero, I., Espigado, I. & Pérez-Simón, J.A. (2017) The incorporation of comorbidities in the prognostication of patients with lower-risk myelodysplastic syndrome*. *Leukemia & Lymphoma*, **58**, 1893–1902.
- Fan, R., Zhang, L.-Y., Wang, H., Yang, B., Han, T., Zhao, X.-L., Wang, W., Wang, X.-Q. & Lin, G.-W. (2012) Methylation of the CpG island near SOX7 gene promoter is correlated with the poor prognosis of patients with myelodysplastic syndrome. *The Tohoku journal of experimental medicine*, **227**, 119–28.
- Fan, R., Zhao, X.-L., Wang, H., He, H.-Y., Peng, Z.-P., Yang, B., Han, T., Wang, W., Wang, X.-Q. & Lin, G.-W. (2014) Abnormal methylation of the sex-determining region Y-box 17 (SOX17) promoter predicts poor prognosis in myelodysplastic syndrome. *Clinical laboratory*, **60**, 1465–74.
- Fenaux, P., Beuscart, R., Lai, J.L., Jouet, J.P. & Bauters, F. (1988) Prognostic factors in

- adult chronic myelomonocytic leukemia: an analysis of 107 cases. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **6**, 1417–24.
- Fenaux, P., Mufti, G.J., Hellstrom-Lindberg, E., Santini, V., Finelli, C., Giagounidis, A., Schoch, R., Gattermann, N., Sanz, G., List, A., Gore, S.D., Seymour, J.F., Bennett, J.M., Byrd, J., Backstrom, J., Zimmerman, L., McKenzie, D., Beach, C. & Silverman, L.R. (2009) Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *The Lancet Oncology*, **10**, 223–232.
- Figueroa, M.E., Abdel-Wahab, O., Lu, C., Ward, P.S., Patel, J., Shih, A., Li, Y., Bhagwat, N., Vasanthakumar, A., Fernandez, H.F., Tallman, M.S., Sun, Z., Wolniak, K., Peeters, J.K., Liu, W., Choe, S.E., Fantin, V.R., Paietta, E., Löwenberg, B., Licht, J.D., et al (2010) Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer cell*, **18**, 553–67.
- Figueroa, M.E., Skrabanek, L., Li, Y., Jiemjit, A., Fandy, T.E., Paietta, E., Fernandez, H., Tallman, M.S., Grealley, J.M., Carraway, H., Licht, J.D., Gore, S.D. & Melnick, A. (2009) MDS and secondary AML display unique patterns and abundance of aberrant DNA methylation. *Blood*, **114**, 3448–58.
- Follo, M.Y., Finelli, C., Clissa, C., Mongiorgi, S., Bosi, C., Martinelli, G., Baccarani, M., Manzoli, L., Martelli, A.M. & Cocco, L. (2009a) Phosphoinositide-Phospholipase C β 1 Mono-Allelic Deletion Is Associated With Myelodysplastic Syndromes Evolution Into Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, **27**, 782–790.
- Follo, M.Y., Finelli, C., Mongiorgi, S., Clissa, C., Bosi, C., Testoni, N., Chiarini, F., Ramazzotti, G., Baccarani, M., Martelli, A.M., Manzoli, L., Martinelli, G. & Cocco, L. (2009b) Reduction of phosphoinositide-phospholipase C beta1 methylation predicts the responsiveness to azacitidine in high-risk MDS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 16811–16816.
- Follo, M.Y., Finelli, C., Mongiorgi, S., Clissa, C., Chiarini, F., Ramazzotti, G., Paolini, S., Martinelli, G., Martelli, A.M. & Cocco, L. (2011) Synergistic induction of PI-PLC β 1 signaling by azacitidine and valproic acid in high-risk myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, **25**, 271–280.
- Follo, M.Y., Russo, D., Finelli, C., Mongiorgi, S., Clissa, C., Fili, C., Colombi, C., Gobbi, M., Manzoli, L., Piazzzi, M., Martelli, A.M. & Cocco, L. (2012) Epigenetic regulation of nuclear PI-PLC β 1 signaling pathway in low-risk MDS patients during azacitidine treatment. *Leukemia*, **26**, 943–950.
- Fraison, J.-B., Mekinian, A., Grignano, E., Kahn, J.-E., Arlet, J.-B., Decaux, O., Denis, G., Buchdahl, A.-L., Omouri, M., Maigne, G., Aouba, A., Leon, N., Berthier, S., Liozon, E., Park, S., Gardin, C., Lortholary, O., Rossignol, J., Fenaux, P., Fain, O., et al (2016) Efficacy of Azacitidine in autoimmune and inflammatory disorders associated with myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia research*, **43**, 13–7.

- Galimberti, S., Ghio, F., Guerrini, F., Ciabatti, E., Grassi, S., Ferreri, M.I. & Petrini, M. (2010) *WT1* expression levels at diagnosis could predict long-term time-to-progression in adult patients affected by acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndromes. *British Journal of Haematology*, **149**, 451–454.
- Garcia-Manero, G., Gore, S.D., Cogle, C., Ward, R., Shi, T., MacBeth, K.J., Laille, E., Giordano, H., Sakoian, S., Jabbour, E., Kantarjian, H. & Skikne, B. (2011) Phase I Study of Oral Azacitidine in Myelodysplastic Syndromes, Chronic Myelomonocytic Leukemia, and Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, **29**, 2521–2527.
- Garcia-Manero, G., Shan, J., Faderl, S., Cortes, J., Ravandi, F., Borthakur, G., Wierda, W.G., Pierce, S., Estey, E., Liu, J., Huang, X. & Kantarjian, H. (2008) A prognostic score for patients with lower risk myelodysplastic syndrome. *Leukemia*, **22**, 538–543.
- Gatto, S., Ball, G., Onida, F., Kantarjian, H.M., Estey, E.H. & Beran, M. (2003) Contribution of α_2 microglobulin levels to the prognostic stratification of survival in patients with myelodysplastic syndrome (MDS). *Blood*, **102**, 1622–1625.
- Geissler, K., Jäger, E., Barna, A., Alendar, T., Ljubuncic, E., Sliwa, T. & Valent, P. (2016) Chronic myelomonocytic leukemia patients with RAS pathway mutations show high in vitro myeloid colony formation in the absence of exogenous growth factors. *Leukemia*, **30**, 2280–2281.
- Genovese, G., Kähler, A.K., Handsaker, R.E., Lindberg, J., Rose, S.A., Bakhoum, S.F., Chambert, K., Mick, E., Neale, B.M., Fromer, M., Purcell, S.M., Svantesson, O., Landén, M., Höglund, M., Lehmann, S., Gabriel, S.B., Moran, J.L., Lander, E.S., Sullivan, P.F., Sklar, P., et al (2014) Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence. *New England Journal of Medicine*, **371**, 2477–2487.
- Germing, U., Gattermann, N., Strupp, C., Aivado, M. & Aul, C. (2000) Validation of the WHO proposals for a new classification of primary myelodysplastic syndromes: a retrospective analysis of 1600 patients. *Leukemia research*, **24**, 983–92.
- Germing, U., Hildebrandt, B., Pfeilstöcker, M., Nösslinger, T., Valent, P., Fonatsch, C., Lübbert, M., Haase, D., Steidl, C., Krieger, O., Stauder, R., Giagounidis, A.A.N., Strupp, C., Kündgen, A., Mueller, T., Haas, R., Gattermann, N. & Aul, C. (2005) Refinement of the international prognostic scoring system (IPSS) by including LDH as an additional prognostic variable to improve risk assessment in patients with primary myelodysplastic syndromes (MDS). *Leukemia*, **19**, 2223–31.
- Germing, U., Kündgen, A. & Gattermann, N. (2004a) Risk Assessment in Chronic Myelomonocytic Leukemia (CMML). *Leukemia & Lymphoma*, **45**, 1311–1318.
- Germing, U., Strupp, C., Aivado, M. & Gattermann, N. (2002) New prognostic parameters for chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*, **100**, 731-2; author reply 732-3.

- Germing, U., Strupp, C., Knipp, S., Kuendgen, A., Giagounidis, A., Hildebrandt, B., Aul, C., Haas, R., Gattermann, N. & Bennett, J.M. (2007) Chronic myelomonocytic leukemia in the light of the WHO proposals. *Haematologica*, **92**, 974–7.
- Germing, U., Strupp, C., Kuendgen, A., Isa, S., Knipp, S., Hildebrandt, B., Giagounidis, A., Aul, C., Gattermann, N. & Haas, R. (2006) Prospective validation of the WHO proposals for the classification of myelodysplastic syndromes. *Haematologica*, **91**, 1596–604.
- Germing, U., Strupp, C., Kündgen, A., Bowen, D., Aul, C., Haas, R. & Gattermann, N. (2004b) No increase in age-specific incidence of myelodysplastic syndromes. *Haematologica*, **89**, 905–10.
- Gerstung, M., Pellagatti, A., Malcovati, L., Giagounidis, A., Porta, M.G. Della, Jädersten, M., Dolatshad, H., Verma, A., Cross, N.C.P., Vyas, P., Killick, S., Hellström-Lindberg, E., Cazzola, M., Papaemmanuil, E., Campbell, P.J. & Boultonwood, J. (2015) Combining gene mutation with gene expression data improves outcome prediction in myelodysplastic syndromes. *Nature communications*, **6**, 5901.
- Geyer, J.T., Tam, W., Liu, Y.-C., Chen, Z., Wang, S.A., Bueso-Ramos, C., Oak, J., Arber, D.A., Hsi, E., Rogers, H.J., Levinson, K., Bagg, A., Hassane, D.C., Hasserjian, R.P. & Orazi, A. (2017) Oligomonocytic chronic myelomonocytic leukemia (chronic myelomonocytic leukemia without absolute monocytosis) displays a similar clinicopathologic and mutational profile to classical chronic myelomonocytic leukemia. *Modern Pathology*, **30**, 1213–1222.
- Giannouli, S., Kanellopoulou, T. & Voulgarelis, M. (2012) Myelodysplasia and autoimmunity. *Current opinion in rheumatology*, **24**, 97–102.
- Giannouli, S., Tzoanopoulos, D., Ritis, K., Kartalis, G., Moutsopoulos, H.M. & Voulgarelis, M. (2004) Autoimmune manifestations in human myelodysplasia: a positive correlation with interferon regulatory factor-1 (IRF-1) expression. *Annals of the rheumatic diseases*, **63**, 578–82.
- Goasguen, J.E., Bennett, J.M., Bain, B.J., Brunning, R., Vallespi, M.-T., Tomonaga, M., Zini, G., Renault, A. & (The International Working Group on Morphology of MDS) (2018) Dyserythropoiesis in the diagnosis of the myelodysplastic syndromes and other myeloid neoplasms: problem areas. *British journal of haematology*, **182**, 526–533.
- Goasguen, J.E., Bennett, J.M., Bain, B.J., Brunning, R., Vallespi, M.-T., Tomonaga, M., Zini, G., Renault, A. & International Working Group on Morphology of MDS (IWGM-MDS) (2014) Proposal for refining the definition of dysgranulopoiesis in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Leukemia research*, **38**, 447–53.
- Goasguen, J.E., Bennett, J.M., Bain, B.J., Brunning, R.D., Vallespi, M.-T., Tomonaga, M., Zini, G., Renault, A. & International Working Group on Morphology of MDS IWGM-MDS (2016) Quality control initiative on the evaluation of the dysmegakaryopoiesis in myeloid neoplasms: Difficulties in the assessment of

- dysplasia. *Leukemia research*, **45**, 75–81.
- Goasguen, J.E., Bennett, J.M., Bain, B.J., Vallespi, T., Brunning, R., Mufti, G.J. & International Working Group on Morphology of Myelodysplastic Syndrome (2009) Morphological evaluation of monocytes and their precursors. *Haematologica*, **94**, 994–7.
- González-Medina, I., Bueno, J., Torrequebrada, A., López, A., Vallespi, T. & Massagué, I. (2002) Two groups of chronic myelomonocytic leukaemia: myelodysplastic and myeloproliferative. Prognostic implications in a series of a single center. *Leukemia research*, **26**, 821–4.
- Gonzalez-Porras, J.R., Cordoba, I., Such, E., Nomdedeu, B., Vallespi, T., Carbonell, F., Luño, E., Ardanaz, M., Ramos, F., Pedro, C., Gomez, V., de Paz, R., Sanchez-Barba, M., Sanz, G.F., Del Cañizo, A.C. & Spanish Myelodysplastic Syndrome Registry (2011) Prognostic impact of severe thrombocytopenia in low-risk myelodysplastic syndrome. *Cancer*, **117**, 5529–37.
- Greco, M., Criscuolo, M., Fianchi, L., Fabiani, E., Pagano, L. & Voso, M. (2011) 5-azacytidine in chronic myelomonocytic leukemia: case report and review of literature. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*, **3**, e2011011.
- Greenberg, P., Cox, C., LeBeau, M.M., Fenaux, P., Morel, P., Sanz, G., Sanz, M., Vallespi, T., Hamblin, T., Oscier, D., Ohyashiki, K., Toyama, K., Aul, C., Mufti, G. & Bennett, J. (1997) International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*, **89**, 2079–88.
- Greenberg, P.L., Stone, R.M., Al-Kali, A., Barta, S.K., Bejar, R., Bennett, J.M., Carraway, H., De Castro, C.M., Deeg, H.J., DeZern, A.E., Fathi, A.T., Frankfurt, O., Gaensler, K., Garcia-Manero, G., Griffiths, E.A., Head, D., Horsfall, R., Johnson, R.A., Juckett, M., Klimek, V.M., et al (2017) Myelodysplastic Syndromes, Version 2.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*, **15**, 60–87.
- Greenberg, P.L., Tuechler, H., Schanz, J., Sanz, G., Garcia-Manero, G., Solé, F., Bennett, J.M., Bowen, D., Fenaux, P., Dreyfus, F., Kantarjian, H., Kuendgen, A., Levis, A., Malcovati, L., Cazzola, M., Cermak, J., Fonatsch, C., Le Beau, M.M., Slovak, M.L., Krieger, O., et al (2012) Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*, **120**, 2454–65.
- Grignano, E., Mekinian, A., Braun, T., Liozon, E., Hamidou, M., Decaux, O., Puéchal, X., Kahn, J.E., Schoindre, Y., Rossignol, J., Lortholary, O., Lioger, B., Hermine, O., Park, S., Ades, L., Montestruc, F., Ricard, L., Gardin, C., Fenaux, P., Fain, O., et al (2016) Autoimmune and inflammatory diseases associated with chronic myelomonocytic leukemia: A series of 26 cases and literature review. *Leukemia research*, **47**, 136–41.
- Grønbaek, K., Müller-Tidow, C., Perini, G., Lehmann, S., Bach Treppendahl, M., Mills, K., Plass, C., Schlegelberger, B. & European Genomics and Epigenomics Study on MDS

- and AML (EuGESMA), COST Action BM0801 (2012) A critical appraisal of tools available for monitoring epigenetic changes in clinical samples from patients with myeloid malignancies. *Haematologica*, **97**, 1380–8.
- Grossmann, V., Bacher, U., Haferlach, C., Schnittger, S., Pöttinger, F., Weissmann, S., Roller, A., Eder, C., Fasan, a, Zenger, M., Staller, M., Kern, W., Kohlmann, A. & Haferlach, T. (2013) Acute erythroid leukemia (AEL) can be separated into distinct prognostic subsets based on cytogenetic and molecular genetic characteristics. *Leukemia*, **27**, 1940–3.
- Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos (2012) Guías españolas de diagnóstico y tratamiento de los síndromes mielodisplásicos y la leucemia mielomonocítica crónica. *Haematología*, **97**, 6–11.
- Guo, J.U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G. & Song, H. (2011) Emerging roles of TET proteins and 5-hydroxymethylcytosines in active DNA demethylation and beyond. *Cell Cycle*, **10**, 2662–2668.
- Haase, D., Germing, U., Schanz, J., Pfeilstöcker, M., Nösslinger, T., Hildebrandt, B., Kundgen, A., Lübbert, M., Kunzmann, R., Giagounidis, A.A.N., Aul, C., Trümper, L., Krieger, O., Stauder, R., Müller, T.H., Wimazal, F., Valent, P., Fonatsch, C. & Steidl, C. (2007) New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood*, **110**, 4385–95.
- Hadjadj, J., Michel, M., Chauveheid, M.-P., Godeau, B., Papo, T. & Sacre, K. (2014) Immune thrombocytopenia in chronic myelomonocytic leukemia. *European journal of haematology*, **93**, 521–6.
- Haferlach, T., Nagata, Y., Grossmann, V., Okuno, Y., Bacher, U., Nagae, G., Schnittger, S., Sanada, M., Kon, A., Alpermann, T., Yoshida, K., Roller, A., Nadarajah, N., Shiraishi, Y., Shiozawa, Y., Chiba, K., Tanaka, H., Koeffler, H.P., Klein, H.-U., Dugas, M., et al (2014) Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, **28**, 241–247.
- Haider, M., Duncavage, E.J., Afaneh, K.F., Bejar, R. & List, A.F. (2017) New Insight Into the Biology, Risk Stratification, and Targeted Treatment of Myelodysplastic Syndromes. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, **37**, 480–494.
- Hasserjian, R.P., Zuo, Z., Garcia, C., Tang, G., Kasyan, A., Luthra, R., Abruzzo, L. V., Kantarjian, H.M., Medeiros, L.J. & Wang, S.A. (2010) Acute erythroid leukemia: a reassessment using criteria refined in the 2008 WHO classification. *Blood*, **115**, 1985–92.
- Herman, J.G. & Baylin, S.B. (2003) Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation. *New England Journal of Medicine*, **349**, 2042–2054.
- Huang, Y., Pastor, W.A., Shen, Y., Tahiliani, M., Liu, D.R. & Rao, A. (2010) The Behaviour of 5-Hydroxymethylcytosine in Bisulfite Sequencing. *PLoS ONE*, **5**, e8888.
- Invernizzi, R., Travaglini, E., Benatti, C., Malcovati, L., Della Porta, M., Cazzola, M. &

