

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

HEMATOLOGIA

TESIS DOCTORAL



**LENALIDOMIDA Y ESTROMA EN PACIENTES
DIAGNOSTICADOS DE SÍNDROME
MIELODISPLÁSICO CON DELECCIÓN AISLADA
DEL BRAZO LARGO DEL CROMOSOMA 5.**

SILVIA MARGARITA ROJAS PORRAS

2013

AGRADECIMIENTOS

Este apartado del trabajo de tesis es sin duda el que más emociones me ha hecho sentir, me ha hecho reflexionar sobre los años que llevo en este país, de las experiencias vividas y de la suerte de haber podido llegar a Salamanca, a este servicio de tan altas calidades y haber aprendido de todos y cada uno de sus integrantes de esta unidad científica, técnica y asistencial, parte fundamental del Hospital Clínico de Salamanca. Es imposible agradecer a cada uno por separado, aunque estaría encantada de hacerlo, pero con estas palabras les expreso desde mi corazón lo contenta y satisfecha que me siento al haber podido adquirir conocimientos en esta importante área de la salud.

A Dios, Ser Supremo y Guía, que me ha colmado de vida y salud para alcanzar esta meta, la que debo poner al servicio de la humanidad.

A la Dra. M^a Consuelo del Cañizo, mi tutora y directora, por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo de Tesis, por tanta paciencia, por corregir mis errores y fallos, a través de sus enseñanzas y firme orientación, por ser un ejemplo en todos los aspectos en el Servicio de Hematología.

A la Dra. María Diez Campelo, mi codirectora, porque me acogió desde el primer año de residencia, me motivó, me incentivó positivamente y me corrigió cuando fue necesario; me enseñó a organizar mi trabajo, a mejorar y a apreciar mucho más los Síndromes Mielodisplásicos.

A la Dra. Sandra Muntión, mi codirectora, porque me enseñó y explicó el trabajo del laboratorio, me introdujo en el mundo de las células Mesenquimales, gracias por su tiempo y su apoyo académico y emocional durante todo este proceso.

Al Profesor, Doctor Jesús F. San Miguel, por su ejemplo, constancia, sacrificio y persistencia para esculpir en mi mente que trabajar siempre en pro de la salud de los pacientes es mi razón de ser médico.

A todas la personas del laboratorio de terapia celular: Terecita Ramos “Tipi”, Belén B, Carmen H, Rebeca, Conchi, Silvia, Luis, por dejarme invadir un espacio de ese lugar, resolviendo muchas de mis dudas, aconsejándome, y compartiendo las horas de la comida y sobre todo por su amistad, eso no hay con qué pagarlo.

A los Dres. Belén Vidriales, Ramón García Sanz, Mercedes Corral, , María Victoria Mateos, Ignacio Alberca, José Ramón, María Jesús Nieto, Olga López Villar, Lucía López Corral, , Dolores Caballero, Alejandro Martín, Norma Gutiérrez, Noemí Puig, Jesús M^a Hernández Rivas, Fermín Sánchez-Guijo, Lourdes Vázquez, Marcos González, Enrique Ocio, y Elena Sebastián, muchas gracias por haberme tratado con aprecio y familiaridad, por su paciencia, consejos, enseñanzas, ayudas, y gran ejemplo en mi vida y en mi formación en Hematología, compartiendo de manera desinteresada sus experiencias y profesionalismo.

A mis compañeros de residencia y a mis amigos ajenos al servicio: gracias por todo, espero seguir conservando su amistad desde el otro continente.

A todo el personal de apoyo del Servicio de Hematología: Secretarias (os), data managers, enfermeras (os), técnicos, auxiliares y celadores de la 4^a planta, banco de

sangre, sala blanca, hospital de día y de los laboratorios en los que he tenido la oportunidad de estar, porque siempre me sentí como en familia.

A toda mi familia: abuelita, tíos, tías, primos y primas que son la motivación para seguir adelante, pero especialmente a: Guillermo, no tengo palabras ni gestos para agradecerle su apoyo incondicional, paciencia y ayuda desinteresada; a mis padres, que sin su ejemplo y exigencia en mí educación nunca hubiera podido lograr este objetivo; a mis hermanas porque ellas son el pilar de muchas cosas que espero seguir construyendo; a Raquel y Bernarda que por suerte de la vida han entrado a formar parte de mi familia.

Muchas Gracias.

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico.

AEE: agentes estimulantes de la eritropoyesis.

ANGPT-1: angiopoyetina 1.

AR: anemia refractaria.

AREB: anemia refractaria con exceso de blastos.

AREB-1: anemia refractaria con exceso de blastos tipo 1.

AREB-2: anemia refractaria con exceso de blastos tipo 2.

AREB-T: anemia refractaria con exceso de blastos en transformación.

ARS: anemia refractaria con sideroblastos.

ARSA: anemia refractaria con sideroblastos en anillo.

BFU-E: unidad formadora de brote eritroide.

CFU-GM: unidad formadora de colonias granulomonocíticas.

CMF: citometría de flujo.

CMN: células mononucleadas.

Cols: colaboradores.

CPH: célula progenitora hematopoyética.

CRDM: citopenia refractaria con displasia multilineal.

CRDU: citopenia refractaria con displasia unilineal.

CXCR-4: receptor 4 de quimiocina.

DICER: Dicer 1, ribonucleasa de Tipo II.

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium.

DMSO: Dimetil sulfóxido.

DROSHA: Drosha, ribonucleasa de Tipo III.

DT: Dependencia transfusional.

FAB: Franco-Americano-Británica.

FDA: Food Drugs Administration.

FITC: Fluoresceína-5-isotiocianato.

Fig: figura.

g/ dL: gramos por decilitro.

Hb: hemoglobina.

HLA: antígeno leucocitario humano.

HRP: Peroxidasa de rábano picante.

HSC: célula madre hematopoyética.

IPA: Ingenuity Pathways Analysis.

IPSS: sistema de índice pronóstico internacional.

IPSS-R: sistema de índice pronóstico internacional revisado.

ISCT: Sociedad Internacional de Terapia Celular.

IWG: International Working Group.

LMA: Leucemia mieloblástica aguda.

LMA-s: Leucemia mieloblástica aguda secundaria.

LMMC: Leucemia mielomonocítica crónica.

MD: Mielodisplásica.

MP: Mieloproliferativa.

MO: Médula ósea.

MSC: células Stem Mesenquimales.

MYB: v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian).

NAACCR: North American Association of Central Cancer Registries.

NK: Célula Natural Killer.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida.

PDE1A: Aroenate dihidratase.

PE: Ficoeritrina.

PBS: Tampón fosfato salino.

PerCP: proteína peridín clorofila.

PVDF: Polivinildenedifloride.

RCD: Región comúnmente delecionada.

SDS: Dodecil sulfato sódico.

RESMD: Registro Español de Síndromes Mielodisplásicos.

RMA: Robust Multichip Average.

RPS: ribosomal protein.

RQ-PCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en Tiempo Real.

SAM: significant analysis of microarrays.

SBDS: Shwachman-Bodian-Diamond syndrome.

SBD: Síndrome de Blackfan Diamond.

SBF: Suero bovino fetal.

SDF1: Factor derivado del estroma 1.

SEER: programa de vigilancia y epidemiología.

SLT: supervivencia libre de transfusiones.

SG: supervivencia global.

SMD: síndrome mielodisplásico.

SP: sangre periférica.

VCAM-1: molécula de adhesión a célula vascular.

INDICE

1. INTRODUCCION	1
1.1 Síndrome Mielodisplásico	1
1.2 Epidemiología	2
1.3 Etiología	2
1.4 Fisiopatología	3
1.4.1 Incremento de la apoptosis	3
1.4.2 Alteración de la respuesta inmune	3
1.4.3 Alteraciones genéticas y moleculares	4
1.5 Presentación clínica de los SMD	6
1.6 Clasificación y sistemas pronósticos	7
1.7 Otros factores pronósticos	11
1.8 Células estromales mesenquimales	12
1.8.1 Células estromales Mesenquimales en los SMD	13
1.9 Síndrome mielodisplásico con delección 5q	14
1.9.1 Región “crítica” o comúnmente delecionada (RCD)	15
1.9.2 Patogénesis y bases celulares del síndrome 5q-	16
1.9.3 Los micro-RNAs y su implicación en los SMD 5q-	17
1.9.4 El estroma de la médula ósea en los SMD 5q-	18
1.9.5 Tratamiento del síndrome 5q-	19
1.9.6 Mecanismo de acción de la Lenalidomida	20
2. HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	23

3. MATERIAL Y MÉTODOS	27
3.1 Pacientes	27
3.2 Métodos	28
3.5 Método Estadístico	28
	28
	29
	30
	31
	31
	31
	34
	34
	36
	37
	37
	38
4. RESULTADOS	41
4.1 Análisis de la dependencia transfusional en pacientes con SMD y del (5q) y su impacto en la supervivencia	41
4.1.1 Características generales de los pacientes	41
4.1.2 Desarrollo de la dependencia transfusional	43

4.1.3 Supervivencia global	46
4.1.4 Progresión a LMA-s	49
	51
	52
	54
	54
	58
	62
	63
	63
	63
	66
5. DISCUSIÓN	68
6. CONCLUSIONES	83
7. ANEXO	86
8. BIBLIOGRAFIA	90

INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

1.1 Síndrome Mielodisplásicos

Los Síndromes Mielodisplásicos (SMD) conforman un grupo muy heterogéneo de neoplasias hematológicas que afectan a las células progenitoras de la hematopoyesis. Cursan habitualmente con una médula ósea (MO) normocelular y más frecuentemente hipercelular con rasgos morfológicos de dishemopoyesis que finalmente se traducen en citopenias periféricas de las líneas celulares: mieloide, monocítica, eritroide y megacariocítica; además estos pacientes tienen una tendencia variable a evolucionar a leucemia aguda mieloblástica secundaria (LMA-s) [1]. Los SMD representan una enfermedad incurable con medianas de supervivencia variables entre 3 meses hasta 15 años según el número de blastos, número de citopenias y el tipo de alteraciones citogenéticas. Los avances tanto en el diagnóstico como en el tratamiento de estas entidades han suscitado cambios permanentes en su clasificación, abordaje clínico y terapéutico, lo que ha condicionado el desarrollo de numerosas clasificaciones y esquemas de estratificación pronóstica. El único tratamiento curativo hasta la fecha es el trasplante alogénico, el cual, solo se puede ofrecer a un 5% de los pacientes.

1.2 EPIDEMIOLOGIA

Los datos epidemiológicos de esta entidad se conocen mal por su falta de inclusión en los diferentes registros de enfermedades neoplásicas. En 2008 se publicaron los datos Americanos basados en el análisis de los estudios poblacionales de la North American Association of Central Cancer Registries (NAACCR) y del programa de vigilancia y epidemiología (SEER) en donde recogieron el 82% de la población norteamericana, proporcionando tasas de incidencia anual ajustadas por edad de 3,5 por cada 100.000 habitantes año [2]. De esta manera intuimos que su incidencia real en general es desconocida, pueden variar entre 3,2 y 12,6 casos por cada 100.000 habitantes al año según las series publicadas, pero lo que está claramente demostrado es que dicha incidencia aumenta con la edad. La edad media de presentación es de 70 años, siendo poco frecuentes en personas menores de 50 años, entre los cuales la incidencia anual se estima en 0.5 por 100.000 individuos; su incidencia es mayor en individuos de raza blanca y sexo masculino [3-5].

1.3 ETIOLOGIA

En la mayoría de los pacientes la etiología es desconocida, los SMD primarios aparecen sin historia previa de exposición a quimioterapia o radiaciones ionizantes. Entre las posibles etiologías se incluyen el alcohol, exposición al benceno, tabaco, infecciones víricas, historia familiar de neoplasias hematológicas, pero solo en el 30% de los casos se ha podido establecer una relación directa con estos factores de riesgo. Los SMD secundarios se producen generalmente tras tratamientos previos de tipo quimioterapia o radioterapia y su aparición puede producirse a partir del segundo y hasta los quince años después de dichos tratamientos, por ejemplo tras el

tratamiento con inhibidores de topoisomerasa II, como epipodofilotoxinas y antraciclina, el período de latencia es breve con rápida progresión a leucemia mieloblástica aguda (LMA-s) comprometiendo generalmente los cromosomas 11q23 o 21q22 [6,7].