- Ascari, E. (2006) Survivin expression, apoptosis and proliferation in chronic myelomonocytic leukemia. *European journal of haematology*, **76**, 494–501.
- Ito, S., D'Alessio, A.C., Taranova, O. V., Hong, K., Sowers, L.C. & Zhang, Y. (2010) Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*, **466**, 1129–1133.
- Itzykson, R., Duchmann, M., Lucas, N. & Solary, E. (2017) CMML: Clinical and molecular aspects. *International Journal of Hematology*, **105**,.
- Itzykson, R. & Fenaux, P. (2014) Epigenetics of myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, **28**, 497–506.
- Itzykson, R., Kosmider, O., Cluzeau, T., Mansat-De Mas, V., Dreyfus, F., Beyne-Rauzy, O., Quesnel, B., Vey, N., Gelsi-Boyer, V., Raynaud, S., Preudhomme, C., Adès, L., Fenaux, P., Fontenay, M. & Groupe Francophone des Myelodysplasies (GFM) (2011) Impact of TET2 mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias. *Leukemia*, **25**, 1147–1152.
- Itzykson, R., Kosmider, O., Renneville, A., Gelsi-Boyer, V., Meggendorfer, M., Morabito, M., Berthon, C., Adès, L., Fenaux, P., Beyne-Rauzy, O., Vey, N., Braun, T., Haferlach, T., Dreyfus, F., Cross, N.C.P., Preudhomme, C., Bernard, O.A., Fontenay, M., Vainchenker, W., Schnittger, S., et al (2013a) Prognostic Score Including Gene Mutations in Chronic Myelomonocytic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, **31**, 2428–2436.
- Itzykson, R., Kosmider, O., Renneville, A., Morabito, M., Preudhomme, C., Berthon, C., Adès, L., Fenaux, P., Platzbecker, U., Gagey, O., Rameau, P., Meurice, G., Oréar, C., Delhommeau, F., Bernard, O.A., Fontenay, M., Vainchenker, W., Droin, N. & Solary, E. (2013b) Clonal architecture of chronic myelomonocytic leukemias. *Blood*, **121**, 2186–98.
- Itzykson, R. & Solary, E. (2013) An evolutionary perspective on chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia*, **27**, 1441–50.
- Jädersten, M., Saft, L., Smith, A., Kulasekararaj, A., Pomplun, S., Göhring, G., Hedlund, A., Hast, R., Schlegelberger, B., Porwit, A., Hellström-Lindberg, E. & Mufti, G.J. (2011) TP53 Mutations in Low-Risk Myelodysplastic Syndromes With del(5q) Predict Disease Progression. *Journal of Clinical Oncology*, **29**, 1971–1979.
- Jaffe, E.S., Harris, N.L., Stein, H., Jaffe et al & Vardiman, J.W. (2001) World Health Organization Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press, World Health Organization: Lyon, France, 2001 IARC Press.
- Jaiswal, S. & Ebert, B.L. (2014) MDS is a stem cell disorder after all. *Cancer Cell*, **25**, 713–714.
- Jaiswal, S., Fontanillas, P., Flannick, J., Manning, A., Grauman, P. V., Mar, B.G., Lindsley, R.C., Mermel, C.H., Burt, N., Chavez, A., Higgins, J.M., Moltchanov, V., Kuo, F.C., Kluk, M.J., Henderson, B., Kinnunen, L., Koistinen, H.A., Ladenvall, C., Getz, G.,

- Correa, A., et al (2014) Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *N Engl J Med December*, **25**, 2488–2498.
- Jaiswal, S., Natarajan, P., Silver, A.J., Gibson, C.J., Bick, A.G., Shvartz, E., McConkey, M., Gupta, N., Gabriel, S., Ardissino, D., Baber, U., Mehran, R., Fuster, V., Danesh, J., Frossard, P., Saleheen, D., Melander, O., Sukhova, G.K., Neuberg, D., Libby, P., et al (2017) Clonal Hematopoiesis and Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *New England Journal of Medicine*, **377**, 111–121.
- Jiang, Y., Dunbar, A., Gondek, L.P., Mohan, S., Rataul, M., O’Keefe, C., Sekeres, M., Sauntharajah, Y. & Maciejewski, J.P. (2009) Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Blood*, **113**, 1315–25.
- Jones, P.A. & Baylin, S.B. (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Reviews Genetics*, **3**, 415–428.
- Jongen-Lavrencic, M., Grob, T., Hanekamp, D., Kavelaars, F.G., al Hinai, A., Zeilemaker, A., Erpelinck-Verschueren, C.A.J., Gradowska, P.L., Meijer, R., Cloos, J., Biemond, B.J., Graux, C., van Marwijk Kooy, M., Manz, M.G., Pabst, T., Passweg, J.R., Havelange, V., Ossenkoppele, G.J., Sanders, M.A., Schuurhuis, G.J., et al (2018) Molecular Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, **378**, 1189–1199.
- Kalina, T., Flores-Montero, J., van der Velden, V.H.J., Martin-Ayuso, M., Böttcher, S., Ritgen, M., Almeida, J., Lhermitte, L., Asnafi, V., Mendonça, a, de Tute, R., Cullen, M., Sedek, L., Vidriales, M.B., Pérez, J.J., te Marvelde, J.G., Mejstrikova, E., Hrusak, O., Szczepański, T., van Dongen, J.J.M., et al (2012) EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*, **26**, 1986–2010.
- Kantarjian, H., O’Brien, S., Ravandi, F., Cortes, J., Shan, J., Bennett, J.M., List, A., Fenaux, P., Sanz, G., Issa, J.-P., Freireich, E.J. & Garcia-Manero, G. (2008) Proposal for a new risk model in myelodysplastic syndrome that accounts for events not considered in the original International Prognostic Scoring System. *Cancer*, **113**, 1351–1361.
- Kao, J.M., McMillan, A. & Greenberg, P.L. (2008) International MDS risk analysis workshop (IMRAW)/IPSS reanalyzed: impact of cytopenias on clinical outcomes in myelodysplastic syndromes. *American journal of hematology*, **83**, 765–70.
- Katzman, J., Shaham, U., Cloninger, A., Bates, J., Jiang, T. & Kluger, Y. (2016) Deep Survival: A Deep Cox Proportional Hazards Network. *undefined*.
- Kennedy, J.A. & Ebert, B.L. (2017) Clinical Implications of Genetic Mutations in Myelodysplastic Syndrome. *Journal of Clinical Oncology*, **35**, 968–974.
- Kerkhoff, N., Bontkes, H.J., Westers, T.M., de Gruijl, T.D., Kordasti, S. & van de Loosdrecht, A.A. (2013) Dendritic cells in myelodysplastic syndromes: from pathogenesis to immunotherapy. *Immunotherapy*, **5**, 621–37.
- Kiladjian, J.-J., Bourgeois, E., Lobe, I., Braun, T., Visentin, G., Bourhis, J.-H., Fenaux, P.,

- Chouaib, S. & Caignard, A. (2006) Cytolytic function and survival of natural killer cells are severely altered in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, **20**, 463–70.
- Kittang, A.O., Kordasti, S., Sand, K.E., Costantini, B., Kramer, A.M., Perezabellan, P., Seidl, T., Rye, K.P., Hagen, K.M., Kulasekararaj, A., Bruserud, Ø. & Mufti, G.J. (2016) Expansion of myeloid derived suppressor cells correlates with number of T regulatory cells and disease progression in myelodysplastic syndrome. *Oncoimmunology*, **5**, e1062208.
- Knapp, R.H., Dewald, G.W. & Pierre, R. V (1985) Cytogenetic studies in 174 consecutive patients with preleukemic or myelodysplastic syndromes. *Mayo Clinic proceedings*, **60**, 507–16.
- Ko, M., Huang, Y., Jankowska, A.M., Pape, U.J., Tahiliani, M., Bandukwala, H.S., An, J., Lamperti, E.D., Koh, K.P., Ganetzky, R., Liu, X.S., Aravind, L., Agarwal, S., Maciejewski, J.P. & Rao, A. (2010) Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature*, **468**, 839–43.
- Komrokji, R., Ramadan, H., Al Ali, N., Corrales-Yeppez, M., Zhang, L., Padron, E., Lancet, J. & List, A. (2015) Validation of the Lower-Risk MD Anderson Prognostic Scoring System for Patients With Myelodysplastic Syndrome. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia*, **15 Suppl**, S60-3.
- Komrokji, R.S., Corrales-Yeppez, M., Al Ali, N., Kharfan-Dabaja, M., Padron, E., Fields, T., Lancet, J.E. & List, A.F. (2012) Validation of the MD Anderson Prognostic Risk Model for patients with myelodysplastic syndrome. *Cancer*, **118**, 2659–64.
- Kon, A., Shih, L.-Y., Minamino, M., Sanada, M., Shiraishi, Y., Nagata, Y., Yoshida, K., Okuno, Y., Bando, M., Nakato, R., Ishikawa, S., Sato-Otsubo, A., Nagae, G., Nishimoto, A., Haferlach, C., Nowak, D., Sato, Y., Alpermann, T., Nagasaki, M., Shimamura, T., et al (2013) Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms. *Nature genetics*, **45**, 1232–7.
- Kordasti, S.Y., Afzali, B., Lim, Z., Ingram, W., Hayden, J., Barber, L., Matthews, K., Chelliah, R., Guinn, B., Lombardi, G., Farzaneh, F. & Mufti, G.J. (2009) IL-17-producing CD4(+) T cells, pro-inflammatory cytokines and apoptosis are increased in low risk myelodysplastic syndrome. *British journal of haematology*, **145**, 64–72.
- Kordasti, S.Y., Ingram, W., Hayden, J., Darling, D., Barber, L., Afzali, B., Lombardi, G., Wlodarski, M.W., Maciejewski, J.P., Farzaneh, F. & Mufti, G.J. (2007) CD4+CD25high Foxp3+ regulatory T cells in myelodysplastic syndrome (MDS). *Blood*, **110**, 847–50.
- Kosmider, O., Gelsi-Boyer, V., Cheok, M., Grabar, S., Della-Valle, V., Picard, F., Viguié, F., Quesnel, B., Beyne-Rauzy, O., Solary, E., Vey, N., Hunault-Berger, M., Fenaux, P., Mansat-De Mas, V., Delabesse, E., Guardiola, P., Lacombe, C., Vainchenker, W., Preudhomme, C., Dreyfus, F., et al (2009) TET2 mutation is an independent favorable prognostic factor in myelodysplastic syndromes (MDSs). *Blood*, **114**, 3285–91.

- Kotsianidis, I., Bouchliou, I., Nakou, E., Spanoudakis, E., Margaritis, D., Christophoridou, A. V., Anastasiades, A., Tsigalou, C., Bourikas, G., Karadimitris, A. & Tsatalas, C. (2009) Kinetics, function and bone marrow trafficking of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in myelodysplastic syndromes (MDS). *Leukemia*, **23**, 510–8.
- Kulasekararaj, A.G., Jiang, J., Smith, A.E., Mohamedali, A.M., Mian, S., Gandhi, S., Gaken, J., Czepulkowski, B., Marsh, J.C.W. & Mufti, G.J. (2014) Somatic mutations identify a subgroup of aplastic anemia patients who progress to myelodysplastic syndrome. *Blood*, **124**, 2698–704.
- Kurtovic-Kozaric, A., Przychodzen, B., Singh, J., Konarska, M.M., Clemente, M.J., Otrrock, Z.K., Nakashima, M., Hsi, E.D., Yoshida, K., Shiraishi, Y., Chiba, K., Tanaka, H., Miyano, S., Ogawa, S., Boultonwood, J., Makishima, H., Maciejewski, J.P. & Padgett, R.A. (2015) PRPF8 defects cause missplicing in myeloid malignancies. *Leukemia*, **29**, 126–36.
- Kwok, B., Hall, J.M., Witte, J.S., Xu, Y., Reddy, P., Lin, K., Flamholz, R., Dabbas, B., Yung, A., Al-Hafidh, J., Balmert, E., Vaupel, C., El Hader, C., McGinniss, M.J., Nahas, S.A., Kines, J. & Bejar, R. (2015) MDS-associated somatic mutations and clonal hematopoiesis are common in idiopathic cytopenias of undetermined significance. *Blood*, **126**, 2355–2361.
- Lamarque, M., Raynaud, S., Itzykson, R., Thepot, S., Quesnel, B., Dreyfus, F., Rauzy, O.B., Turlure, P., Vey, N., Recher, C., Dartigeas, C., Legros, L., Delaunay, J., Visanica, S., Stamatoullas, A., Fenaux, P. & Adès, L. (2012) The revised IPSS is a powerful tool to evaluate the outcome of MDS patients treated with azacitidine: the GFM experience. *Blood*, **120**, 5084–5.
- Langemeijer, S.M.C., Kuiper, R.P., Berends, M., Knops, R., Aslanyan, M.G., Massop, M., Stevens-Linders, E., van Hoogen, P., van Kessel, A.G., Raymakers, R.A.P., Kamping, E.J., Verhoef, G.E., Verburch, E., Hagemeijer, A., Vandenberghe, P., de Witte, T., van der Reijden, B.A. & Jansen, J.H. (2009) Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nature Genetics*, **41**, 838–842.
- van Leeuwen-Kerkhoff, N., Lundberg, K., Westers, T.M., Kordasti, S., Bontkes, H.J., de Gruijl, T.D., Lindstedt, M. & van de Loosdrecht, A.A. (2017) Transcriptional profiling reveals functional dichotomy between human slan⁺ non-classical monocytes and myeloid dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology*, **102**, 1055–1068.
- Lessard, M., Struski, S., Leymarie, V., FLANDRIN, G., Lafage-Pochitaloff, M., MOZZICONACCI, M.-J., Talmant, P., Bastard, C., CHARRIN, C., BARANGER, L., Hélias, C., Cornillet-Lefebvre, P., Mugneret, F., Cabrol, C., Pagès, M.-P., Fert-Ferret, D., Nguyen-Khac, F., Quilichini, B., Barin, C., Berger, R., et al (2005) Cytogenetic study of 75 erythroleukemias. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, **163**, 113–122.
- Ley, T.J., Ding, L., Walter, M.J., McLellan, M.D., Lamprecht, T., Larson, D.E., Kandoth, C., Payton, J.E., Baty, J., Welch, J., Harris, C.C., Lichti, C.F., Townsend, R.R., Fulton, R.S., Dooling, D.J., Koboldt, D.C., Schmidt, H., Zhang, Q., Osborne, J.R., Lin, L., et al

- (2010) DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*, **363**, 2424–33.
- Li, Z., Cai, X., Cai, C.-L., Wang, J., Zhang, W., Petersen, B.E., Yang, F.-C. & Xu, M. (2011) Deletion of Tet2 in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies. *Blood*, **118**, 4509–4518.
- Lin, J., Yao, D., Qian, J., Wang, Y., Han, L., Jiang, Y., Fei, X., Cen, J. & Chen, Z. (2008) Methylation status of fragile histidine triad (FHIT) gene and its clinical impact on prognosis of patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia Research*, **32**, 1541–1545.
- Liu, X., Zhang, G., Yi, Y., Xiao, L., Pei, M., Liu, S., Luo, Y., Zhong, H., Xu, Y., Zheng, W. & Shen, J. (2013) Decreased 5-hydroxymethylcytosine levels are associated with *TET2* mutation and unfavorable overall survival in myelodysplastic syndromes. *Leukemia & Lymphoma*, **54**, 2466–2473.
- Van De Loosdrecht, A.A., Alhan, C., Béné, M.C., Della Porta, M.G., Dräger, A.M., Feuillard, J., Font, P., Germing, U., Haase, D., Homburg, C.H., Ireland, R., Jansen, J.H., Kern, W., Malcovati, L., Te Marvelde, J.G., Mufti, G.J., Ogata, K., Orfao, A., Ossenkoppele, G.J., Porwit, A., et al (2009) Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: Report from the first European LeukemiaNet working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*, **94**, 1124–1134.
- Luskin, M.R., Cronin, A.M., Owens, R.L., DeAngelo, D.J., Stone, R.M., Wadleigh, M., Steensma, D.P. & Abel, G.A. (2017) Self-reported sleep disturbance and survival in myelodysplastic syndromes. *British journal of haematology*, **177**, 562–566.
- Ma, L., Delforge, M., van Duppen, V., Verhoef, G., Emanuel, B., Boogaerts, M., Hagemeijer, A. & Vandenberghe, P. (2004) Circulating myeloid and lymphoid precursor dendritic cells are clonally involved in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, **18**, 1451–6.
- Malcovati, L. (2007) Impact of transfusion dependency and secondary iron overload on the survival of patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia research*, **31 Suppl 3**, S2-6.
- Malcovati, L., Galli, A., Travaglino, E., Ambaglio, I., Rizzo, E., Molteni, E., Elena, C., Ferretti, V.V., Catricalà, S., Bono, E., Todisco, G., Bianchessi, A., Rumi, E., Zibellini, S., Pietra, D., Boveri, E., Camaschella, C., Toniolo, D., Papaemmanuil, E., Ogawa, S., et al (2017) Clinical significance of somatic mutation in unexplained blood cytopenia. *Blood*, **129**, blood-2017-01-763425.
- Malcovati, L., Germing, U., Kuendgen, A., Della Porta, M.G., Pascutto, C., Invernizzi, R., Giagounidis, A., Hildebrandt, B., Bernasconi, P., Knipp, S., Strupp, C., Lazzarino, M., Aul, C. & Cazzola, M. (2007) Time-Dependent Prognostic Scoring System for Predicting Survival and Leukemic Evolution in Myelodysplastic Syndromes. *Journal of Clinical Oncology*, **25**, 3503–3510.