El riesgo de desarrollar SMD y LMA es mayor en ciertos síndromes genéticos como por ejemplo en la eritroblastopenia congénita de Blackfan-Diamond (hipoplasia pura de células rojas con defectos craneofaciales, esqueléticos, o cardíacos).

1.4 FISIOPATOLOGÍA

1.4.1 Incremento de la apoptosis

Es uno de los mecanismos actualmente aceptados que justificaría el hecho de que haya una MO normo o hiperclonal con citopenias periféricas. Se ha atribuido a una sensibilidad anormal a la apoptosis en las células progenitoras y una capacidad de respuesta limitada de estas a los factores de crecimiento. Se cree que las señales pro-apoptóticas en pacientes con SMD derivan de una señalización anormal, un exceso de citoquinas proinflamatorias, y alteraciones de la respuesta inmune de células T. Se han implicado a las citocinas y receptores de superficie celular como mediadores de la apoptosis. No está claramente establecido si los cambios en el estroma de la médula ósea, incluyendo el aumento de la densidad microvascular, son un epifenómeno o un elemento patogénico importante de la enfermedad [8 - 10].

1.4.2 Alteración de la Respuesta Inmune

Aunque en muchos casos no se ha podido demostrar la clonalidad de los linfocitos en los pacientes con SMD, un hallazgo frecuente son las alteraciones inmunológicas que

se encuentran, esta desregulación del sistema inmune puede dar lugar a mielosupresión autoinmune y contribuiría también así a la hematopoyesis ineficaz.

Las alteraciones más

Frecuentemente descritas son hipergammaglobulinemia así como alteraciones cuantitativas y funcionales de los linfocitos T y de las células *NK* [11].

Se ha demostrado la existencia de expansión policlonal de los linfocitos T (CD4+) o la expansión clonal u oligoclonal de células T citotóxicas (CD8+) en la sangre y médula ósea de estos pacientes. Estos cambios son más pronunciados en la enfermedad de bajo riesgo, que se caracteriza por una disminución en el número de células T reguladoras (CD4+, CD25+ y FOXP3+). También existen pruebas de citotoxicidad autóloga contra células precursoras. De acuerdo con esto, la terapia inmunosupresora a veces es eficaz en pacientes con SMD de bajo riesgo por la atenuación de la expansión de clones de células T. La etapa tardía de la enfermedad se caracteriza por un aumento en el número de células T reguladoras. Al disminuir la respuesta autoinmune contra las células precursoras, se podría favorecer la proliferación clonal y la progresión de la enfermedad [12-14].

1.4.3 Alteraciones genéticas y moleculares

El estudio del cariotipo en los SMD es fundamental para el manejo apropiado de la enfermedad. Aproximadamente el 50% de los pacientes con SMD “de novo” presentan anomalías cromosómicas clonales, cuya cifra varía en función de los subtipos de SMD. Se caracterizan por ser alteraciones en su mayoría no balanceadas, que son las que reflejan una ganancia o pérdida de material cromosómico, estas alteraciones citogenéticas y/o el número de ellas presentes en cada caso reflejarían la

inestabilidad genética de estos clones celulares y la tendencia a adquirir nuevas alteraciones.

Hasta la fecha no existen alteraciones cromosómicas específicas de los SMD y la única alteración que se asocia con una categoría de la clasificación de la OMS, es la deleción intersticial del brazo largo del cromosoma 5 que se detecta también en otras neoplasias oncohematológicas. Dado que es el eje central de presente trabajo se verá detalladamente en el punto 1.9.

La pérdida total o parcial del cromosoma 7 se observa aproximadamente en el 10% de los SMD de novo y en el 50% de los secundarios.

En los SMD secundarios generalmente se reúnen varias alteraciones sobre todo en los cromosomas 5, 7, 8 y 12 y la evolución a LMA-s cursa con cariotipos complejos que incluyen monosomía o deleción de los cromosomas 5 y 7. La monosomía 7 (-7) aparece en el 10-15% y la trisomía del 8 (+8) en el 10%.

Con el fin de mejorar el conocimiento sobre el impacto pronóstico de las diferentes alteraciones citogenéticas se realizó un estudio cooperativo con un número muy importante de pacientes, se incluyeron 2902 casos y se definieron 5 grupos pronósticos con 19 categorías citogenéticas específicas las cuales han sido adoptadas por el nuevo IPPS-R [15] (tabla.1).

Tabla 1. Categorías Citogenéticas del IPSS-R [15].

Subgrupo pronóstico	Anomalías Citogenéticas
Muy Bueno	-Y, del(11q) aisladas
Bueno	Normal, del(5q), del (12p), del(20q) aisladas y anomalías dobles que incluyen del (5q)
Intermedio	del(7q), +8,+19, i(17q) aislada y cualquier otra anomalía única o doble independiente
Pobre	-7 e inv (3)/t(3q)/del(3q) aisladas, anomalías dobles que incluyen -7/del(7q) y anomalías complejas con 3 anomalías.
Muy pobre	Anomalías complejas con >3 anomalías

Los pacientes con SMD presentan mutaciones puntuales en genes, oncogenes y genes supresores de tumor asociados a transformación neoplásica y/o maligna por ejemplo mutaciones en *RAS* y *FMS* [16], genes reguladores del ciclo celular como *EVI-1*, genes que codifican para oncoproteínas (*BCL-2*, *c-MYC* y *TP53*), citoquinas y factores de crecimiento asociados a apoptosis, angiogénesis (*TNF α* , *TGB*, *IL1A*, *IL6*, *INF- γ* , *VEFG*), la inactivación de genes supresores tumorales y genes implicados en los mecanismos de reparación del DNA, proliferación y diferenciación celular por metilación de sus promotores [17]. Aunque por si solas estas anomalías no permiten asegurar un diagnóstico de SMD son de gran ayuda para demostrar la existencia de hematopoyesis clonal en casos de alta sospecha clínica de SMD y en ausencia de otras alteraciones genéticas.

1.5 Presentación clínica de los SMD

El cuadro clínico es inespecífico y muy heterogéneo. Un 50 % de los pacientes suele estar asintomático. Cuando aparecen síntomas estos van en relación con las

citopenias, siendo los más frecuentes los derivados de la anemia la cual si es muy intensa puede causar palidez, astenia, adinamia, con consecuente deterioro de la calidad de vida. En ocasiones pueden presentar infecciones relacionadas con la neutropenia o fenómenos hemorrágicos por la trombopenia. La evolución dependerá del estadio de la enfermedad y asociado al número de blastos [18].

1.6 Clasificación y Sistemas Pronósticos

Los SMD pueden clasificarse según su etiología en primarios o secundarios, también según alteraciones citológicas en médula ósea o sangre periférica o por alteraciones cariotípicas específicas. Entre los sistemas de clasificación más reconocidos se encuentran la FAB (Franco-Americano-Británica) de 1982 que fue utilizada durante de dos décadas. Para realizarla se valoraron las características morfológicas en sangre periférica (SP) y MO, la presencia y el número de blastos en SP y MO, sideroblastos en anillo, monocitos en SP, la presencia de bastones de Auer [19] (Tabla 2). Esta clasificación basada únicamente en datos morfológicos ha sido muy útil, pero ha sido casi abandonada al haberse establecido en años más recientes el valor de las alteraciones citogenéticas y otros datos importantes para la subclasificación.

Tabla 2. Clasificación según la FAB.

Subtipo	Blastos en Sangre Periférica (SP) (%)	Blastos en Médula Ósea (MO) (%)	Monocitos en Sangre Periférica	Sideroblastos en anillo en MO (%)
AR	<1	<5	<1 x10 ⁹ /L	<15
ARSA	<1	<5 (No bastones de Auer)	<1 x10 ⁹ /L	>15
AREB	<5	5-19 (No bastones de Auer)	<1 x10 ⁹ /L	Indiferente
AREB-T	>5	20-29 (No bastones de Auer)	<1 x10 ⁹ /L	Indiferente
LMMC MD/MP	<5	0-20	<1 x10 ⁹ /L	Indiferente

Abreviaturas: AR: anemia refractaria. ARSA: anemia refractaria con sideroblastos en anillo. AREB: anemia refractaria con exceso de blastos. AREB-T: anemia refractaria con exceso de blastos en transformación. LMMC: Leucemia mielomonocítica crónica. MD: Mielodisplásica. MP: Mieloproliferativa.

Una nueva clasificación fue publicada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2001, que se actualizó en 2008. Esta nueva combinó datos morfológicos, citológicos y citogenéticos lo que permitió identificar distintas entidades clínicamente relevantes. Tiene en cuenta el número de citopenias, tipo y grado de displasia, porcentaje de blastos en SP y MO [20] (Tabla 3).

Tabla 3. Clasificación de los SMD según la OMS de 2008.

Subtipo	Citopenias	Blastos en SP (%)	Blastos en MO (%)	Sideroblastos en anillo MO (%)	Displasia
CRDU	1 o 2	<1	<5	<15	1 Línea
ARS	Anemia	0	<5	>15	Sólo eritroide
CRDM	Citopenia (s)	<1 No bastones de Auer. <1 x 10 ⁹ /L Monocitos	<5 No bastones de Auer.	<15 o >15	>2 líneas
AREB-1	Citopenia (s)	<5 No bastones de Auer. <1 x 10 ⁹ /L Monocitos	5-9 No bastones de Auer.	Indiferente	Indiferente
AREB-2	Citopenia (s)	5-19 No bastones de Auer. <1 x 10 ⁹ /L Monocitos	10-19 +/- bastones de Auer.	Indiferente	Indiferente
SMD del (5q) aislada	Anemia	<1 No bastones de Auer.	<5 Bastones de Auer.	Indiferente	Megacariocitos con núcleo hipolobulado
SMD inclasificable	Citopenias	≤ 1	<5		<10% en >1 líneas mieloides + alteración citogenética

Abreviaturas: CRDU: citopenia refractaria con displasia unilínea; ARS: Anemia refractaria con sideroblastos; CRDM: citopenia refractaria con displasia multilínea; AREB-1: Anemia refractaria con exceso de blastos tipo 1; AREB-2: Anemia refractaria con exceso de blastos tipo 2.

Debido a su gran variabilidad citomorfológica los SMD presentan una gran variabilidad pronóstica tanto en términos de supervivencia global como de riesgo de evolucionar a LMA-s [21].

En 1997 se desarrolló por primera vez un índice pronóstico Internacional (IPSS) [22] que englobaba a todos los SMD, que incluía 3 variables pronósticas fundamentales: el porcentaje de blastos en MO, cariotipo y citopenias estratificando a los pacientes en 4 grupos de riesgo (bajo, intermedio 1 y 2, alto) con diferencias estadísticamente significativas en términos de supervivencia global (SG) y riesgo de progresar a LMA-s: Bajo riesgo (puntuación: 0; mediana de SG: 5,7 años), intermedio-1 (puntuación: 0,5-1; mediana de SG: 3,5 años), intermedio-2 (puntuación: 1,5-2; mediana de SG: 1,1 años) y alto riesgo (puntuación: 2,5-3,5; mediana de SG: 0,4 años). Este índice ha sido empleado universalmente en la práctica clínica; sin embargo, a lo largo de los años se han puesto en evidencia nuevos factores de la enfermedad con alto valor pronóstico que no están incluidos en el IPSS o que está infravalorado su valor pronóstico, esto ha condicionado que muy recientemente se haya realizado un nuevo IPSS revisado (IPSS-R) el cual conserva las variables del IPSS y añade nuevas categorías a los pacientes, estratificándolos en 5 grupos de riesgo: muy bajo, bajo, intermedio, alto y muy alto, con claras diferencias en supervivencia global (SG) y riesgo de evolución a LMA [23] (Tabla 4). Se recomienda emplear en los SMD los índices pronósticos IPSS y ahora IPSS-R para establecer el pronóstico y seleccionar el tratamiento en el paciente individual pero adaptándolo a los conocimientos científicos actuales.

Tabla 4. Grupos de riesgo según el IPSS-R.

Característica	0 Puntos	0,5 Puntos	1 Puntos	1,5 Puntos	2 Puntos	3 Puntos	4 Puntos
Grupo de Riesgo Citogenético*	Muy bueno		Bueno		Intermedio	Pobre	Muy pobre
Blastos de MO (%)	0-2		3-4,9		5-10	>10	
Hemoglobina (g/dL)	≥ 10		8-9,9	<8			
Plaquetas ($\times 10^9/L$)	≥ 100	50-99	<50				
PMN ($\times 10^9/L$)	$\geq 0,8$	<0.8					

Grupos de riesgo: Muy bajo: 0-1 puntos; Bajo: >1,5- 3 puntos; Intermedio: >3-4,5; Alto >4,5-6 puntos y Muy Alto: >6 puntos.