- Malcovati, L., Hellström-Lindberg, E., Bowen, D., Adès, L., Cermak, J., Del Cañizo, C., Della Porta, M.G., Fenaux, P., Gattermann, N., Germing, U., Jansen, J.H., Mittelman, M., Mufti, G., Platzbecker, U., Sanz, G.F., Selleslag, D., Skov-Holm, M., Stauder, R., Symeonidis, A., van de Loosdrecht, A.A., et al (2013) Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood*, **122**, 2943–64.
- Malcovati, L., Papaemmanuil, E., Bowen, D.T., Boultonwood, J., Porta, M.G. Della, Pascutto, C., Travaglino, E., Groves, M.J., Godfrey, A.L., Ambaglio, I., Galli, A., Vià, M.C. Da, Conte, S., Tauro, S., Keenan, N., Hyslop, A., Hinton, J., Laura, J., Wainscoat, J.S., Futreal, P.A., et al (2011a) Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic / myeloproliferative neoplasms. *Blood*, **118**, 6239–6247.
- Malcovati, L., Porta, M.G. Della, Pascutto, C., Invernizzi, R., Boni, M., Travaglino, E., Passamonti, F., Arcaini, L., Maffioli, M., Bernasconi, P., Lazzarino, M. & Cazzola, M. (2005) Prognostic Factors and Life Expectancy in Myelodysplastic Syndromes Classified According to WHO Criteria: A Basis for Clinical Decision Making. *Journal of Clinical Oncology*, **23**, 7594–7603.
- Malcovati, L., Della Porta, M.G., Strupp, C., Ambaglio, I., Kuendgen, A., Nachtkamp, K., Travaglino, E., Invernizzi, R., Pascutto, C., Lazzarino, M., Germing, U. & Cazzola, M. (2011b) Impact of the degree of anemia on the outcome of patients with myelodysplastic syndrome and its integration into the WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS). *Haematologica*, **96**, 1433–40.
- Mallo, M., Cervera, J., Schanz, J., Such, E., García-Manero, G., Luño, E., Steidl, C., Espinet, B., Vallespi, T., Germing, U., Blum, S., Ohyashiki, K., Grau, J., Pfeilstöcker, M., Hernández, J.M., Noesslinger, T., Giagounidis, A., Aul, C., Calasanz, M.J., Martín, M.L., et al (2011) Impact of adjunct cytogenetic abnormalities for prognostic stratification in patients with myelodysplastic syndrome and deletion 5q. *Leukemia*, **25**, 110–20.
- Mallo, M., del Rey, M., Ibáñez, M., Calasanz, M.J., Arenillas, L., Larráyo, M.J., Pedro, C., Jerez, A., Maciejewski, J., Costa, D., Nomdedeu, M., Díez-Campelo, M., Lumberras, E., González-Martínez, T., Marugán, I., Such, E., Cervera, J., Cigudosa, J.C., Álvarez, S., Florensa, L., et al (2013) Response to lenalidomide in myelodysplastic syndromes with del(5q): influence of cytogenetics and mutations. *British Journal of Haematology*, **162**, 74–86.
- Mangi, M.H., Salisbury, J.R. & Mufti, G.J. (1991) Abnormal localization of immature precursors (ALIP) in the bone marrow of myelodysplastic syndromes: current state of knowledge and future directions. *Leukemia research*, **15**, 627–39.
- Marcondes, A.M., Mhyre, A.J., Stirewalt, D.L., Kim, S.-H., Dinarello, C.A. & Deeg, H.J. (2008) Dysregulation of IL-32 in myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia modulates apoptosis and impairs NK function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 2865–70.

- Matarraz, S., Almeida, J., Flores-Montero, J., Lécresse, Q., Guerri, V., López, A., Bárrera, S., Van Der Velden, V.H.J., Te Marvelde, J.G., Van Dongen, J.J.M. & Orfao, A. (2017) Introduction to the diagnosis and classification of monocytic-lineage leukemias by flow cytometry. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, **92**, 218–227.
- Matsuda, A., Germing, U., Jinnai, I., Iwanaga, M., Misumi, M., Kuendgen, A., Strupp, C., Miyazaki, Y., Tsushima, H., Sakai, M., Bessho, M., Gattermann, N., Aul, C. & Tomonaga, M. (2007) 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*, **21**, 678–86.
- Mazzella, F.M., Smith, D., Horn, P., Cotelingam, J.D., Rector, J.T., Shrit, M.A., Pesce, A. & Schumacher, H.R. (2006) Prognostic significance of pronormoblasts in erythrocyte predominant myelodysplastic patients. *American journal of hematology*, **81**, 484–91.
- Meggendorfer, M., Haferlach, T., Alpermann, T., Jeromin, S., Haferlach, C., Kern, W. & Schnittger, S. (2014) Specific molecular mutation patterns delineate chronic neutrophilic leukemia, atypical chronic myeloid leukemia, and chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica*, **99**, e244–e246.
- Meggendorfer, M., Roller, A., Haferlach, T., Eder, C., Dicker, F., Grossmann, V., Kohlmann, A., Alpermann, T., Yoshida, K., Ogawa, S., Koefler, H.P., Kern, W., Haferlach, C. & Schnittger, S. (2012) SRSF2 mutations in 275 cases with chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Blood*, **120**, 3080–3088.
- Meldi, K., Qin, T., Buchi, F., Droin, N., Sotzen, J., Micol, J.-B., Selimoglu-Buet, D., Masala, E., Allione, B., Gioia, D., Poloni, A., Lunghi, M., Solary, E., Abdel-Wahab, O., Santini, V. & Figueroa, M.E. (2015) Specific molecular signatures predict decitabine response in chronic myelomonocytic leukemia. *Journal of Clinical Investigation*, **125**, 1857–1872.
- Montoro, J., Gallur, L., Merchán, B., Molero, A., Roldán, E., Martínez-Valle, F., Villacampa, G., Navarrete, M., Ortega, M., Castellví, J., Saumell, S., Bobillo, S., Bosch, F. & Valcárcel, D. (2018) Autoimmune disorders are common in myelodysplastic syndrome patients and confer an adverse impact on outcomes. *Annals of hematology*, **97**, 1349–1356.
- Morel, P., Hebbbar, M., Lai, J.L., Duhamel, A., Preudhomme, C., Wattel, E., Bauters, F. & Fenaux, P. (1993) Cytogenetic analysis has strong independent prognostic value in de novo myelodysplastic syndromes and can be incorporated in a new scoring system: a report on 408 cases. *Leukemia*, **7**, 1315–23.
- Mossner, M., Jann, J.-C., Nowak, D., Platzbecker, U., Giagounidis, A., Götze, K., Letsch, A., Haase, D., Shirneshan, K., Bräulke, F., Schlenk, R.F., Haferlach, T., Schafhausen, P., Bug, G., Lübbert, M., Ganser, A., Büsche, G., Schuler, E., Nowak, V., Pressler, J., et al (2016) Prevalence, clonal dynamics and clinical impact of TP53 mutations in patients with myelodysplastic syndrome with isolated deletion (5q) treated with lenalidomide: results from a prospective multicenter study of the german MDS

- study group (GMDS). *Leukemia*, **30**, 1956–1959.
- Mufti, G.J., Bennett, J.M., Goasguen, J., Bain, B.J., Baumann, I., Brunning, R., Cazzola, M., Fenaux, P., Germing, U., Hellström-Lindberg, E., Jinnai, I., Manabe, A., Matsuda, A., Niemeyer, C.M., Sanz, G., Tomonaga, M., Vallespi, T., Yoshimi, A. & International Working Group on Morphology of Myelodysplastic Syndrome (2008) 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*, **93**, 1712–7.
- Mufti, G.J., McLornan, D.P., van de Loosdrecht, A.A., Germing, U. & Hasserjian, R.P. (2018) Diagnostic algorithm for lower-risk myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, **32**, 1679–1696.
- Muto, T., Sashida, G., Oshima, M., Wendt, G.R., Mochizuki-Kashio, M., Nagata, Y., Sanada, M., Miyagi, S., Saraya, A., Kamio, A., Nagae, G., Nakaseko, C., Yokote, K., Shimoda, K., Koseki, H., Suzuki, Y., Sugano, S., Aburatani, H., Ogawa, S. & Iwama, A. (2013) Concurrent loss of *Ezh2* and *Tet2* cooperates in the pathogenesis of myelodysplastic disorders. *The Journal of Experimental Medicine*, **210**, 2627–2639.
- Naqvi, K., Garcia-Manero, G., Sardesai, S., Oh, J., Vigil, C.E., Pierce, S., Lei, X., Shan, J., Kantarjian, H.M. & Suarez-Almazor, M.E. (2011) Association of Comorbidities With Overall Survival in Myelodysplastic Syndrome: Development of a Prognostic Model. *Journal of Clinical Oncology*, **29**, 2240–2246.
- Nazha, A., Al-Issa, K., Hamilton, B.K., Radivoyevitch, T., Gerds, A.T., Mukherjee, S., Adema, V., Zarzour, A., Abuhadra, N., Patel, B.J., Hirsch, C.M., Advani, A., Przychodzen, B., Carraway, H.E., Maciejewski, J.P. & Sekeres, M.A. (2017) Adding molecular data to prognostic models can improve predictive power in treated patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, **31**, 2848–2850.
- Nazha, A. & Bejar, R. (2017) Molecular Data and the IPSS-R: How Mutational Burden Can Affect Prognostication in MDS. *Current Hematologic Malignancy Reports*, **12**, 461–467.
- Neukirchen, J., Lauseker, M., Blum, S., Giagounidis, A., Lübbert, M., Martino, S., Siragusa, S., Schlenk, R.F., Platzbecker, U., Hofmann, W.-K., Götze, K., Palumbo, G.A., Magrin, S., Kündgen, A., Aul, C., Hildebrandt, B., Hasford, J., Kobbe, G., Haas, R. & Germing, U. (2014) Validation of the revised international prognostic scoring system (IPSS-R) in patients with myelodysplastic syndrome: a multicenter study. *Leukemia research*, **38**, 57–64.
- Nikpour, M., Scharenberg, C., Liu, a, Conte, S., Karimi, M., Mortera-Blanco, T., Gai, V., Fernandez-Mercado, M., Papaemmanuil, E., Höglstrand, K., Jansson, M., Vedin, I., Stephen Wainscoat, J., Campbell, P., Cazzola, M., Boulwood, J., Grandien, a & Hellström-Lindberg, E. (2013) The transporter ABCB7 is a mediator of the phenotype of acquired refractory anemia with ring sideroblasts. *Leukemia*, **27**, 889–96.

- Nilsson, L., Astrand-Grundström, I., Arvidsson, I., Jacobsson, B., Hellström-Lindberg, E., Hast, R. & Jacobsen, S.E. (2000) Isolation and characterization of hematopoietic progenitor/stem cells in 5q-deleted myelodysplastic syndromes: evidence for involvement at the hematopoietic stem cell level. *Blood*, **96**, 2012–21.
- Nomdedeu, M., Calvo, X., Pereira, A., Carrió, A., Solé, F., Luño, E., Cervera, J., Vallespi, T., Muñoz, C., Gómez, C., Arias, A., Such, E., Sanz, G., Grau, J., Insunza, A., Calasanz, M.-J., Ardanaz, M.-T., Hernández-Rivas, J.-M., Azaceta, G., Álvarez, S., et al (2016) Prognostic impact of chromosomal translocations in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia patients. A study by the spanish group of myelodysplastic syndromes. *Genes Chromosomes and Cancer*, **55**, 322–327.
- Nomdedeu, M., Pereira, A., Calvo, X., Colomer, J., Sole, F., Arias, A., Gomez, C., Luño, E., Cervera, J., Arnan, M., Pomares, H., Ramos, F., Oíartzabal, I., Espinet, B., Pedro, C., Arrizabalaga, B., Blanco, M.L., Tormo, M., Hernandez-Rivas, J.M., Díez-Campelo, M., et al (2017a) Clinical and biological significance of isolated Y chromosome loss in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia. A report from the Spanish MDS Group. *Leukemia Research*, **63**, 85–89.
- Nomdedeu, M., Pereira, A., Ramos, F., Valcárcel, D., Costa, D., Arnan, M., Calvo, X., Pomares, H., Luño, E., Díaz-Campelo, M., Collado, R., de Paz, R., Falantes, J.-F., Pedro, C., Marco, J., Oíartzabal, I., Sánchez-García, J., Tormo, M., Cedená, M.-T., Nomdedeu, B., et al (2017b) Excess mortality in the myelodysplastic syndromes. *American Journal of Hematology*, **92**, 149–154.
- Nowell, P.C. & Besa, E.C. (1989) Prognostic significance of single chromosome abnormalities in preleukemic states. *Cancer genetics and cytogenetics*, **42**, 1–7.
- Nowell, P.C., Besa, E.C., Stelmach, T. & Finan, J.B. (1986) Chromosome studies in preleukemic states. V. Prognostic significance of single versus multiple abnormalities. *Cancer*, **58**, 2571–5.
- Ogata, K., Della Porta, M.G., Malcovati, L., Picone, C., Yokose, N., Matsuda, A., Yamashita, T., Tamura, H., Tsukada, J. & Dan, K. (2009) Diagnostic utility of flow cytometry in low-grade myelodysplastic syndromes: A prospective validation study. *Haematologica*, **94**, 1066–1074.
- Ogata, K., Satoh, C., Hyodo, H., Tamura, H., Dan, K. & Yoshida, Y. (2004) Association between phenotypic features of blasts and the blast percentage in bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia research*, **28**, 1171–5.
- Ogawa, M. (1993) Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*, **81**, 2844–53.
- Ok, C.Y., Hasserjian, R.P., Fox, P.S., Stingo, F., Zuo, Z., Young, K.H., Patel, K., Medeiros, L.J., Garcia-Manero, G. & Wang, S.A. (2014) Application of the international prognostic scoring system-revised in therapy-related myelodysplastic syndromes and oligoblastic acute myeloid leukemia. *Leukemia*, **28**, 185–9.

- Ok, C.Y., Patel, K.P., Garcia-Manero, G., Routbort, M.J., Fu, B., Tang, G., Goswami, M., Singh, R., Kanagal-Shamanna, R., Pierce, S.A., Young, K.H., Kantarjian, H.M., Medeiros, L.J., Luthra, R. & Wang, S.A. (2015a) Mutational profiling of therapy-related myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia by next generation sequencing, a comparison with de novo diseases. *Leukemia research*, **39**, 348–54.
- Ok, C.Y., Patel, K.P., Garcia-Manero, G., Routbort, M.J., Peng, J., Tang, G., Goswami, M., Young, K.H., Singh, R., Medeiros, L.J., Kantarjian, H.M., Luthra, R. & Wang, S.A. (2015b) TP53 mutation characteristics in therapy-related myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia is similar to de novo diseases. *Journal of hematology & oncology*, **8**, 45.
- Onida, F., Barosi, G., Leone, G., Malcovati, L., Morra, E., Santini, V., Specchia, G. & Tura, S. (2013) Management recommendations for chronic myelomonocytic leukemia: consensus statements from the SIE, SIES, GITMO groups. *Haematologica*, **98**, 1344–52.
- Onida, F., Kantarjian, H.M., Smith, T.L., Ball, G., Keating, M.J., Estey, E.H., Glassman, A.B., Albitar, M., Kwari, M.I. & Beran, M. (2002) Prognostic factors and scoring systems in chronic myelomonocytic leukemia: a retrospective analysis of 213 patients. *Blood*, **99**, 840–9.
- Padron, E., Garcia-Manero, G., Patnaik, M.M., Itzykson, R., Lasho, T., Nazha, A., Rampal, R.K., Sanchez, M.E., Jabbour, E., Al Ali, N.H., Thompson, Z., Colla, S., Fenaux, P., Kantarjian, H.M., Killick, S., Sekeres, M.A., List, A.F., Onida, F., Komrokji, R.S., Tefferi, A., et al (2015) An international data set for CMML validates prognostic scoring systems and demonstrates a need for novel prognostication strategies. *Blood cancer journal*, **5**, e333.
- Palomo, L., Malinverni, R., Cabezón, M., Xicoy, B., Arnan, M., Coll, R., Pomares, H., García, O., Fuster-Tormo, F., Grau, J., Feliu, E., Solé, F., Buschbeck, M. & Zamora, L. (2018) DNA methylation profile in chronic myelomonocytic leukemia associates with distinct clinical, biological and genetic features. *Epigenetics*, **13**, 8–18.
- Papaemmanuil, E., Cazzola, M., Boulton, J., Malcovati, L., Vyas, P., Bowen, D., Pellagatti, A., Wainscoat, J.S., Hellstrom-Lindberg, E., Gambacorti-Passerini, C., Godfrey, A.L., Rapado, I., Cvejic, A., Rance, R., McGee, C., Ellis, P., Mudie, L.J., Stephens, P.J., McLaren, S., Massie, C.E., et al (2011) Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *The New England journal of medicine*, **365**, 1384–95.
- Papaemmanuil, E., Gerstung, M., Malcovati, L., Tauro, S., Gundem, G., Van Loo, P., Yoon, C.J., Ellis, P., Wedge, D.C., Pellagatti, A., Shlien, A., Groves, M.J., Forbes, S.A., Raine, K., Hinton, J., Mudie, L.J., McLaren, S., Hardy, C., Latimer, C., Della Porta, M.G., et al (2013) Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*, **122**, 3616–27; quiz 3699.
- Parcharidou, A., Raza, A., Economopoulos, T., Papageorgiou, E., Anagnostou, D., Papadaki, T. & Raptis, S. (1999) Extensive apoptosis of bone marrow cells as