1.7 Otros factores pronósticos

En los últimos años se han puesto de manifiesto la importancia de otras características de la enfermedad, así el grupo de Pavía [24] reconoció la influencia negativa de la sobrecarga de hierro en los pacientes independientemente de la intensidad de las transfusiones, otro estudio confirmó estos datos [25] mostrando que este efecto negativo del desarrollo de sobrecarga de hierro afecta tanto la SG como al riesgo de evolución a LMA-s. La presencia de Mielofibrosis moderada/grave (grado 2-3 del consenso europeo) tiene influencia pronóstica en la SG y riesgo de transformación a LMA-s en pacientes de alto y bajo riesgo de la OMS [26].

Se ha demostrado que la trombocitopenia grave (plaquetas $< 30 \times 10^9$) tiene un peso pronóstico independiente en la SG en pacientes de bajo riesgo (bajo e intermedio 1

del IPSS) con mayor riesgo de sangrado y mortalidad por hemorragia y peor SG [27], lo mismo sucede con la neutropenia grave ($PMN < 0,5 \times 10^9/L$) acorta la SG y el tiempo de progresión a LMA-s en pacientes con SMD de bajo riesgo [28]. Esta influencia negativa tanto de la trombocitopenia y neutropenia grave ha sido observada en el IPSS-R que comentamos previamente.

1.8 Células Estromales Mesenquimales

Friedenstein y cols en 1966 describieron la presencia en MO de una población de células no hematopoyéticas, progenitoras del estroma medular, denominadas células Stem Mesenquimales (MSC) [29] estas presentan capacidad de proliferación y de autorenovación, son capaces de diferenciarse a varias líneas y responden a distintos estímulos [30]. Debido a la ausencia de un marcador de superficie específico y a la necesidad de estandarización, en 2006 la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) estableció, como consenso, los criterios mínimos para identificar las MSC [31], (Tabla 5).

Tabla 5. Criterios de identificación de MSC (ISCT) [30].

1. Adherencia al plástico.	
2. Fenotipo	
Positivo ($\geq 95\%$ +)	Negativo ($\leq 2\%$ +)
	CD45
CD105	CD34
CD73	CD14 or CD11b
CD90	CD79 α or CD19
	HLA-DR
3. In vitro: diferenciación a osteoblastos, adipocitos, condroblastos.	

1.8.1 Células estromales Mesenquimales en los Síndromes Mielodisplásicos

El estroma es la estructura que soporta la hematopoyesis mediante la secreción de citoquinas y factores de crecimiento. Está conformado por células reticulares, adipocitos, fibroblastos, células endoteliales y osteoblastos cuyo origen común son las células Mesenquimales [32], este estroma juega un papel clave en el desarrollo tumoral, que necesita, además de las células clonales, un ambiente favorecedor. Las células del estroma producen de gran número de citocinas que están implicadas en la regulación procesos celulares como proliferación, diferenciación, apoptosis etc. En los SMD existe por parte del estroma una mayor producción de citocinas pro-inflamatorias y pro-apoptóticas (TNF- α , IFN, TGF- β , IL-1 β , VEGF) con disminución de la proliferación de los progenitores hematopoyéticos e incremento de la apoptosis [33].

1.9 Síndrome Mielodisplásico con delección 5q

El SMD con 5q- es un subtipo de SMD reconocido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) que se definió como un SMD caracterizado por la presencia de una delección aislada del brazo largo del cromosoma 5 y <5% de blastos en la médula ósea [34]. Originalmente descrito por Van den Berghe y colaboradores en el año de 1974, se caracteriza por la presencia de anemia macrocítica, cifra normal o elevada de plaquetas, megacariocitos mononucleares, e hipoplasia roja en la MO. Su presentación es más frecuente en el sexo femenino y en general tiene un pronóstico favorable, aproximadamente un 10% de los pacientes se transforman en sLMA, [35, 36] (Tabla 6).

La gran mayoría de los pacientes con el síndrome 5q- a lo largo de su evolución desarrollan dependencia transfusional de hematíes con la consecuente sobrecarga de hierro; esta dependencia transfusional representa quizás el problema clínico más importante con consecuencias económicas, y disminución en la calidad de vida.

Tabla 6. Características clínicas y hematimétricas del Síndrome 5q-

Presentación clínica	Características Hematopatológicas
<ul style="list-style-type: none"> - Predomina en el sexo femenino (Ratio 7:3) - Anemia refractaria - Tienen bajo riesgo de progresión a LMA-s. - Buen pronóstico 	<ul style="list-style-type: none"> - Anemia macrocítica - Leucopenia leve - Normal o Aumentado recuento de plaquetas - 5q- aislado (como única anomalía cromosómica) - Megacariocitos hipolobulados en MO. - <5% de blastos en MO. - Hipoplasia eritroide en la MO

En 2010, Patnaik y colaboradores publicaron un trabajo en donde estudiaron los factores que podrían influir en la supervivencia global de estos pacientes con SMD 5q- (dentro del criterio OMS) encontrando que influían negativamente la edad (≥ 70 años), el ser dependiente de transfusión al diagnóstico y la disgranulopoyesis [37].

1.9.1 Región “crítica” o comúnmente delecionada (RCD)

El fenotipo del Síndrome 5 q- se considera una manifestación secundaria a las deleciones alélicas situadas dentro de la denominada “Región comúnmente delecionada” ubicada en el brazo largo del cromosoma 5. En esta zona están localizados numerosos genes implicados en la regulación de la hematopoyesis, citoquinas con sus respectivos receptores, reguladores del ciclo celular y factores de transcripción lo que ha suscitado un gran interés; se ha buscado la localización de un posible gen supresor tumoral que fuese el que predispusiera al inicio del síndrome

5q-. La banda 5q31-q32 es el locus deleciónado en la mayoría de los casos. El punto de ruptura distal más frecuente es el 5q33 (70%) y los proximales son el 5q13 (50%) o el 5q15 (20%) y en la que se localizan 24 genes conocidos (otros 16 predecibles) entre los que se encuentran *SPARC*, *RPS14*, *EGR1*, de los que hablaremos más adelante [38,39].

1.9.2 Patogénesis y Bases celulares del Síndrome 5q-

El Síndrome 5q- es una enfermedad de la célula madre hematopoyética (HSC), hay resultados de 2 estudios que apoyan esta hipótesis, Jaju y colaboradores [40] combinando técnicas de inmunofenotipo (CMF) e hibridación in situ (FISH), identificaron en 1 de 3 casos de síndrome 5q- la afectación de las células de linfoides B; Nilsson y cols mostraron que en 9 pacientes con síndrome 5q- no había alteración de las células linfoides T, pero si en 1 caso la alteración de las linfoides B [41]. Estos datos apoyan la idea de que la alteración 5q- está presente en la HSC con potencial de diferenciación linfo-mieloide [42].

Las bases celulares de la anemia y la macrocitosis aún no están completamente esclarecidas, en 2008 Ebert y cols, en un elegante estudio en el que utilizaban la metodología de RNA de interferencia de los 40 genes ubicados en la región comúnmente deleciónada, demostraron que la haploinsuficiencia del gen *RPS14* (proteína ribosomal S14 localizada en la zona 5q32) era fundamental para el desarrollo de la enfermedad [43]. Posteriormente en 2010 Gardaret y cols, llevaron a cabo una serie de experimentos encaminados a analizar la fase final de la diferenciación eritroide en pacientes 5q-, comprobaron que la disminución en la producción de glóbulos rojos la relacionaba con la haploinsuficiencia del gen *RPS14*

[44]. Por lo tanto los pacientes con Síndrome 5q- muestran defectos en la expresión de genes involucrados en la biogénesis de los ribosomas, sugiriendo que este síndrome representaría una ribosomopatía y como consecuencia menor desarrollo y aumento de la apoptosis de la línea eritroide. La haploinsuficiencia de *RPS14* en las células CD34+ de los pacientes con Síndrome 5q- presenta cierta analogía con el Síndrome de Blackfan Diamond (SBD), en este se produce una haploinsuficiencia del gen *RPS19* [45], y se caracteriza principalmente por anemia, eritropoyesis ineficaz en MO y riesgo de desarrollar LMA. Por lo tanto en ambos casos el SBD y en el Síndrome 5q- el fallo de la eritropoyesis está en relación con la haploinsuficiencia de proteínas ribosomales. En 2010 Barlow y cols, demostraron que además de la disminución de la haploinsuficiencia de *RPS14* producía una sobreexpresión de *P53* y aumento de la apoptosis [46]. Järdersten y cols en 2011 usaron mediante secuenciación de última generación detectaron la mutación de *P53* en el 18% de todos los pacientes con Síndrome 5q- estudiados [47].

Otro gen supresor tumoral que se ve afectando por la haploinsuficiencia en la región 5q33.1 es *SPARC*, que codifica la osteonectina (Proteína Secretada, Acida y Rica en cisteína) y cuya función es modular el crecimiento, adhesión celular a la matriz, inducir apoptosis e inhibir de angiogénesis [48]. Su haploinsuficiencia podría incrementar la adhesión de los progenitores hematopoyéticos al nicho y obtener así una ventaja sobre la hematopoyesis normal.

1.9.3 Los micro-RNAs y su implicación en los SMD con 5q-

En 2010 Starczynowsky y cols, analizaron la expresión de micro-RNAs que pudieran estar incluidos en la región comúnmente delecionada del 5q-, e identificaron el

miR-145 y miR-146a como aquellos que están menos expresados en las células CD34+ de los pacientes con 5q-. Su baja expresión condiciona la sobre expresión de los genes *TIRAP* (miR145) y *TRAF6* (miR-146a) lo que ocasiona la aparición de características importantes del Síndrome como los megacariocitos hipolobulados y la trombocitosis periférica [49].

1.9.4 El estroma de la médula ósea en los SMD 5q-

Se ha demostrado que las células MSC de la médula ósea de pacientes con SMD tienen alteraciones genómicas y que en el síndrome 5q- dichas alteraciones son diferentes a las de otros SMD. En 2009 López-Villar y cols, en nuestro laboratorio caracterizaron MSC de médula ósea en 36 pacientes con SMD y demostraron que las MSC de los pacientes con SMD tenían una capacidad de crecimiento in vitro alterada así como alteraciones genómicas y específicamente en el Síndrome 5q- los genes con ganancias fueron el *FGF4* (involucrado en la producción de plaquetas mediante inducción de megacariopoyesis por vía diferente a la de la trombopoyetina), y el gen *TGFβ* (implicado en la apoptosis de las células hematopoyéticas maduras) [50].

En 2009 Raaijmakers y cols, demostraron que la delección de *DICER* y su gen diana *SBDS* en osteoprogenitores derivados de MSC provocaba un SMD en modelos murinos [51].

Un trabajo de nuestro grupo comprobó que tanto *DICER* como *SBDS* estaban infraexpresados en MSC de pacientes con SMD y que esta infraexpresión era mayor en los pacientes con 5q- [52].

1.9.5 Tratamiento del Síndrome 5q-

El objetivo del tratamiento de estos pacientes dado que son de bajo riesgo es conseguir la independencia transfusional lo que conllevaría a mejorar la calidad de vida y quizás la supervivencia global. No existen datos en la literatura en donde se refleje cuál es la evolución natural de la anemia en estos casos ni de cuánto es el tiempo hasta la dependencia transfusional, ni de los factores que pueden modificarla. Estrategias de tratamiento iniciales apuntaron como dianas a citoquinas inhibitorias de la hematopoyesis como *FNT- α* , *IL-1- β* y *TGF- β* con el objetivo de disminuir la apoptosis. Se iniciaron estudios con la Talidomida que in vitro suprimía estas citoquinas. Pertenece a los inmunomoduladores (IMiDs) de primera generación, y fue el primer agente inmunomodulador utilizado en el tratamiento de los SMD [53].

En diciembre de 2005, un IMiDs de segunda generación, la Lenalidomida, análogo de la Talidomida pero con menor toxicidad y mayor eficacia fue aprobado por la FDA en los EE.UU para el tratamiento de pacientes con SMD de bajo Riesgo e intermedio-1 asociado a una delección del cromosoma 5q con anemia transfusión dependiente con o sin anomalías genéticas adicionales [54]. Se sabe que los pacientes que presentan una alteración única de pérdida de material genético del brazo largo del cromosoma 5 como única alteración citogenética tienen sensibilidad especial a esta molécula [55].