- evaluated by the in situ end-labelling (ISEL) technique may be the basis for ineffective haematopoiesis in patients with myelodysplastic syndromes. *European journal of haematology*, **62**, 19–26.
- Park, S., Picard, F., Guesnu, M., Maloum, K., Leblond, V. & Dreyfus, F. (2004) Erythroleukaemia and RAEB-t: a same disease? *Leukemia*, **18**, 888–90.
- Parker, J.E., Mufti, G.J., Rasool, F., Mijovic, A., Devereux, S. & Pagliuca, A. (2000) The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS. *Blood*, **96**, 3932–8.
- Passweg, J.R., Giagounidis, A.A.N., Simcock, M., Aul, C., Dobbelsstein, C., Stadler, M., Ossenkoppele, G., Hofmann, W.-K., Schilling, K., Tichelli, A. & Ganser, A. (2011) Immunosuppressive therapy for patients with myelodysplastic syndrome: a prospective randomized multicenter phase III trial comparing antithymocyte globulin plus cyclosporine with best supportive care--SAKK 33/99. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **29**, 303–9.
- Patnaik, M. & Tefferi, A. (2016) Cytogenetic and molecular abnormalities in chronic myelomonocytic leukemia MM Patnaik and A Tefferi. *Nature Publishing Group*.
- Patnaik, M.M., Itzykson, R., Lasho, T.L., Kosmider, O., Finke, C.M., Hanson, C.A., Knudson, R.A., Ketterling, R.P., Tefferi, A. & Solary, E. (2014) ASXL1 and SETBP1 mutations and their prognostic contribution in chronic myelomonocytic leukemia: a two-center study of 466 patients. *Leukemia*, **28**, 2206–12.
- Patnaik, M.M., Padron, E., LaBorde, R.R., Lasho, T.L., Finke, C.M., Hanson, C.A., Hodnefield, J.M., Knudson, R.A., Ketterling, R.P., Al-kali, A., Pardanani, A., Ali, N.A., Komrokji, R.S., Komroji, R.S. & Tefferi, A. (2013) Mayo prognostic model for WHO-defined chronic myelomonocytic leukemia: ASXL1 and spliceosome component mutations and outcomes. *Leukemia*, **27**, 1504–10.
- Patnaik, M.M. & Tefferi, A. (2018) Chronic myelomonocytic leukemia: 2018 update on diagnosis, risk stratification and management. *American Journal of Hematology*, **93**, 824–840.
- Patnaik, M.M., Timm, M.M., Vallapureddy, R., Lasho, T.L., Ketterling, R.P., Gangat, N., Shi, M., Tefferi, A., Solary, E., Reichard, K.K. & Jevremovic, D. (2017) Flow cytometry based monocyte subset analysis accurately distinguishes chronic myelomonocytic leukemia from myeloproliferative neoplasms with associated monocytosis. *Blood Cancer Journal*, **7**, e584;
- Peker, D., Padron, E., Bennett, J.M., Zhang, X., Horna, P., Epling-Burnette, P.K., Lancet, J.E., Pinilla-Ibarz, J., Moscinski, L., List, A.F., Komrokji, R.S. & Zhang, L. (2015) A close association of autoimmune-mediated processes and autoimmune disorders with chronic myelomonocytic leukemia: observation from a single institution. *Acta haematologica*, **133**, 249–56.

- Pellagatti, A., Benner, A., Mills, K.I., Cazzola, M., Giagounidis, A., Perry, J., Malcovati, L., Della Porta, M.G., Jädersten, M., Verma, A., McDonald, E.-J., Killick, S., Hellström-Lindberg, E., Bullinger, L., Wainscoat, J.S. & Boulwood, J. (2013) Identification of gene expression-based prognostic markers in the hematopoietic stem cells of patients with myelodysplastic syndromes. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **31**, 3557–64.
- Pellagatti, A., Marafioti, T., Paterson, J.C., Malcovati, L., Della Porta, M.G., Jädersten, M., Pushkaran, B., George, T.I., Arber, D.A., Killick, S., Giagounidis, A., Hellström-Lindberg, E., Cazzola, M., Wainscoat, J.S. & Boulwood, J. (2009) Marked downregulation of the granulopoiesis regulator LEF1 is associated with disease progression in the myelodysplastic syndromes. *British journal of haematology*, **146**, 86–90.
- Pfeilstöcker, M., Tuechler, H., Sanz, G., Schanz, J., Garcia-Manero, G., Solé, F., Bennett, J.M., Bowen, D., Fenaux, P., Dreyfus, F., Kantarjian, H., Kuendgen, A., Malcovati, L., Cazzola, M., Cermak, J., Fonatsch, C., Le Beau, M.M., Slovak, M.L., Levis, A., Luebbert, M., et al (2016) Time-dependent changes in mortality and transformation risk in MDS. *Blood*, **128**, 902–910.
- Pierre, R. V., Catovsky, D., Mufti, G.J., Swansbury, G.J., Mecucci, C., Dewald, G.W., Ruutu, T., Van Den Berghe, H., Rowley, J.D. & Mitelman, F. (1989) Clinical-cytogenetic correlations in myelodysplasia (preleukemia). *Cancer genetics and cytogenetics*, **40**, 149–61.
- Ploemacher, R.E. (1999) Characterisation and biology of normal human haematopoietic stem cells. *Haematologica*, **84 Suppl EHA-4**, 4–7.
- Poloni, A., Goteri, G., Zizzi, A., Serrani, F., Trappolini, S., Costantini, B., Mariani, M., Olivieri, A., Catarini, M., Centurioni, R., Alesiani, F., Giantomassi, F., Stramazotti, D., Biagetti, S., Alfonsi, S., Berardinelli, E. & Leoni, P. (2013) Prognostic role of immunohistochemical analysis of 5 mc in myelodysplastic syndromes. *European Journal of Haematology*, **91**, 219–227.
- Della Porta, M.G., Alessandrino, E.P., Bacigalupo, A., van Lint, M.T., Malcovati, L., Pascutto, C., Falda, M., Bernardi, M., Onida, F., Guidi, S., Iori, A.P., Cerretti, R., Marengo, P., Pioltelli, P., Angelucci, E., Oneto, R., Ripamonti, F., Bernasconi, P., Bosi, A., Cazzola, M., et al (2014) Predictive factors for the outcome of allogeneic transplantation in patients with MDS stratified according to the revised IPSS-R. *Blood*, **123**, 2333–2342.
- Della Porta, M.G., Malcovati, L., Boveri, E., Travaglino, E., Pietra, D., Pascutto, C., Passamonti, F., Invernizzi, R., Castello, A., Magrini, U., Lazzarino, M. & Cazzola, M. (2009) Clinical relevance of bone marrow fibrosis and CD34-positive cell clusters in primary myelodysplastic syndromes. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **27**, 754–62.
- Della Porta, M.G., Malcovati, L., Strupp, C., Ambaglio, I., Kuendgen, A., Zipperer, E., Travaglino, E., Invernizzi, R., Pascutto, C., Lazzarino, M., Germing, U. & Cazzola, M. (2011) Risk stratification based on both disease status and extra-hematologic

- comorbidities in patients with myelodysplastic syndrome. *Haematologica*, **96**, 441–449.
- Della Porta, M.G., Tuechler, H., Malcovati, L., Schanz, J., Sanz, G., Garcia-Manero, G., Solé, F., Bennett, J.M., Bowen, D., Fenaux, P., Dreyfus, F., Kantarjian, H., Kuendgen, A., Levis, A., Cermak, J., Fonatsch, C., Le Beau, M.M., Slovak, M.L., Krieger, O., Luebbert, M., et al (2015) 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*, **29**, 1502–1513.
- Porwit, a, van de Loosdrecht, a a, Bettelheim, P., Brodersen, L.E., Burbury, K., Cremers, E., Della Porta, M.G., Ireland, R., Johansson, U., Matarraz, S., Ogata, K., Orfao, a, Preijers, F., Psarra, K., Subirá, D., Valent, P., van der Velden, V.H.J., Wells, D., Westers, T.M., Kern, W., et al (2014) 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*, 1793–1798.
- Pülhorn, H., Herrmann, M., Harms, H., Jung, A. & Baumann, I. (2012) Apoptotic cells and clonally expanded cytotoxic T cells in bone marrow trephines of patients with myelodysplastic syndrome. *Histopathology*, **61**, 200–11.
- Quesnel, B., Guillermin, G., Vereecque, R., Wattel, E., Preudhomme, C., Bauters, F., Vanrumbeke, M. & Fenaux, P. (1998) Methylation of the p15(INK4b) gene in myelodysplastic syndromes is frequent and acquired during disease progression. *Blood*, **91**, 2985–90.
- Ramos, F., Robledo, C., Izquierdo-García, F.M., Suárez-Vilela, D., Benito, R., Fuertes, M., Insunza, A., Barragán, E., Del Rey, M., García-Ruiz de Morales, J.M., Tormo, M., Salido, E., Zamora, L., Pedro, C., Sánchez-Del-Real, J., Díez-Campelo, M., Del Cañizo, C., Sanz, G.F., Hernández-Rivas, J.M. & Spanish Group for Myelodysplastic Syndromes (GESMD), S.G. for M. (2016) Bone marrow fibrosis in myelodysplastic syndromes: a prospective evaluation including mutational analysis. *Oncotarget*, **7**, 30492–503.
- Ramos, F., Robledo, C., Pereira, A., Pedro, C., Benito, R., de Paz, R., Del Rey, M., Insunza, A., Tormo, M., Díez-Campelo, M., Xicoy, B., Salido, E., Sánchez-Del-Real, J., Arenillas, L., Florensa, L., Luño, E., Del Cañizo, C., Sanz, G.F., María Hernández-Rivas, J. & Spanish Group for Myelodysplastic Syndromes (GESMD) (2017) 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. *American journal of hematology*, **92**, E534–E541.
- Raza, A. & Galili, N. (2012) The genetic basis of phenotypic heterogeneity in myelodysplastic syndromes. *Nature reviews. Cancer*, **12**, 849–59.
- Raza, A., Mundle, S., Iftikhar, A., Gregory, S., Marcus, B., Khan, Z., Alvi, S., Shetty, V.,

- Dameron, S. & Wright, V. (1995) 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. *American journal of hematology*, **48**, 143–54.
- Reitman, Z.J., Jin, G., Karoly, E.D., Spasojevic, I., Yang, J., Kinzler, K.W., He, Y., Bigner, D.D., Vogelstein, B. & Yan, H. (2011) Profiling the effects of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations on the cellular metabolome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 3270–5.
- Rheingold, J.J., Kaufman, R., Adelson, E. & Lear, A. (1963) Smoldering acute leukemia. *The New England journal of medicine*, **268**, 812–5.
- Rollison, D.E., Howlader, N., Smith, M.T., Strom, S.S., Merritt, W.D., Ries, L.A., Edwards, B.K. & List, A.F. (2008) Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001–2004, using data from the NAACCR and SEER programs. *Blood*, **112**, 45–52.
- Saarni, M.I. & Linman, J.W. (1973) Preleukemia. The hematologic syndrome preceding acute leukemia. *The American journal of medicine*, **55**, 38–48.
- Saber, W. & Horowitz, M.M. (2016) Transplantation for myelodysplastic syndromes: who, when, and which conditioning regimens. *Hematology*, **2016**, 478–484.
- Saft, L., Björklund, E., Berg, E., Hellström-Lindberg, E. & Porwit, A. (2013) Bone marrow dendritic cells are reduced in patients with high-risk myelodysplastic syndromes. *Leukemia research*, **37**, 266–73.
- Sallman, D.A., Komrokji, R., Cluzeau, T., Vaupel, C., Al Ali, N.H., Lancet, J., Hall, J., List, A., Padron, E. & Song, J. (2017) ASXL1 frameshift mutations drive inferior outcomes in CMML without negative impact in MDS. *Blood Cancer Journal*, **7**, 633.
- Sanger, F. & Coulson, A.R. (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of molecular biology*, **94**, 441–8.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **74**, 5463–7.
- Santos, F.P.S., Faderl, S., Garcia-Manero, G., Koller, C., Beran, M., O'Brien, S., Pierce, S., Freireich, E.J., Huang, X., Borthakur, G., Bueso-Ramos, C., de Lima, M., Keating, M., Cortes, J., Kantarjian, H. & Ravandi, F. (2009) Adult acute erythroleukemia: an analysis of 91 patients treated at a single institution. *Leukemia*, **23**, 2275–80.
- Sanz, G.F., Sanz, M.A., Vallespi, T., Cañizo, M.C., Torrabadella, M., García, S., Irrigui, D. & San Miguel, J.F. (1989) Two regression models and a scoring system for predicting survival and planning treatment in myelodysplastic syndromes: a multivariate analysis of prognostic factors in 370 patients. *Blood*, **74**, 395–408.
- Schanz, J., Steidl, C., Fonatsch, C., Pfeilstöcker, M., Nösslinger, T., Tuechler, H., Valent, P., Hildebrandt, B., Giagounidis, A., Aul, C., Lübbert, M., Stauder, R., Krieger, O.,

- Garcia-Manero, G., Kantarjian, H., Germing, U., Haase, D. & Estey, E. (2011) Coalesced multicentric analysis of 2,351 patients with myelodysplastic syndromes indicates an underestimation of poor-risk cytogenetics of myelodysplastic syndromes in the international prognostic scoring system. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **29**, 1963–70.
- Schanz, J., Tüchler, H., Solé, F., Mallo, M., Luño, E., Cervera, J., Granada, I., Hildebrandt, B., Slovak, M.L., Ohyashiki, K., Steidl, C., Fonatsch, C., Pfeilstöcker, M., Nösslinger, T., Valent, P., Giagounidis, A., Aul, C., Lübbert, M., Stauder, R., Krieger, O., et al (2012) New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **30**, 820–9.
- Schneider, R.K., Schenone, M., Ferreira, M.V., Kramann, R., Joyce, C.E., Hartigan, C., Beier, F., Brümmendorf, T.H., Germing, U., Platzbecker, U., Büsche, G., Knüchel, R., Chen, M.C., Waters, C.S., Chen, E., Chu, L.P., Novina, C.D., Lindsley, R.C., Carr, S.A. & Ebert, B.L. (2016) Rps14 haploinsufficiency causes a block in erythroid differentiation mediated by S100A8 and S100A9. *Nature Medicine*, **22**, 288–297.
- Schuler, E., Schroeder, M., Neukirchen, J., Strupp, C., Xicoy, B., Kündgen, A., Hildebrandt, B., Haas, R., Gattermann, N. & Germing, U. (2014) Refined medullary blast and white blood cell count based classification of chronic myelomonocytic leukemias. *Leukemia Research*, **38**, 1413–1419.
- Selimoglu-Buet, D., Wagner-Ballon, O., Saada, V., Bardet, V., Itzykson, R., Bencheikh, L., Morabito, M., Met, E., Debord, C., Benayoun, E., Nloga, A.-M., Fenaux, P., Braun, T., Willekens, C., Quesnel, B., Adès, L., Fontenay, M., Rameau, P., Droin, N., Koscielny, S., et al (2015) Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*, **125**, 3618–26.
- Shen, L., Kantarjian, H., Guo, Y., Lin, E., Shan, J., Huang, X., Berry, D., Ahmed, S., Zhu, W., Pierce, S., Kondo, Y., Oki, Y., Jelinek, J., Saba, H., Estey, E. & Issa, J.-P.J. (2010) DNA methylation predicts survival and response to therapy in patients with myelodysplastic syndromes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **28**, 605–13.
- Shimazaki, K., Ohshima, K., Suzumiya, J., Kawasaki, C. & Kikuchi, M. (2000) Evaluation of apoptosis as a prognostic factor in myelodysplastic syndromes. *British journal of haematology*, **110**, 584–90.
- Shirahata-Adachi, M., Iriyama, C., Tomita, A., Suzuki, Y., Shimada, K. & Kiyoi, H. (2017) Altered EZH2 splicing and expression is associated with impaired histone H3 lysine 27 tri-Methylation in myelodysplastic syndrome. *Leukemia Research*, **63**, 90–97.
- Shou, L.-H., Cao, D., Dong, X.-H., Fang, Q., Wu, Y., Zhang, Y., Fei, J.-P. & Xu, B.-L. (2017) Prognostic significance of SETBP1 mutations in myelodysplastic syndromes, chronic myelomonocytic leukemia, and chronic neutrophilic leukemia: A meta-analysis. *PLOS ONE*, **12**, e0171608.

- Smith, A.E., Mohamedali, A.M., Kulasekararaj, A., Lim, Z., Gäken, J., Lea, N.C., Przychodzen, B., Mian, S.A., Nasser, E.E., Shooter, C., Westwood, N.B., Strupp, C., Gattermann, N., Maciejewski, J.P., Germing, U. & Mufti, G.J. (2010) Next-generation sequencing of the TET2 gene in 355 MDS and CMML patients reveals low-abundance mutant clones with early origins, but indicates no definite prognostic value. *Blood*, **116**, 3923–32.
- Sojitra, P., Gandhi, P., Fitting, P., Kini, A.R., Alkan, S., Velankar, M.M. & Venkataraman, G. (2013) Chronic Myelomonocytic Leukemia Monocytes Uniformly Display a Population of Monocytes With CD11c Underexpression. *American Journal of Clinical Pathology*, **140**, 686–692.
- Solary, E. & Itzykson, R. (2017) How I treat chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*, **130**, 126–136.
- Solé, F., Luño, E., Sanzo, C., Espinet, B., Sanz, G.F., Cervera, J., Calasanz, M.J., Cigudosa, J.C., Millà, F., Ribera, J.M., Bureo, E., Marquez, M.L., Arranz, E. & Florensa, L. (2005) Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica*, **90**, 1168–78.
- van Spronsen, M.F., Ossenkoppele, G.J., Holman, R. & van de Loosdrecht, A.A. (2014) Improved risk stratification by the integration of the revised international prognostic scoring system with the myelodysplastic syndromes comorbidity index. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, **50**, 3198–205.
- Steensma, D.P. (2012) Historical perspectives on myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research*, **36**, 1441–1452.
- Steensma, D.P., Bejar, R., Jaiswal, S., Lindsley, R.C., Sekeres, M.A., Hasserjian, R.P. & Ebert, B.L. (2015) Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood*, **126**, 9–16.
- Strom, S.S., Gu, Y., Gruschkus, S.K., Pierce, S.A. & Estey, E.H. (2005) Risk factors of myelodysplastic syndromes: a case-control study. *Leukemia*, **19**, 1912–8.
- Such, E., Cervera, J., Costa, D., Sole, F., Vallespi, T., Luno, E., Collado, R., Calasanz, M.J., Hernandez-Rivas, J.M., Cigudosa, J.C., Nomdedeu, B., Mallo, M., Carbonell, F., Bueno, J., Ardanaz, M.T., Ramos, F., Tormo, M., Sancho-Tello, R., Canizo, C. d., Gomez, V., et al (2011) Cytogenetic risk stratification in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica*, **96**, 375–383.
- Such, E., Germing, U., Malcovati, L., Cervera, J., Kuendgen, A., Della Porta, M.G., Nomdedeu, B., Arenillas, L., Luño, E., Xicoy, B., Amigo, M.L., Valcarcel, D., Nachtkamp, K., Ambaglio, I., Hildebrandt, B., Lorenzo, I., Cazzola, M. & Sanz, G. (2013) Development and validation of a prognostic scoring system for patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*, **121**, 3005–15.
- Swerdlow, S.H., International Agency for Research on Cancer., World Health Organization., World Health Organization, International Agency for Research on

- Cancer, International Agency for Research on Cancer. & World Health Organization. (2008) WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues International Agency for Research on Cancer.
- Swerdlow, S.H., World Health Organization & International Agency for Research on Cancer (2017) WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues.
- Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., Pastor, W.A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L.M., Liu, D.R., Aravind, L. & Rao, A. (2009) Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science (New York, N.Y.)*, **324**, 930–5.
- Talati, C., Zhang, L., Shaheen, G., Kuykendall, A., Ball, M., Zhang, Q., Lancet, J.E., Zuckerman, K.S., List, A.F., Komrokji, R., Moscinski, L. & Padron, E. (2017) Monocyte subset analysis accurately distinguishes CMML from MDS and is associated with a favorable MDS prognosis. *Blood*, **129**, 1881–1883.
- Tang, G., Zhang, L., Fu, B., Hu, J., Lu, X., Hu, S., Patel, A., Goswami, M., Khoury, J.D., Garcia-Manero, G., Medeiros, L.J. & Wang, S.A. (2014) Cytogenetic risk stratification of 417 patients with chronic myelomonocytic leukemia from a single institution. *American Journal of Hematology*, **89**, 813–818.
- Tefferi, A., Shah, S., Mudireddy, M., Lasho, T.L., Barraco, D., Hanson, C.A., Ketterling, R.P., Elliott, M.A., Patnaik, M.S., Pardanani, A. & Gangat, N. (2017) Monocytosis is a powerful and independent predictor of inferior survival in primary myelofibrosis. *British journal of haematology*.
- Tefferi, A. & Vardiman, J.W. (2009) Myelodysplastic syndromes. *The New England journal of medicine*, **361**, 1872–85.
- Thorpe, M., Montalvão, A., Pierdomenico, F., Moita, F. & Almeida, A. (2012) Treatment of chronic myelomonocytic leukemia with 5-Azacitidine: a case series and literature review. *Leukemia research*, **36**, 1071–3.
- Thota, S., Viny, A.D., Makishima, H., Spitzer, B., Radivoyevitch, T., Przychodzen, B., Sekeres, M.A., Levine, R.L. & Maciejewski, J.P. (2014) Genetic alterations of the cohesin complex genes in myeloid malignancies. *Blood*, **124**, 1790–1798.
- Tien, H.-F., Tang, J.-L., Tsay, W., Liu, M.-C., Lee, F.-Y., Wang, C.-H., Chen, Y.-C. & Shen, M.-C. (2001) Methylation of the p15INK4B gene in myelodysplastic syndrome: it can be detected early at diagnosis or during disease progression and is highly associated with leukaemic transformation. *British Journal of Haematology*, **112**, 148–154.
- Toyama, K., Ohyashiki, K., Yoshida, Y., Abe, T., Asano, S., Hirai, H., Hirashima, K., Hotta, T., Kuramoto, A. & Kuriya, S. (1993) Clinical implications of chromosomal abnormalities in 401 patients with myelodysplastic syndromes: a multicentric study in Japan. *Leukemia*, **7**, 499–508.
- Tsimberidou, A.M., Estey, E., Wen, S., Pierce, S., Kantarjian, H., Albitar, M. & Kurzrock,

- R. (2008) The prognostic significance of cytokine levels in newly diagnosed acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndromes. *Cancer*, **113**, 1605–1613.
- Tuzuner, N., Cox, C., Rowe, J.M., Watrous, D. & Bennett, J.M. (1995) Hypocellular myelodysplastic syndromes (MDS): new proposals. *British journal of haematology*, **91**, 612–7.
- Uni, M., Masamoto, Y., Sato, T., Kamikubo, Y., Arai, S., Hara, E. & Kurokawa, M. (2018) Modeling ASXL1 mutation revealed impaired hematopoiesis caused by derepression of p16Ink4a through aberrant PRC1-mediated histone modification. *Leukemia*.
- Valcárcel, D., Sanz, G., Ortega, M., Nomdedeu, B., Luño, E., Díez-Campelo, M., Ardanaz, M.T., Pedro, C., Montoro, J., Collado, R., Andreu, R., Marco, V., Cedená, M.T., de Paz, R., Tormo, M., Xicoy, B., Ramos, F., Bargay, J., Gonzalez, B., Brunet, S., et al (2015) Use of newer prognostic indices for patients with myelodysplastic syndromes in the low and intermediate-1 risk categories: a population-based study. *The Lancet. Haematology*, **2**, e260-6.
- Valent, P. (2018) ICUS, IDUS, CHIP and CCUS: Diagnostic Criteria, Separation from MDS and Clinical Implications. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*, 1–9.
- Valent, P., Horny, H.-P., Bennett, J.M., Fonatsch, C., Germing, U., Greenberg, P., Haferlach, T., Haase, D., Kolb, H.-J., Krieger, O., Loken, M., van de Loosdrecht, A., Ogata, K., Orfao, A., Pfeilstöcker, M., Rüter, B., Sperr, W.R., Stauder, R. & Wells, D.A. (2007) Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leukemia research*, **31**, 727–36.
- Valent, P. & Horny, H.-P.P. (2009) Minimal diagnostic criteria for myelodysplastic syndromes and separation from ICUS and IDUS: Update and open questions. *European Journal of Clinical Investigation*, **39**, 548–553.
- Valent, P., Jäger, E., Mitterbauer-Hohendanner, G., Müllauer, L., Schwarzing, I., Sperr, W.R., Thalhammer, R. & Wimazal, F. (2011) Idiopathic bone marrow dysplasia of unknown significance (IDUS): definition, pathogenesis, follow up, and prognosis. *American journal of cancer research*, **1**, 531–41.
- Valinluck, V. & Sowers, L.C. (2007) Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer research*, **67**, 946–50.
- Vallespi, T., Imbert, M., Mecucci, C., Preudhomme, C. & Fenaux, P. (1998) Diagnosis, classification, and cytogenetics of myelodysplastic syndromes. *Haematologica*, **83**, 258–75.
- Verburgh, E., Achten, R., Louw, V.J., Brusselmans, C., Delforge, M., Boogaerts, M., Hagemeijer, A., Vandenberghe, P. & Verhoef, G. (2007) 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**, 668–77.
- Voso, M.T., Fenu, S., Latagliata, R., Buccisano, F., Piciocchi, A., Aloe-Spiriti, M.A., Breccia, M., Criscuolo, M., Andriani, A., Mancini, S., Niscola, P., Naso, V., Nobile, C., Piccioni, A.L., D'Andrea, M., D'Addosio, A., Leone, G. & Venditti, A. (2013) 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. *Journal of Clinical Oncology*, **31**, 2671–2677.
- Voulgarelis, M., Giannouli, S., Ritis, K. & Tzioufas, A.G. (2004) Myelodysplasia-associated autoimmunity: clinical and pathophysiologic concepts. *European journal of clinical investigation*, **34**, 690–700.
- Walter, M.J., Ding, L., Shen, D., Shao, J., Grillot, M., McLellan, M., Fulton, R., Schmidt, H., Kalicki-Veizer, J., O'Laughlin, M., Kandoth, C., Baty, J., Westervelt, P., DiPersio, J.F., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Ley, T.J. & Graubert, T.A. (2011) Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, **25**, 1153–8.
- Wang, H., Zhang, T.-T., Jin, S., Liu, H., Zhang, X., Ruan, C.-G., Wu, D.-P., Han, Y. & Wang, X.-Q. (2017) Pyrosequencing quantified methylation level of miR-124 predicts shorter survival for patients with myelodysplastic syndrome. *Clinical Epigenetics*, **9**, 91.
- Wang, S.A. & Hasserjian, R.P. (2012) Erythroid proliferations in myeloid neoplasms. *Human pathology*, **43**, 153–64.
- Wang, S.A., Patel, K.P., Pozdnyakova, O., Peng, J., Zuo, Z., Cin, P.D., Steensma, D.P. & Hasserjian, R.P. (2016) Acute erythroid leukemia with <20% bone marrow blasts is clinically and biologically similar to myelodysplastic syndrome with excess blasts. *Modern Pathology*, **29**, 1221–1231.
- Wang, S.A., Tang, G., Fadare, O., Hao, S., Raza, A., Woda, B.A. & Hasserjian, R.P. (2008) Erythroid-predominant myelodysplastic syndromes: enumeration of blasts from nonerythroid rather than total marrow cells provides superior risk stratification. *Modern Pathology*, **21**, 1394–1402.
- Ward, P.S., Patel, J., Wise, D.R., Abdel-Wahab, O., Bennett, B.D., Collier, H.A., Cross, J.R., Fantin, V.R., Hedvat, C. V., Perl, A.E., Rabinowitz, J.D., Carroll, M., Su, S.M., Sharp, K.A., Levine, R.L. & Thompson, C.B. (2010) The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer cell*, **17**, 225–34.
- Wassie, E.A., Itzykson, R., Lasho, T.L., Kosmider, O., Finke, C.M., Hanson, C.A., Ketterling, R.P., Solary, E., Tefferi, A. & Patnaik, M.M. (2014) Molecular and prognostic correlates of cytogenetic abnormalities in chronic myelomonocytic

- leukemia: a Mayo Clinic-French Consortium Study. *American Journal of Hematology*, **89**, 1111–1115.
- Westers, T.M., Cremers, E.M.P., Oelschlaegel, U., Johansson, U., Bettelheim, P., Matarraz, S., Orfao, A., Moshaver, B., Brodersen, L.E., Loken, M.R., Wells, D.A., Subirá, D., Cullen, M., Te Marvelde, J.G., van der Velden, V.H.J., Preijers, F.W.M.B., Chu, S.-C., Feuillard, J., Guérin, E., Psarra, K., et al (2017) Immunophenotypic analysis of erythroid dysplasia in myelodysplastic syndromes. A report from the IMDSFlow working group. *Haematologica*, **102**, 308–319.
- Westers, T.M., Ireland, R., Kern, W., Alhan, C., Balleisen, J.S., Bettelheim, P., Burbury, K., Cullen, M., Cutler, J.A., Della Porta, M.G., Dräger, A.M., Feuillard, J., Font, P., Germing, U., Haase, D., Johansson, U., Kordasti, S., Loken, M.R., Malcovati, L., te Marvelde, J.G., et al (2012) Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: a report from an international consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leukemia*, **26**, 1730–1741.
- White, A.D., Culligan, D.J., Hoy, T.G. & Jacobs, A. (1992) Extended cytogenetic follow-up of patients with myelodysplastic syndrome (MDS). *British journal of haematology*, **81**, 499–502.
- White, A.D., Hoy, T.G. & Jacobs, A. (1994) Extended Cytogenetic Follow-up and Clinical Progress in Patients with Myelodysplastic Syndromes (MDS). *Leukemia & Lymphoma*, **12**, 401–412.
- Wijermans, P.W., Rüter, B., Baer, M.R., Slack, J.L., Saba, H.I. & Lübbert, M. (2008) Efficacy of decitabine in the treatment of patients with chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Leukemia Research*, **32**, 587–591.
- de Witte, T., Bowen, D., Robin, M., Malcovati, L., Niederwieser, D., Yakoub-Agha, I., Mufti, G.J., Fenaux, P., Sanz, G., Martino, R., Alessandrino, E.P., Onida, F., Symeonidis, A., Passweg, J., Kobbe, G., Ganser, A., Platzbecker, U., Finke, J., van Gelder, M., van de Loosdrecht, A.A., et al (2017) Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for MDS and CMML: recommendations from an international expert panel. *Blood*, **129**, 1753–1762.
- De Wolf-Peeters, C., Stessens, R., Desmet, V., Tricot, G. & Verwilghen, R.L. (1986) The histological characterization of ALIP in the myelodysplastic syndromes. *Pathology, research and practice*, **181**, 402–7.
- Woll, P.S., Kjällquist, U., Chowdhury, O., Doolittle, H., Wedge, D.C., Thongjuea, S., Erlandsson, R., Ngara, M., Anderson, K., Deng, Q., Mead, A.J., Stenson, L., Giustacchini, A., Duarte, S., Giannoulatou, E., Taylor, S., Karimi, M., Scharenberg, C., Mortera-Blanco, T., Macaulay, I.C., et al (2014) Myelodysplastic syndromes are propagated by rare and distinct human cancer stem cells in vivo. *Cancer Cell*, **25**, 794–808.
- Wong, E. & Juneja, S. (2015) Acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndromes with 50% or greater erythroblasts: a diagnostic conundrum. *Pathology*, **47**, 289–93.

- Wong, T.N., Ramsingh, G., Young, A.L., Miller, C.A., Touma, W., Welch, J.S., Lamprecht, T.L., Shen, D., Hundal, J., Fulton, R.S., Heath, S., Baty, J.D., Klco, J.M., Ding, L., Mardis, E.R., Westervelt, P., DiPersio, J.F., Walter, M.J., Graubert, T.A., Ley, T.J., et al (2015) Role of TP53 mutations in the origin and evolution of therapy-related acute myeloid leukaemia. *Nature*, **518**, 552–555.
- Worsley, A., Oscier, D.G., Stevens, J., Darlow, S., Figes, A., Mufti, G.J. & Hamblin, T.J. (1988) Prognostic features of chronic myelomonocytic leukaemia: a modified Bournemouth score gives the best prediction of survival. *British journal of haematology*, **68**, 17–21.
- Wu, D.-H., Yao, D.-M., Yang, L., Ma, J.-C., Wen, X.-M., Yang, J., Guo, H., Li, X.-X., Qian, W., Lin, J. & Qian, J. (2017) Hypomethylation of let-7a-3 is associated with poor prognosis in myelodysplastic syndrome. *Leukemia & Lymphoma*, **58**, 96–103.
- Wu, S.-J., Yao, M., Chou, W.-C., Tang, J.-L., Chen, C.-Y., Ko, B.-S., Huang, S.-Y., Tsay, W., Chen, Y.-C., Shen, M.-C., Wang, C.-H., Yeh, Y.-C. & Tien, H.-F. (2006) Clinical implications of SOCS1 methylation in myelodysplastic syndrome. *British Journal of Haematology*, **135**, 317–323.
- Xie, M., Lu, C., Wang, J., McLellan, M.D., Johnson, K.J., Wendl, M.C., McMichael, J.F., Schmidt, H.K., Yellapantula, V., Miller, C.A., Ozenberger, B.A., Welch, J.S., Link, D.C., Walter, M.J., Mardis, E.R., DiPersio, J.F., Chen, F., Wilson, R.K., Ley, T.J. & Ding, L. (2014) Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nature medicine*, **20**, 1472–8.
- Xiong, B., Nie, Y., Tang, Z., Xue, M. & Zuo, X. (2017) Prognostic evaluation of ALIP and CD34 immunostaining in IPSS-R subgroups of myelodysplastic syndromes. *Pathology*, **49**, 526–533.
- Xu, F., Wu, L.-Y., He, Q., Wu, D., Zhang, Z., Song, L.-X., Zhao, Y.-S., Su, J.-Y., Zhou, L.-Y., Guo, J., Chang, C.-K. & Li, X. (2017) Exploration of the role of gene mutations in myelodysplastic syndromes through a sequencing design involving a small number of target genes. *Scientific reports*, **7**, 43113.
- Xu, W., Yang, H., Liu, Y., Yang, Y., Wang, P., Kim, S.-H., Ito, S., Yang, C., Wang, P., Xiao, M.-T., Liu, L., Jiang, W., Liu, J., Zhang, J., Wang, B., Frye, S., Zhang, Y., Xu, Y., Lei, Q., Guan, K.-L., et al (2011) Oncometabolite 2-Hydroxyglutarate Is a Competitive Inhibitor of α -Ketoglutarate-Dependent Dioxygenases. *Cancer Cell*, **19**, 17–30.
- Xu, Y., McKenna, R.W., Karandikar, N.J., Pildain, A.J. & Kroft, S.H. (2005) Flow cytometric analysis of monocytes as a tool for distinguishing chronic myelomonocytic leukemia from reactive monocytosis. *American journal of clinical pathology*, **124**, 799–806.
- Yamazaki, J., Taby, R., Vasanthakumar, A., Macrae, T., Ostler, K.R., Shen, L., Kantarjian, H.M., Estecio, M.R., Jelinek, J., Godley, L.A. & Issa, J.-P.J. (2012) Effects of TET2 mutations on DNA methylation in chronic myelomonocytic leukemia. *Epigenetics*, **7**, 201–7.