Los primeros datos de su uso en SMD los proporcionaron en 2005 Alan List y cols, quienes llevaron a cabo un ensayo clínico en el que se evaluó la eficacia y seguridad de la Lenalidomida en 43 pacientes con SMD y anemia sintomática o dependiente de transfusión, la respuesta al tratamiento la evaluaron a las 16 semanas; vieron que 24

pacientes (56%) alcanzaron algún tipo de respuesta hematológica, 63% de los casos trasfusión dependientes lograron independencia transfusional, y que la tasa de respuestas fue más alta en los pacientes que tenían una delección intersticial en el cromosoma 5q31 que en otros SMD con cariotipos normales o con otro tipo de alteraciones [56]. Estos primeros resultados sentaron las bases del inicio de un ensayo de fase II (MDS-003) que incluyó 148 pacientes con SMD de riesgo bajo e intermedio-1 con dependencia transfusional y del (5q31) aislada o con otras alteraciones citogenéticas añadidas; el objetivo era ver si lenalidomida era capaz de reducir los requerimientos transfusionales y suprimir el clon anormal en pacientes 5q-. La respuesta a la Lenalidomida fue rápida con una media de tiempo de 4.6 semanas. El 76% de los pacientes logró algún tipo de respuesta eritroide, y en el 67% se alcanzó independencia transfusional y el 45% entró en respuesta citogenética completa. Las respuestas tanto eritroides como citogenéticas fueron similares en pacientes con delección 5q aislada y en los que tenían una anomalía citogenética adicional, la mediana de duración de las respuestas se situó en 115 semanas con un aumento de 5,4 gr/dl en los niveles de hemoglobina [57].

1.9.6 Mecanismo de acción de la Lenalidomida

La Lenalidomida es un derivado 4-amino-glutarimida de la Talidomida que a diferencia de esta no posee toxicidad neurológica, es un estimulador más potente de la respuesta inmune inducida por antígenos, antiangiogénico y antitumoral directo, aunque los mecanismos de acción no están completamente identificados se sabe que es un fármaco que actúa directamente sobre el clon 5q-.

Tabla. 7 Diferencias entre Talidomida y Lenalidomida [58].

Nombre	Talidomida	Lenalidomida
Efectos en proliferación de Linfocitos T	Estimula la proliferación células T e incrementa la producción de INF- γ e IL2.	Lenalidomida es 100-1000 veces más potente productora de IL2 e INF- γ y estimuladora de células T.
Efectos adversos	Muchos efectos adversos. Neuropatía es uno de ellos.	Baja incidencia. Menor neuropatía. Trombopenia-neutropenia.
Teratogenicidad	Conocido teratogénico.	No se ha demostrado este efecto en modelos murinos.

La Lenalidomida es un modulador de los diferentes componentes del sistema inmune alterando la producción de citoquinas, inhibiendo la secreción del factor de Necrosis tumoral (FNT α), interleucinas IL-1 β , IL6, IL12, el factor estimulante de colonias de macrófagos granulocíticos (GM-CSF). Puede estimular la secreción de citocinas anti inflamatorias como IL10 y estimula a los linfocitos T provocando un aumento de citoquinas producidas por las células Th1 lo que da como resultado un aumento de la secreción de IFN- α e IL-2 que a su vez estimulan la proliferación clonal y por consiguiente la actividad de células T y Natural Killer (NK) capaces de lisar las células tumorales [59]; es posible que la Lenalidomida pueda modular a ciertos subtipos de células T y dar como resultado mejorías hematológicas en los pacientes con SMD. Por otro lado ha visto que puede inducir apoptosis al aumentar la sensibilidad a la inducida por FAS y mediada por activación de las caspasas-8, tiene actividad antiangiogénica, antiproliferativa, y modula genes claves situados en la RCD incluyendo genes supresores de tumor, reguladores de la actina del citoesqueleto y de la membrana celular [60].

El otro efecto antitumoral de la Lenalidomida se debe a su actividad Antiangiogénica, el crecimiento de los tumores primarios y metastásicos requiere el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos, el factor de crecimiento Vascular endotelial (VEGF) y sus receptores son necesarios para este proceso y pueden producirse por el clon mielodisplásico. La Lenalidomida reduce la expresión de estos factores y de la IL6. Se ha realizado un estudio en 35 pacientes con SMD con delección 5q en donde se demostró una marcada disminución de la vascularización de la médula ósea tras tratamiento con Lenalidomida [61].

El mecanismo, o los mecanismos exactos de acción de la Lenalidomida no se conocen con seguridad, parece que hay varios genes candidatos (supresores de tumor) cuya expresión puede modularse por su efecto. Pellagati y cols [48], compararon el efecto de Lenalidomida en eritroblastos de SMD con delección 5q y de controles sanos. La Lenalidomida inhibió la proliferación in vitro de los eritroblastos de los pacientes mientras no se modificó la de las células de los controles, además modificó significativamente la expresión de genes en los eritroblastos con delección 5q, *VSIG4*, *PPIC*, *TPBG*, *Activina A*, y *SPARC*.

La *Activina A*, tiene funciones pleiotrópicas incluyendo apoptosis por lo tanto se ha visto que la Lenalidomida restaura su expresión hasta niveles normales en estos pacientes [48]. Esto además podría explicar en parte el por qué las células con 5q- son particularmente sensibles a este fármaco. Puesto que cada vez está más claro el papel del estroma en el mantenimiento de los SMD, Ximeri y cols, exploraron el efecto del tratamiento con Lenalidomida en el estroma de la MO de 10 pacientes con delección 5q. Confirmaron que el tratamiento mejora significativamente el potencial

clonogénico de la MO y conlleva un aumento de las células precursoras eritroides y una mejor capacidad de soporte de la hematopoyesis por parte del estroma [55].