- Yazji, S., Giles, F.J., Tsimberidou, A.-M., Estey, E.H., Kantarjian, H.M., O'Brien, S.A. & Kurzrock, R. (2003) Antithymocyte globulin (ATG)-based therapy in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, **17**, 2101–6.
- Yoshizato, T., Dumitriu, B., Hosokawa, K., Makishima, H., Yoshida, K., Townsley, D., Sato-Otsubo, A., Sato, Y., Liu, D., Suzuki, H., Wu, C.O., Shiraishi, Y., Clemente, M.J., Kataoka, K., Shiozawa, Y., Okuno, Y., Chiba, K., Tanaka, H., Nagata, Y., Katagiri, T., et al (2015) Somatic Mutations and Clonal Hematopoiesis in Aplastic Anemia. *New England Journal of Medicine*, **373**, 35–47.
- Young, A.L., Challen, G.A., Birmann, B.M. & Druley, T.E. (2016) Clonal haematopoiesis harbouring AML-associated mutations is ubiquitous in healthy adults. *Nature communications*, **7**, 12484.
- Young, A.L., Wong, T.N., Hughes, A.E.O., Heath, S.E., Ley, T.J., Link, D.C. & Druley, T.E. (2015) Quantifying ultra-rare pre-leukemic clones via targeted error-corrected sequencing. *Leukemia*, **29**, 1608–11.
- Yu, Y., Zhang, T., Wang, Q., Wu, D., Pan, J., Liang, J., Chen, S. & Sun, A. (2017) Counting bone marrow blasts as a percentage of nonerythroid cells improves the prognostic evaluation of MDS with erythroid predominance. *American Journal of Hematology*, **92**, E55–E57.
- Zeidan, A.M., Al Ali, N., Barnard, J., Padron, E., Lancet, J.E., Sekeres, M.A., Steensma, D.P., DeZern, A., Roboz, G., Jabbour, E., Garcia-Manero, G., List, A. & Komrokji, R. (2017) 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*, **31**, 1391–1397.
- Zhang, H., Zhang, X., Clark, E., Mulcahey, M., Huang, S. & Shi, Y.G. (2010) TET1 is a DNA-binding protein that modulates DNA methylation and gene transcription via hydroxylation of 5-methylcytosine. *Cell Research*, **20**, 1390–1393.
- Zhang, T., Zhou, J., Yang, D., Wang, Y., Yao, D., Ma, J., Wen, X., Guo, H., Lin, J. & Qian, J. (2016) Hypermethylation of DLX4 predicts poor clinical outcome in patients with myelodysplastic syndrome. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, **54**, 865–71.
- Zhao, X., Yang, F., Li, S., Liu, M., Ying, S., Jia, X. & Wang, X. (2014) CpG island methylator phenotype of myelodysplastic syndrome identified through genome-wide profiling of DNA methylation and gene expression. *British Journal of Haematology*, **165**, 649–658.
- Zipperer, E., Tanha, N., Strupp, C., Kündgen, A., Nachtkamp, K., Neukirchen, J., Hildebrandt, B., Haas, R., Gattermann, N. & Germing, U. (2014) The myelodysplastic syndrome-comorbidity index provides additional prognostic information on patients stratified according to the revised international prognostic scoring system. *Haematologica*, **99**, e31-2.

Zuo, Z., Medeiros, L.J., Chen, Z., Liu, D., Bueso-Ramos, C.E., Luthra, R., Wang, S.A. & A.Wang, S. (2012) Acute myeloid leukemia (AML) with erythroid predominance exhibits clinical and molecular characteristics that differ from other types of AML. *PLoS ONE*, **7**, e41485.

VII. ANNEX

Altres treballs publicats pel doctorand com a primer autor sobre la temàtica de la tesi no inclosos en aquesta:

Nomdedeu M^{*}, **Calvo X**^{*}, Pereira A, Carrió A, Solé F, Luño E, Cervera J, Vallespi T, Muñoz C, Gómez C, Arias A, Such E, Sanz G, Grau J, Insunza A, Calasanz MJ, Ardanaz MT, Hernández-Rivas JM, Azaceta G, Álvarez S, Sánchez J, Martín ML, Bargay J, Gómez V, Cervero CJ, Allegue MJ, Collado R, Campo E, Esteve J, Nomdedeu B, Costa D; Spanish Group of Myelodysplastic Syndromes. 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 Apr;55(4):322-7. Factor d'impacte: 3,362.

*Igual contribució com a primers autors

Arenillas L^{*}, **Calvo X**^{*}, Sanz GF, Florensa L. Reply to M.A. Lichtman. J Clin Oncol. 2017 Apr 20;35(12):1376-1377. Factor d'impacte: 26,303.

*Igual contribució com a primers autors

Calvo X, Florensa L, Arenillas L. Is there a pressing need for improving prognostication strategies in therapy-related myelodysplastic syndromes? Leukemia. 2017 Jul 31: 2538-2539. Factor d'impacte: 10,023.

Calvo X, Florensa L, Arenillas L. (In)convenience of adding age and comorbidities to prognostic models in myelodysplastic syndromes. Leukemia. 2018 May;32(5):1264-1266. Factor d'impacte: 10,023.

Prognostic Impact of Chromosomal Translocations in Myelodysplastic Syndromes and Chronic Myelomonocytic Leukemia Patients. A Study by the Spanish Group of Myelodysplastic Syndromes

Meritxell Nomdedeu,^{1,2*} Xavier Calvo,³ Arturo Pereira,¹ Anna Carrió,¹ Francesc Solé,^{4,8} Elisa Luño,⁵ José Cervera,⁶ Teresa Vallespi,⁷ Concha Muñoz,¹ Cándida Gómez,¹ Amparo Arias,¹ Esperanza Such,⁶ Guillermo Sanz,⁶ Javier Grau,⁸ Andrés Insunza,⁹ María-José Calasanz,¹⁰ María-Teresa Ardanaz,¹¹ Jesús-María Hernández-Rivas,^{12,13} Gemma Azaceta,¹⁴ Sara Álvarez,¹⁵ Joaquín Sánchez,^{16,17} María-Luisa Martín,¹⁸ Joan Bargay,¹⁹ Valle Gómez,²⁰ Carlos-Javier Cervero,²¹ María-José Allegue,²² Rosa Collado,²³ Elías Campo,¹ Jordi Esteve,¹ Benet Nomdedeu,¹ Dolors Costa,¹ on behalf of the Spanish Group of Myelodysplastic Syndromes

¹Hospital Clínic, Barcelona, Spain

²Fundació Clínic per la Recerca Biomèdica, Barcelona, Spain

³Hospital del Mar, IMIM (Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques), Barcelona, Spain

⁴Josep Carreras Leukemia Research Institute, Campus ICO, Badalona, Spain

⁵Hospital Central Universitario de Asturias, Oviedo, Spain

⁶Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain

⁷Hospital Vall d'Hebrón, Barcelona, Spain

⁸ICO - Hospital Germans Trias i Pujol, UAB, Badalona, Spain

⁹Hospital Marqués de Valdecilla, Santander, Spain

¹⁰Universidad de Navarra, Pamplona, Spain

¹¹Hospital Txagorritxu, Vitoria, Spain

¹²Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain

¹³IBSAL, University of Salamanca, Salamanca, Spain

¹⁴Hospital Clínico Universitario de Zaragoza, Zaragoza, Spain

¹⁵Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid, Spain

¹⁶Hospital Reina Sofía, Córdoba, Spain

¹⁷IMIBIC, University of Córdoba, Córdoba, Spain

¹⁸Hospital Doce de Octubre, Madrid, Spain

¹⁹Hospital Son Llàtzer, Mallorca, Spain

²⁰Hospital Universitario de La Princesa, Madrid, Spain

²¹Hospital Virgen de la Luz, Cuenca, Spain

²²Complejo Hospitalario de Pontevedra, Pontevedra, Spain

²³Hospital General Universitario de Valencia, Valencia, Spain

Chromosomal translocations are rare in the myelodysplastic syndromes (MDS) and chronic myelomonocytic leukemia (CMML). With the exception of t(3q), translocations are not explicitly considered in the cytogenetic classification of the IPSS-R and their impact on disease progression and patient survival is unknown. The present study was aimed at determining the prognostic impact of translocations in the context of the cytogenetic classification of the IPSS-R. We evaluated 1,653 patients from the Spanish Registry of MDS diagnosed with MDS or CMML and an abnormal karyotype by conventional cytogenetic analysis. Translocations were identified in 168 patients (T group). Compared with the 1,485 patients with abnormal karyotype without translocations (non-T group), the T group had a larger proportion of patients with refractory anemia with excess of blasts and higher scores in both the cytogenetic and global IPSS-R. Translocations were

Supported by: Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, Spain, Grant numbers: PI 11/02010 and PI/14/00013; Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC, FEDER), Grant number: RD12/0036/0044; Sociedad Española Hematología y Hemoterapia; 2014 SGR225 (GRE) Generalitat de Catalunya, by José Carreras Leukämie-tiftung, Ref. AR 14/34; Fundació Internacional Josep Carreras Spain; Catalonia Spain; "la Caixa" Foundation

Meritxell Nomdedeu and Xavier Calvo contributed equally to this work.

*Correspondence to: Meritxell Nomdedeu, Hospital Clínic Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. E-mail: mnomde@clinic.ub.es

Received 27 July 2015; Revised 28 October 2015; Accepted 29 October 2015

DOI 10.1002/gcc.22333

Published online 22 December 2015 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

associated with a significantly shorter survival and higher incidence of transformation into AML at univariate analysis but both features disappeared after multivariate adjustment for the IPSS-R cytogenetic category. Patients with single or double translocations other than t(3q) had an outcome similar to those in the non-T group in the intermediate cytogenetic risk category of the IPSS-R. In conclusion, the presence of translocations identifies a subgroup of MDS/CMML patients with a more aggressive clinical presentation that can be explained by a higher incidence of complex karyotypes. Single or double translocations other than t(3q) should be explicitly considered into the intermediate risk category of cytogenetic IPSS-R classification. © 2015 Wiley Periodicals, Inc.

INTRODUCTION

Myelodysplastic syndromes (MDS) are clonal hematopoietic disorders characterized by peripheral cytopenias and an increased risk of leukemic transformation (Tefferi and Vardiman, 2009). Acquired cytogenetic anomalies are well established as independent prognostic factors in MDS, both for shorter survival and leukemic transformation (Morel et al., 1993; Schanz et al., 2012). Chromosomal abnormalities are detected in half of de novo MDS, with losses and gains of genetic material being the most frequent abnormalities. Recurrent chromosomal translocations are rare in MDS. This is in contrast to acute myeloid leukemia (AML), where translocations are assumed to play an essential role in leukemogenesis by activating oncogenes (Haase, 2008). The most accepted prognostic classification for MDS is the International Prognostic Scoring System (IPSS) (Greenberg et al., 1997). Three cytogenetic prognostic subgroups, good, intermediate, and poor, are considered in this score, which allows classification of 86% of the chromosomal abnormalities found in MDS. More recently, Schanz et al. (2012) proposed a new cytogenetic scoring system comprised of five prognostic subgroups (very good, good, intermediate, poor, and very poor), which allows classification of 91% of cytogenetic abnormalities. This new cytogenetic classification was included in the revised IPSS-R for MDS (Greenberg et al., 2012). Single or double translocations other than t(3q) are not considered in the cytogenetic IPSS-R classification, so they are included by default into the intermediate risk category under the epigraph "any other single or double independent clones." However, only a few specific translocations have been investigated for prognostic significance (Dvorak et al., 2014; Ai et al., 2015).

The aims of this study were: (1) to analyze the prognostic impact of translocations in the context of the IPSS-R cytogenetic classification, (2) to test whether single or double translocation other than t(3q) are correctly classified into the intermediate cytogenetic risk group, and (3) to compare the prognosis of complex karyotypes including translo-

cations versus complex karyotypes without translocations.

MATERIALS AND METHODS

In December 2014, 7,802 patients with MDS or CMML were included in the Spanish Registry of Myelodysplastic Syndromes. This is a retrospective registry that includes cases from 105 participating Spanish centers. The karyotype was evaluable in 5,001 patients (64% of the whole series) and was normal in 3,077 (62%). Chromosomal abnormalities were found in 1,924 (39%) patients and in 1,653 of these complete follow-up data allowed the analysis of survival, leukemic transformation, and prognostic factors. A total of 168 translocations were included in this series; the details of these were described elsewhere (Costa et al., 2013). The study was approved by the Ethics Committee of our hospital and conducted in accordance to the modified Declaration of Helsinki (World Medical Association, 2013).

Conventional Cytogenetic Studies

Cytogenetic studies were carried out on G-banded chromosomes obtained from 24-hr unstimulated bone marrow cultures. When possible, at least 20 metaphases per sample were analyzed. Karyotypes were described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (Schaffer et al., 2013). A complex karyotype (CK) was defined as the presence of at least three chromosomal abnormalities. The number of cytogenetic aberrations was defined according to the criteria of Chun et al. (2010).

Statistical Methods

The main study outcomes were survival from diagnosis and transformation into AML. Survival curves were drawn using the Kaplan-Meier method and statistically compared by the log-rank test. The Cox regression model was used for the multivariate adjustment of factors predicting survival. The proportional hazards assumption was tested in each Cox model, both graphically and by

the Grambsch-Therneau test (Grambsch and Therneau, 1994). The effect of chromosomal translocations on the cumulative incidence of AML was estimated by taking non AML-related death as a competing risk, and further adjusted for other predictive factors by means of the Fine and Gray regression method (Fine and Gray, 1999). Continuous data were summarized as median and interquartile range (IQR) and statistically compared by the Mann-Whitney U-test. Categorical data were represented as proportions and compared by the chi-square test. All the statistical analysis was performed using the Stata, version 11, software (www.stata.org). Curves representing progression to AML and the competing risk of dying without leukemic progression were drawn using the Stata routines developed by Boggess and Coviello (2004).

RESULTS

Patients

Chromosomal translocations were identified in 168 patients (T group). As compared with the 1,485 patients with abnormal karyotype without translocation (non-T group), patients in the T group were younger, had lower hemoglobin, neutrophil and platelet levels in peripheral blood, and a higher percentage of bone marrow blasts (Table 1). The T group included a significantly larger proportion of patients with refractory anemia with excess of blasts as well as higher scores in both the cytogenetic and the global IPSS-R. While cytogenetic information was available for all the patients, IPSS-R global score could be calculated in 154 patients in the T group, and in 1,352 patients in the non-T group due to the lack of some variables. Fifty three per cent of patients in the T group had a complex karyotype versus 16.7% in the non-T group. The raw number of chromosomal alterations was higher in the T group compared with the non-T group (Table 1).

Impact of Chromosomal Translocations on Patient Outcome

Overall survival

After a follow-up of 3,845 patient-years, 905 (55%) patients had died and the median actuarial survival was 2.6 years (95% C.I., 2.4–2.9). The cytogenetic classification of the IPSS-R had a prognostic impact in terms of overall survival with a median of 6.14 years (95% CI, 4.66–6.86), 5.05 years (95% CI, 4.32–5.72), 2.37 years (95% CI, 1.93–2.66), 1.29 years (95% CI, 1.04–1.74), and

0.69 years (95% CI, 0.60–0.79) for the very good, good, intermediate, poor, and very poor categories, respectively ($P < 0.001$).

Median survival for the T group was significantly shorter compared with the non-T group (1.0 years [95% CI, 0.8–1.2] versus 2.9 years [95% CI, 2.6–3.3]), respectively ($P < 0.001$; Fig. 1A). When adjusted for the IPSS-R cytogenetic category, no significant difference between the two groups was found (1.2 years [95% CI, 0.95–1.4] versus 1.6 years [95% CI, 1.5–1.7]) ($P = 0.2$; Fig. 1B).

When we analyzed the prognostic impact of translocations within the intermediate cytogenetic risk category, no effect on survival was observed. Median survival was 1.8 years for the T group [95% CI, 1.1–3.4] versus 2.4 years for the non-T group [95% CI, 2.0–2.8] ($P = 0.49$). Furthermore, presence of translocations had no predictive value for survival within the poor and very poor IPSS-R groups (median: 0.8 years [95% CI, 0.6–0.9] for the T group versus 1.0 years for the non-T group [95% CI, 0.8–1.2]) ($P = 0.055$).

Evolution to AML

After a median follow-up of 1.5 years (IQR: 0.8–2.8) from the diagnosis of MDS, 343 (21%) patients had progressed to AML, 605 had died without AML, and 705 were censored alive without having progressed to AML. Presence of chromosomal translocations was associated with an increased incidence of AML at univariate analysis (subhazard ratio (SHR): 1.5, 95% CI: 1.1–2.1; $P = 0.008$; Fig. 2A). However, this association disappeared after multivariate adjustment for the IPSS-R cytogenetic risk category (SHR: 0.95, 95% CI: 0.68–1.35; $P = 0.78$; Fig. 2B). The presence of chromosomal translocation had no effect on the cumulative incidence of AML transformation, neither in the intermediate IPSS-R cytogenetic risk category (SHR: 0.8, 95% CI: 0.4–1.4; $P = 0.5$) nor in the poor and very-poor risk categories (SHR: 1.1, 95% CI: 0.7–1.6; $P = 0.8$).

The univariate association of chromosomal translocation with either shorter survival or increased risk for leukemic transformation persisted after excluding from the analysis the 14 patients with translocations involving chromosome 3q arm who had no other poor prognosis karyotypic signature (data not shown).

DISCUSSION

The Cytogenetic Scoring System for primary MDS proposed by Schanz et al. (2012) included a

TABLE I. Basal Characteristics of MDS and CMML Patients Harboring Abnormal Karyotypes

	At least one translocation (T Group; n = 168)	No translocation (non-T Group; n = 1,485)	P
Gender M/F, n (%)	103/65 (61.3/38.7)	827/658 (55.7/44.3)	nss ^a
Age (median, IQR)	69 (56–77)	73 (64–79)	<0.0001 ^b
Absolute neutrophil count ($\times 10^9/L$) (median, IQR)	1.65 (0.78–2.99)	1.96 (1.04–3.58)	0.048 ^b
Hemoglobin (g/L) (median, IQR)	9 (7.9–10.4)	9.6 (8.2–11)	0.012 ^b
Platelets ($\times 10^{12}/L$) (median, IQR)	92 (49–175)	139 (69–252)	<0.0001 ^b
BM blasts (%) (median, IQR)	7 (2–12)	4 (1–9)	<0.0001 ^b
Diagnosis (WHO 2008), n (%)			<0.0001 ^a
RCUD	9 (5.4)	92 (6.2)	
RA-RS	10 (6)	106 (7.1)	
RCMD	30 (17.9)	374 (25.1)	
RAEB-1	35 (20.8)	238 (16)	
RAEB-2	49 (29.1)	292 (19.7)	
MDS-NOS	17 (10.1)	29 (1.9)	
CMML-1	12 (7.1)	124 (8.4)	
CMML-2	5 (3)	24 (1.6)	
Other MDS/NPM	1 (0.6)	16 (1.2)	
5q minus Sd.	–	190 (12.8)	
Karyotype complexity, n (%)			<0.0001 ^a
A	58 (34.5)	1,085 (73.1)	
A + A	21 (12.5)	152 (10.2)	
CK	89 (53)	248 (16.7)	
Number of chromosomal abnormalities (#) (median, IQR)	2.6 (1.2–5.6)	1.31 (–1.9)	<0.0001 ^b
IPSS-R risk category, n (%)			<0.0001 ^a
Very Good	0 (0)	180 (13.3)	
Good	25 (16.2)	387 (28.6)	
Intermediate	16 (10.4)	214 (15.8)	
Poor	26 (16.9)	274 (20.3)	
Very Poor	87 (56.5)	297 (22)	
IPSS-R cytogenetic score, n (%)			<0.0001 ^a
Very Good	0 (0)	181 (12.2)	
Good	10 (6)	455 (30.6)	
Intermediate	56 (33.3)	492 (33.1)	
Poor	32 (19)	194 (13.1)	
Very Poor	70 (41.7)	163 (11)	

Abbreviations: MDS, myelodysplastic syndrome; CMML, chronic myelomonocytic leukemia; SD, standard deviation; RCUD, refractory cytopenia with unilineage dysplasia; RA-RS, refractory anemia with ring sideroblasts; RCMD, refractory cytopenia with multilineage dysplasia; RAEB, refractory anemia with excess blasts; MDS-NOS, myelodysplastic syndrome no other specified; A = single abnormality; A + A = double abnormality; CK = complex karyotype.

^aP-values were calculated using Pearson Chi-Square test.

^bP-values were calculated using Kruskal Wallis test.

wide range of frequent cytogenetic aberrations allowing classification of 91% of patients. Chromosomal translocations are not frequent in MDS. The only translocation individually considered in the IPSS-R cytogenetic classification is t(3q), included in the poor risk cytogenetic group. The prognostic significance of other translocations has not been established. In our study, the presence of translocations clearly identified a subgroup of MDS patients with a more aggressive clinical presentation and higher scores in the IPSS-R cytogenetic risk category, as also shown in a recent study (Ai et al., 2015). More than 50% of the patients

with translocations had a complex karyotype and a median of 2.6 chromosomal alterations, while in the non-T group the percentage of cases with complex karyotype was 16% and the median number of chromosomal alterations 1.3. This is in contrast to AML, where balanced translocations are common as sole abnormalities (Döhner et al., 2010). When a raw analysis of the prognostic impact of translocations was made, its presence was associated with significantly shorter survival and increased risk of AML. However, translocations lost their prognostic impact after adjustment for the IPSS-R cytogenetic category. Similarly,

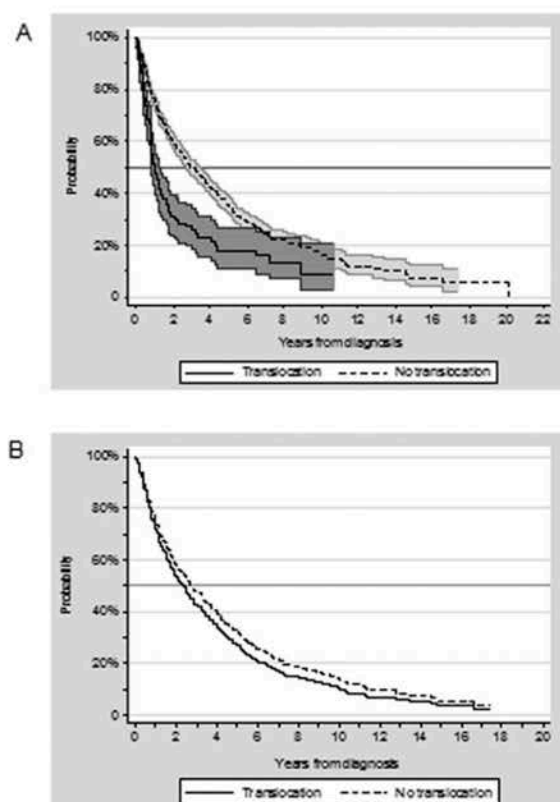


Figure 1. Projected survival according to the presence of at least one translocation ($n = 168$) compared with the absence of translocations ($n = 1,485$), unadjusted for other covariate (A; $P < 0.001$) or adjusted for the IPSS-R cytogenetic risk category (B; $P = 0.2$).

translocations did not show any prognostic impact within the intermediate cytogenetic risk group or in the poor and very poor cytogenetic risk categories. Moreover, we were able to demonstrate that the unadjusted poor prognosis associated with translocations was not mediated by having included those involving 3q. Taken together, all these results suggest that translocations are a surrogate marker for other poor prognosis cytogenetic aberrations instead of being causally related to the poor outcome. Their strong association with complex karyotypes and higher number of chromosomal alterations might be the expression of an inherent chromosomal instability that facilitates disease progression. Indeed, it is well known that both complex karyotypes and high number of chromosomal alterations confer an adverse prognosis (Morel et al., 1993; Greenberg et al., 1997; Schanz et al., 2012; Kelaidi et al., 2014).

A proper prognostic stratification in MDS is essential for designing risk-adapted therapeutic strategies that can range from watchful waiting to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.

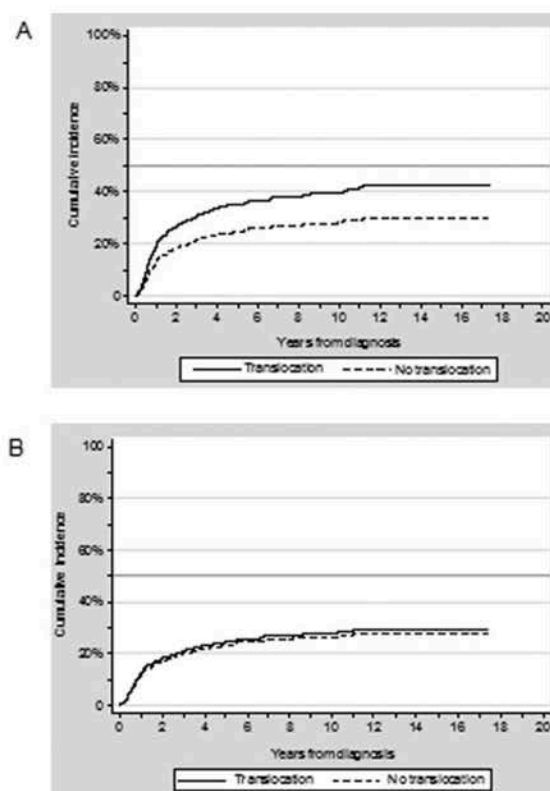


Figure 2. Cumulative incidence of leukemic transformation according to the presence of at least one translocation ($n = 168$) as compared with the absence of translocations ($n = 1,485$), unadjusted for other covariates (A; $P = 0.008$) or adjusted for the IPSS-R cytogenetic risk category (B; $P = 0.8$).

Following the current IPSS-R cytogenetic classification, single or double translocations other than t(3q) must be ascribed to the intermediate risk category under the epigraph “any other single or double cytogenetic aberrations,” although the prognostic impact of this subgroup of patients was not specifically studied (Schanz et al., 2012). Our study shows that the outcome of patients with single or double translocations other than t(3q) is comparable to that of patients without translocations also classified into the intermediate risk category, reinforcing the validity of the IPSS-R for the risk stratification of this population.

In conclusion, chromosomal translocations identify a subgroup of MDS/CMML patients with a more aggressive disease due to a higher incidence of complex karyotypes. Our results support the current recommendation of classifying single or double translocations other than t(3q) in the intermediate cytogenetic risk category of the IPSS-R. Explicitly mentioning these in the intermediate cytogenetic category could be of interest to clarify the prognostic stratification of this subset of

patients, helping clinicians in the risk-adapted therapeutic decisions.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Luis Benlloch for his assistance in the data management, and Ruth M Risueño for her critical review of the manuscript. They thank all physicians for providing and caring for patients as well as collecting data.

REFERENCES

- Ai J, Visconte V, Tabarrok A, Hasrouni E, Hamilton BK, Mukherjee S, Kalaycio M, Sobczek R, Advani AS, Sekeres MA, Shetty S, Tiu SV. 2015. Non-t(6;9) and Non-Inv(3) balanced chromosomal rearrangements are associated with poor survival outcomes in myelodysplastic syndromes. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 15:489–495.
- Boggess M, Coviello V. 2004. Cumulative incidence estimation in the presence of competing risks. *Stata* 4:101–103.
- Chun K, Hagemeijer A, Iqbal A, Slovak ML. 2010. Implementation of standardized international karyotype scoring practices is needed to provide uniform and systematic evaluation for patients with myelodysplastic syndrome using IPSS criteria: An international Working Group on MDS Cytogenetics Study. *Leuk Res* 34:160–165.
- Costa D, Muñoz C, Carrió A, Nomdedeu M, Calvo X, Solé F, Luño E, Cervera J, Vallespi T, Berneaga D, Gómez C, Arias A, Such E, Sanz G, Grau J, Insunza A, Calasanz MJ, Ardanaz MT, Hernandez JM, Azaceta G, Álvarez S, Sánchez J, Martín ML, Bargay J, Gómez V, Cervero CJ, Allegue MJ, Collado R, Campo E, Nomdedeu B. 2013. Reciprocal translocations in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemias: Review of 5,654 patients with an evaluable karyotype. *Genes Chromosomes Cancer* 52:753–763.
- Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larson RA, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz MA, Sierra J, Tallman MS, Löwenberg B, Bloomfield CD. 2010. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: Recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 115:453–474.
- Dvorak P, Lysak D, Vokurka S, Michalova K, Sarova I, Jonasova A, Hruha M, Rykowska A, Subrt I. 2014. The translocation t(2;11)(p21;q23) without MLL gene rearrangement—a possible marker of good prognosis in myelodysplastic syndrome patients. *Hematol Oncol* 32:82–86.
- Fine J, Gray R. 1999. A proportional hazards model for the subdistribution of a competing risk. *J Am Stat Assoc* 94:496–509.
- Grambsch PM, Therneau TM. 1994. Proportional hazards tests and diagnostics based on weighted residuals. *Biometrika* 81:515–526.
- Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D, Ohgashiki K, Toyama K, Aul C, Mufti G, Bennet 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, Kuendgen A, Levis A, Malcovati L, Cazzola M, Cermak J, Fonatsch C, Le Beau MM, Slovak ML, Krieger O, Luebbert M, Maciejewski J, Magalhães SM, Miyazaki Y, Pfeilstöcker M, Sekeres MM, Sperr WR, Stauder R, Tauro S, 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. 2008. Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol* 87:515–526.
- Kelaidi C, Tzannou I, Baltadakis I, Batsis I, Mallouri D, Spyridonidis A, Gigantes S, Tsirogitis P, Apostolidis I, Athanasiadou A, Manola K, Anagnostopoulos A, Harhalakis N, Sakellari I, Karakasis D. 2014. Specific abnormalities versus number of abnormalities and cytogenetic scoring systems for outcome prediction after allogeneic hematopoietic SCT for myelodysplastic syndromes. *Bone Marrow Transplant* 49:1022–1028.
- Morel P, Hebbbar M, Lai JL, Duhamel A, Preudhomme C, Wattel E, Bauters F, Fenaux P. 1993. Cytogenetic analysis has strong independent prognostic value in de novo myelodysplastic syndromes and can be incorporated in a new scoring system: A report on 408 cases. *Leukemia* 7:1315–1323.
- Schaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M, editors. 2013. *ISCN 2013. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature* 2013. Basel, Switzerland: Karger.
- Schanz J, Tuechler H, Solé F, Mallo M, Luño E, Cervera J, Granada I, Hildebrandt B, Slovak ML, Ohgashiki K, Steidl C, Fonatsch C, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Valent P, Giagounidis A, Aul C, Lübbert M, Stauder R, Krieger O, Garcia-Manero G, Faderl S, Perce S, LeBeau MM, Bennet JM, Greenberg P, Germing U, Haase D. 2012. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol* 30:820–829.
- Tefferi A, Vardiman JW. 2009. Myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* 361:1872–1885.
- World Medical Association. 2013. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects. *J Am Med Assoc* 310:2191–2194.

Reply to M.A. Lichtman

Lichtman¹ provides valuable comments regarding our recent paper² 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.³⁻⁷ After reading the correspondence by Lichtman,¹ 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 article⁸ in which we exposed some concerns about the disappearance of erythroleukemia (erythroid/myeloid), as recently proposed by the WHO committee on myeloid neoplasms.⁹ 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,^{8,10} 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.

REFERENCES

1. Lichtman MA: Clonal cytopenias and oligoblastic myelogenous leukemia (myelodysplasia) have neoplastic, not hyperplastic, erythropoiesis. *J Clin Oncol* 35:1376, 2017
2. 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
3. Wong E, Juneja S: Acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndromes with 50% or greater erythroblasts: A diagnostic conundrum. *Pathology* 47:289-293, 2015
4. 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
5. 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
6. 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
7. 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
8. 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
9. 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
10. 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 on January 30, 2017.

Correspondence

AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Reply to M.A. Lichtman

The following represents disclosure information provided by authors of this manuscript. All relationships are considered compensated. Relationships are self-held unless noted. I = Immediate Family Member, Inst = My Institution. Relationships may not relate to the subject matter of this manuscript. For more information about ASCO's conflict of interest policy, please refer to www.asco.org/rwc or ascopubs.org/jco/site/ifc.

Leonor Arenillas

No relationship to disclose

Xavier Calvo

No relationship to disclose

Guillermo F. Sanz

No relationship to disclose

Lourdes Florensa

No relationship to disclose

CORRESPONDENCE

Is there a pressing need for improving prognostication strategies in therapy-related myelodysplastic syndromes?

Leukemia (2017) 31, 2538–2539; doi:10.1038/leu.2017.237

We read with interest the paper from Zeidan *et al.*,¹ who assess the prognostic utility of classical risk stratification tools in patients with therapy-related myelodysplastic syndromes (t-MDS).

The 2008 WHO category of therapy-related myeloid neoplasms (t-MN) includes therapy-related acute myeloid leukemias (t-AML), t-MDS and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms (t-MDS/MPN) occurring as late complications of chemotherapy and/or radiotherapy administered for a prior neoplastic or non-neoplastic disorder.² Few reports have suggested that neither the WHO subclassification of MDS nor the blast percentage permitted to stratify patients based on their clinical outcomes. Likewise, no differences in outcome were observed between t-MDS and t-AML.³ Based on these data, t-MDS, t-MDS/MPN and t-AML were considered together as a unique clinical syndrome. By contrast, recent data reveal that patients with t-MDS may be stratified in different prognostic subgroups, some of them presenting an indolent course.^{1,4} Moreover, sporadic cases diagnosed with t-MDS would really be *de novo* MDS. In this line, Nardi *et al.* showed that MDS occurring after external-beam radiation presented no differences in outcome or in the presence of high-risk karyotypes when compared with *de novo* MDS, suggesting that post-radiation MDS might not represent a direct consequence of this exposure.⁵

Patients with t-MDS have significantly shorter survival than *de novo* MDS, but this could be explained, at least in part, by a higher prevalence of poor risk cytogenetics and a higher frequency of patients diagnosed within the categories with excess blasts.^{1,4} As shown by Ok *et al.*⁴ and Zeidan *et al.*,¹ the use of the classical MDS prognostic indexes (International Prognostic Scoring System, Revised International Prognostic Scoring System, WHO classification-based Prognostic Scoring System, MD Anderson Global Prognostic System) as well as t-MDS-specific scores⁶ provides an adequate prognostic assessment in t-MDS. All the evaluated scores discriminated survival in t-MDS; nevertheless, median survival for t-MDS patients was shorter than for *de novo* MDS within all risk categories in every prognostic model assessed.^{1,4}

Determining the causes of death attributable to disease evolution in MDS, especially in elderly lower-risk patients, is not an easy task. The scenario is even worse in t-MDS, since these patients display more pronounced comorbidities due to the prior cancer therapy received and, sometimes, the primary neoplasia remains active at the time of t-MDS diagnosis. For these reasons, the projected survival of these patients may be clouded by multiple reasons unrelated to MDS. This background noise does not permit to draw firm conclusions about the accuracy of MDS prognostic scores based on an unadjusted survival comparison between t-MDS and *de novo* MDS. C-index for right censored survival data has been the most commonly used method for assessing the survival predictive power of MDS prognostic scores. The more closely the cause of death is related to the evolution of the disease, the more accurate are this type of methods to select the prognostic score with the greater survival predictive capacity.

Therefore, results derived from this kind of methods should be interpreted with caution in this subset of patients.

In our view, the inferior survival observed in patients with t-MDS when compared to their *de novo* counterparts for every risk category in the different prognostic indexes could mainly obey two assumptions: (a) t-MDS present a higher incidence of severe comorbidities that shortens their survival, and/or (b) t-MDS display a higher molecular complexity and, therefore, this is not detectable by current prognostic scores that are based on cytogenetics and clinical variables. Which is the correct assumption? Probably the two hypotheses are correct and play a role in determining the outcome of patients with t-MDS. Exploring these matters is essential to establish if there is a pressing need for improving prognostication strategies in t-MDS. Recent data have evidenced that t-MDS show a higher prevalence of *TP53* mutations than *de novo* MDS, but these mutations were almost invariably restricted to patients with complex karyotypes.⁷ Although *TP53* mutations predicted for worse outcomes even in patients with complex karyotypes,⁸ we should know if *de novo* MDS patients with complex karyotypes, especially those with more than three chromosomal abnormalities, show a significantly inferior rate of *TP53* mutations than their t-MDS counterparts. Exploring this open issue might help to decipher whether we could improve the prognostication of t-MDS beyond we could do in their *de novo* counterparts by adding molecular information to current prognostic scores. As a surrogate measure of higher molecular complexity, we should assess for every risk category in the different stratification tools, especially in the lower-risk ones, if t-MDS had a comparatively higher cumulative incidence of AML than *de novo* MDS. Although the AML transformation is an outcome restricted to a limited number of patients, this is the only one closely linked with disease evolution. To explore appropriately this issue, the cumulative incidence of AML should be estimated by taking non AML-related death as a competing risk, in order to avoid an AML evolution underestimation in t-MDS due to their shorter survival probably influenced by a higher incidence of marked comorbidities. A comparison of the cumulative incidence of AML should be done in every risk category of every score between t-MDS and *de novo* MDS. If this was not possible due to the low number of patients presenting this outcome in the lower-risk categories, at least it should be explored by splitting the series into lower- and higher-risk groups. If a higher incidence of AML evolution were detected in t-MDS, it could be inferred that classical prognostic models are not adequate to detect their higher molecular complexity and, hence, the addition of molecular information would be mandatory. By contrast, if differences were not detected, a higher effort to introduce the state of primary disease and comorbidities should probably be done to improve the prognostic accuracy of current prognostic scores. In the meantime, a comparison of the different prognostic scores using C-statistics for detecting the score with the best prediction capability in terms of time to AML would be of great interest. We encourage the different cooperative groups with information on large series of patients with t-MDS to perform this kind of analysis, while we do not dispose of large series with molecular data.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

X Calvo, L Florensa and L Arenillas

Laboratorio de Citología Hematológica, Servicio de Patología,
GRETNHE, IMIM Hospital del Mar Research Institute, Barcelona, Spain
E-mail: xcalvo@parcdesalutmar.cat

REFERENCES

- 1 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**: 1391–1397.
- 2 Brunning RD, Orazi A, Germing U, Le Beau MM, Porwitt A, Baumann J et al. Myelodysplastic syndromes. In: Swerdlow S, Campos E, Lee Harris N, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al. (eds). *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC Press, World Health Organization: Lyon, France, 2008, pp 87–107.
- 3 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**: 197–205.
- 4 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**: 185–189.
- 5 Nardi V, Winkfield KM, Ok CY, Niemierko A, Kluk MJ, Attar EC et al. Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes after radiation therapy are similar to de novo disease and differ from other therapy-related myeloid neoplasms. *J Clin Oncol* 2012; **30**: 2340–2347.
- 6 Quintás-Cardama A, Daver N, Kim H, Dinardo C, Jabbour E, Kadia T et al. A prognostic model of therapy-related myelodysplastic syndrome for predicting survival and transformation to acute myeloid leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2014; **14**: 401–410.
- 7 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.
- 8 Bejar R, Papaemmanuil E, Haferlach T, Garcia-Manero G, Maciejewski JP, Sekeres M et al. TP53 mutation status divides MDS patients with complex karyotypes into distinct prognostic risk groups: analysis of combined datasets from the International Working Group for MDS-molecular prognostic committee. *Blood* 2014; **124**: 532.

Therapy-related myelodysplastic syndromes-specific risk stratification: are we putting the cart before the horse?

Leukemia (2017) **31**, 2539–2541; doi:10.1038/leu.2017.238

In their letter, Calvo et al.¹ raise the important question of whether therapy-related (t-)myelodysplastic syndromes (MDS) merit a risk stratification tool distinct from the tools typically used for prognostication in *de novo* (d-)MDS, such as the International Prognostic Scoring System (IPSS)² and its revised version (IPSS-R).³ This is a clinically relevant question given the common perception that patients with t-myeloid neoplasms (t-MN) have high-risk disease regardless of how they would score on the IPSS or IPSS-R, and therefore warrant aggressive therapy, such as allogeneic hematopoietic cell transplantation (alloHCT), when medically feasible.⁴ Earlier reports, limited by small numbers of patients, supported this concept by dismissing the value of previously established prognostic factors, such as the proportion of bone marrow blasts,⁵ leading the World Health Organization (WHO) to include both t-MDS and t-acute myeloid leukemia (t-AML) under the same entity of t-MN regardless of the blast percentage.⁶ However, subsequent reports with larger sample sizes, including our study, documented a substantial inter-patient variability in outcomes among patients with t-MDS and validated the prognostic influence of several clinicopathological variables used in conventional MDS risk stratification tools, such as cytogenetics, blood counts, bone marrow blast proportion and transfusion dependency.^{7–9} Collectively, these reports suggest that risk stratification remains important in individualized clinical decision making for patients with t-MDS, just as for patients with d-MDS.

Since the importance of risk stratification has been confirmed in patients with t-MDS, research efforts have turned to developing a practical tool that accurately predicts outcomes for these patients. One approach was to examine how prognostic tools already in clinical use for d-MDS perform among patients with t-MDS. We and others demonstrated that the IPSS, IPSS-R, WHO classification-

based Prognostic Scoring System (WPSS)¹⁰ and the MD Anderson Prognostic Scoring System (MDAS)¹¹ all retained prognostic ability by separating patients with t-MDS into different risk groups with distinct median survivals.^{7–9} While survival of patients with t-MDS as a group was, as expected, significantly inferior to that of patients with d-MDS (median, 19 vs 46 months, respectively, $P=0.005$), within each risk group the survival of patients with t-MDS was lower than that of d-MDS patients regardless of which prognostic tool was used.⁷ This observation suggested that other factors not captured by the variables used in the existing risk tools, such as co-morbid conditions or molecular genetic changes, might have an important influence on survival. However, we were unable to demonstrate that co-morbidities accounted for the worse survival of patients with t-MDS compared with those with d-MDS. Similarly, the survival of patients with t-MDS who underwent alloHCT was not worse than for their d-MDS counterparts with similar prognostic scores, suggesting that inferior outcomes post alloHCT did not account for the inferior survival of patients with t-MDS compared with d-MDS in similar risk groups.⁷

MD Anderson investigators then designed a risk stratification tool specific for patients with t-MDS, the t-MDS Prognostic Scoring System (TPSS), using a 281-patient single-center cohort.⁸ While our results validated the prognostic value of this tool, it has not performed significantly better in patients with t-MDS than the tools that were designed for d-MDS. In fact, using the Akaike Information Criteria (AIC), a measure of the goodness of fit of a model, the IPSS-R performed as well and the MPSS performed better than the TPSS in our larger patient cohort.⁷ These findings suggest either that there is no need to develop a t-MDS-specific prognostic tool, or that new variables, such as molecular genetic markers, and not just rebalancing of the currently used clinicopathological variables are needed to develop a t-MDS-specific tool that can outperform d-MDS tools for risk stratification among t-MDS patients.

CORRESPONDENCE

Myelodysplastic syndrome



(In)convenience of adding age and comorbidities to prognostic models in myelodysplastic syndromes

Xavier Calvo¹ · Lourdes Florensa¹ · Leonor Arenillas¹

Received: 12 December 2017 / Revised: 18 January 2018 / Accepted: 23 January 2018 / Published online: 22 February 2018
 © Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature 2018

We read with interest the letter from Nazha et al. [1] who assess the prognostic adequacy of adding molecular data along with age to current prognostic models in myelodysplastic syndromes (MDS). By applying this approach, a slight to moderate enhancement in the survival predictive power of the assessed scores was observed, nevertheless, no improvement was seen in the prediction of acute myeloid leukemia (AML) evolution.

The development of strategies to improve prognostic assessment of patients with MDS is crucial to refine the detection of lower-risk and higher-risk patients. This distinction is essential since the choice of treatment is risk-adapted with current therapeutic strategies ranging from watchful waiting to allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT). In the last years, several scores composed by “disease-related” and “patient-related” variables (e.g., age, comorbidities, performance status, frailty) have been developed [1–4] but there are some concerns about their suitability for determining which patients should be selected for receiving disease-modifying treatments.

Age and comorbidities have been shown as adverse independent prognostic factors for survival in several studies, nevertheless these have not displayed any influence in predicting AML evolution in MDS [1–4].

Determining the causes of death attributable to disease evolution in MDS is not an easy task. Elderly patients with MDS usually present a high incidence of comorbidities and, hence, their survival may be clouded by multiple reasons unrelated to MDS. C-statistics for right censored survival data have been the most commonly

used methods for assessing the survival predictive accuracy of MDS prognostic scores. The more closely the cause of death is related to the evolution of the disease, the more accurate are this type of methods to select the prognostic score with the greater survival predictive power. Therefore, results derived from this kind of methods should be interpreted with caution in the context of MDS. In this sense, although AML evolution is an outcome restricted to a limited number of patients, this is the only one closely linked with disease evolution. Therefore, improvements in the accuracy of survival prediction should preferably be accompanied by improvements in the prediction of AML evolution when new prognostic scores are implemented.

The inclusion of age and comorbidities to classical “disease-specific” MDS prognostic scores [5–7] has improved their accuracy in terms of survival prediction, but this has not enhanced their capability in predicting AML evolution [4]. Therefore, although valuable in refining the prediction of mortality, including “patient-related” factors may add an undesirable “background noise” for predicting the survival specifically related to disease evolution.

Recent data question the functional distinction between “patient-” and “disease-related” prognostic factors. As shown by Jaiswal et al., carriers of clonal hematopoiesis of indeterminate potential presented nearly a doubling in the risk of coronary heart disease than noncarriers [8]. This finding poses a link between comorbidities and molecular complexity of MDS and leads us to infer that comorbidities could be partially included into the framework of the different “disease-specific” risk factors (e.g., cytopenias, specific cytogenetic abnormalities, percentage of bone marrow blasts, somatic mutations). In this context, as recently published by Brunner et al., MDS patients were more likely to die of cardiovascular causes than the age-adjusted and sex-adjusted general population [9]. Moreover, the interrelation of “disease-” and “patient-specific” variables may modulate the influence of the former in predicting survival. For instance, this is evident that the survival predictive

✉ Xavier Calvo
xcalvo@parcdesalutmar.cat

¹ Laboratorio de Citología Hematológica, Servicio de Patología, GRETNHE, IMIM Hospital del Mar Research Institute, Barcelona, Spain

power of anemia would be different depending on the type and severity of patient comorbidities (e.g., congestive heart failure, chronic obstructive pulmonary disease). Therefore, the precise detection of comorbidities may be of crucial importance to better understand non-leukemic causes of death, especially in lower-risk MDS patients; however, there is a paucity of specific and effective treatments for improving cytopenias in this group of patients. In spite of this, recognizing modifiable “patient-related” variables, such as cardiovascular risk factors, may improve the survival of this patient population by early interventions to reduce the risk factors for coronary disease. Finally, in the same line, age-related clonal hematopoiesis [8] permits to establish a pathogenic link among age, molecular complexity, and the fact that MDS is primarily a disease of the elderly.

Therefore, although the clinical and biological overlap between “disease-” and “patient-related” factors seems apparent, in our opinion, the absence of impact of age and comorbidities in predicting the risk of AML evolution makes preferable not to include these into “disease-specific” MDS prognostic scores since their influence in the elusive pure MDS-related mortality is likely to be low.

Hence, it is important to focus on what we are wondering when we have a patient in consultation recently diagnosed with MDS. If we wonder how long our patient will survive, then we should account for age and comorbidities, by contrary, if we are trying to precisely detect patients with higher-risk disease, we should avoid these items, since, as previously commented, these would act as confounder variables. The incorporation of “patient-specific” variables into “disease-specific” MDS prognostic scores may overestimate disease risk by erroneously considering biologically lower-risk patients as higher-risk ones. This may induce to treat lower-risk patients with unnecessary aggressive approaches. Otherwise, applying age-adjustment strategies may underestimate disease risk in younger patients. For instance, by applying the age-adjusted IPSS-R by using the formula: $(\text{years} - 70) \times [0.05 - (\text{IPSS-R risk score} \times 0.005)]^6$, a 50-year-old patient with an IPSS-R risk score of 5 (high risk) may be erroneously underscored to an intermediate risk category (score of 4.5).

In our view, MDS prognostic scores should serve as tuned tools to detect higher-risk patients that would benefit from therapeutic strategies focused on alter the natural course of the disease by prolonging survival (i.e., hypomethylating agents, AML-like induction chemotherapy, allo-SCT). Probably, the best prognostication strategy in patients with MDS would be a two-step risk stratification approach. First step should be aimed to accurately establish “disease-specific” risk in order to detect higher-risk patients that would benefit from

strategies focused on prolonging their survival, independently of age, and comorbidities. Second step should focus on “patient-specific” variables, mainly age and comorbidities. At this point, any of the comorbidity indexes specifically validated in MDS patients [10] may serve for tutoring the best therapeutic strategy to follow. In this context, depending on their age and comorbidities, higher-risk MDS patients may be considered to receive from best supportive care to allo-SCT. For all the above, putting together “disease-specific” and “patient-specific” variables in a single-MDS prognostic score may not be a proper prognostication strategy, since the survival prediction power per se should not be the main goal when designing new MDS prognostic models. Future directions in MDS prognostic assessment should go toward the implementation of personalized prediction models based on genomic and clinical data. In this sense, Nazha et al. have recently presented a personalized (precision) model using machine learning algorithms that demonstrated greater predictive power for both survival and AML evolution than the most widely used MDS prognostic models[11].

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Nazha A, Al-Issa K, Hamilton BK, Radivoyevitch T, Gerds AT, Mukherjee S, et al. Adding molecular data to prognostic models can improve predictive power in treated patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2017;31:2848–50.
2. 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;113:1351–61.
3. 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;22:538–43.
4. Naqvi K, Garcia-Manero G, Sardesai S, Oh J, Vigil CE, Pierce S, et al. Association of comorbidities with overall survival in myelodysplastic syndrome: development of a prognostic model. *J Clin Oncol*. 2011;29:2240–6.
5. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997;89:2079–88.
6. 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;120:2454–65.
7. Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, Della Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, et al. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2007;25:3503–10.
8. Jaiswal S, Natarajan P, Silver AJ, Gibson CJ, Bick AG, Shvartz E, et al. Clonal hematopoiesis and risk of atherosclerotic cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 2017;377:111–21.

9. Brunner AM, Blonquist TM, Hobbs GS, Amrein PC, Neuberg DS, Steensma DP, et al. Risk and timing of cardiovascular death among patients with myelodysplastic syndromes. *Blood Adv.* 2017;1:2032–40.
10. 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;96:441–9.
11. Nazha A, Komrokji RS, Barnard J, Al-Issa K, Padron E, Madanat YF, et al. A personalized prediction model to risk stratify patients with myelodysplastic syndromes (MDS). *Blood.* 2017;130:160.