Wei y colaboradores, reportaron la haploinsuficiencia de dos fosfatasas: Cdc25C y PP2Ac, implicadas en la regulación del ciclo celular en la fase G2-Mitosis. Los genes que las codifican están situados en la RCD del cromosoma 5, y están alterados en la mayoría de los pacientes con Síndrome 5q-, su inhibición por la Lenalidomida indujo apoptosis por el bloqueo del ciclo celular en la fase G2 [62], es por lo tanto, concebible que la haploinsuficiencia en estos genes también pueda inducir un aumento de la sensibilidad a la Lenalidomida, sin embargo esto no explica del todo la sensibilidad a la Lenalidomida.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

De todo expuesto en el apartado de introducción deducimos que a pesar de que el Síndrome Mielodisplásico con 5q- es posiblemente el que mejor caracterizado está desde el punto de vista clínico, fisiopatológico y de que la Lenalidomida es su tratamiento de elección, todavía quedan mucho interrogantes por responder, lo que ha centrado nuestro interés y nos ha llevado a realizar el presente trabajo.

En el presente trabajo partimos de la siguiente hipótesis:

Los pacientes con SMD con 5q- podrían beneficiarse de un tratamiento precoz con Lenalidomida dado que cuando ya tienen necesidades transfusionales su respuesta es buena pero no se obtiene en todos los casos. Además es posible que este medicamento actúe a través de mecanismos aún no descritos basados en su capacidad de actuar sobre el micromedioambiente hematopoyético.

Con esta base nos planteamos los siguientes objetivos:

OBJETIVOS

El objetivo Global

- 1.** Profundizar en el conocimiento de los factores clínico-biológicos que puedan determinar el desarrollo de la dependencia transfusional en pacientes con SMD y del (5q-) y el impacto que esto puede tener en la evolución de la .enfermedad. Estudiar si existen mecanismos del micromedioambiente implicados en la respuesta a la Lenalidomida.

MATERIAL Y METODOS

2. MATERIAL Y METODOS

3.1 PACIENTES

Para el primer objetivo se analizaron de forma retrospectiva los datos de 84 pacientes, diagnosticados de SMD de bajo riesgo (según los criterios del IPSS e IPSS-R y las clasificaciones FAB y OMS de 2001), con delección 5q y sin dependencia transfusional al diagnóstico de la enfermedad, incluidos en el Registro Español de Síndromes Mielodisplásicos (RESMD) entre los años 1980 y 2012.

En todos los casos se obtuvo previamente el correspondiente consentimiento informado de acuerdo a las normas éticas y de buena práctica clínica establecidas por el Comité ético del Hospital Universitario de Salamanca.

2.2 METODOS

Para dar respuesta al primer objetivo sobre el análisis de los factores clínicos y biológicos que pudieran tener impacto en el desarrollo de la dependencia transfusional y en la evolución de la enfermedad se analizaron un total de 84 pacientes. Se utilizó una hoja de recogida de datos y complementamos la información con la ya existente previamente en el registro Español. (Anexo 1). Para poder clasificar de forma adecuada a los pacientes se incluyó el estudio citogenético. Este se realizó en cada centro, siguiendo los procedimientos habituales. Los cromosomas fueron identificados y los cariotipos descritos de acuerdo al “International System for Chromosome Nomenclature” (ISCN). Se definieron 2 grupos citogenéticos: delección aislada del brazo largo del cromosoma 5 y delección aislada del brazo largo del cromosoma 5 con 1 anomalía adicional.

RESULTADOS

3. RESULTADOS

4. 1 Análisis de la dependencia transfusional en pacientes con SMD y del (5q) y su impacto en la supervivencia.

4.1.1 Características generales de los pacientes

Las principales características de los pacientes se muestran en la tabla 10. El estudio se realizó en 84 pacientes (19 hombres y 65 mujeres), con una mediana de edad de 79 años (rango 43-97 años). Ochenta y dos pacientes disponían de datos citogenéticos para realizar el análisis, y en ellos se calculó el IPSS e IPSS-R (el 90% de los pacientes tenían una delección aislada de 5q y el 99% eran de bajo y muy bajo riesgo según el IPSS-R). La mediana del porcentaje de blastos en médula ósea fue de 2% (rango 0-9%). De 61 pacientes que desarrollaron dependencia transfusional, 49 recibieron tratamiento: 19 lenalidomida, 24 AEE y 6 otros tratamientos (4 quimioterapia intensiva y 2 hidroxiurea). De ellos, 15 pacientes recibieron tratamiento antes de la DT, siete con lenalidomida y ocho con AEE.

Tabla. 10 Características de los pacientes.

Características	N 84	(%)
Edad (años) mediana (rango)	79 (43-97)	
Sexo:		
Masculino / Femenino	19/65	23/77
Clasificación FAB		
AR	43	51
ARSA	36	43
AREB	5	6
Subtipo OMS		
AR/ARSA/CRDM/CRDM-SA	13	15
SMD con del 5q	66	79
AREB-1	5	6
Citogenética		
Del(5q) aislada	74	90
Del(5q)+ 1 anomalía adicional	8	10
No disponible	2	---
IPSS		
Bajo	63	78
Intermedio I	18	22
No disponible	3	---
IPSS-R		
Muy Bajo	37	46
Bajo	41	50
Intermedio	3	4
No disponible	3	---
Tipo de SMD		
Primario	82	98
Secundario	2	2
Citopenias	Mediana	Rango
Hemoglobina (gr/dL)	10.4	7.4/13.9
Plaquetas (x10 ³ /μL)	259	58/1000
Neutrófilos (x10 ³ /μL)	2090	40/9380

SMD: síndrome mielodisplásico; AR: anemia refractaria; ARSA: anemia refractaria con sideroblastos en anillos; AREB: anemia refractaria con exceso de blastos; CRDM: citopenia refractaria con displasia multilínea; CRDM-SA: citopenia refractaria con displasia Multilínea con sideroblastos en anillo.

4.1.2 Desarrollo de la dependencia transfusional

Todos los pacientes incluidos eran independientes de transfusión de hematíes según los criterios del IWG 2006 al diagnóstico [23]. Durante el estudio, 61 pacientes (73%) se hicieron dependientes de transfusión con una mediana de tiempo de 1,7 años desde el diagnóstico (IC 95%, rango: 1,2-2,8 años) (fig. 1). Se analizaron múltiples factores con potencial impacto en el desarrollo de la dependencia transfusional mediante un análisis univariante (tabla.11). Sin embargo, la única variable que demostró impacto negativo en el tiempo libre de transfusión, fue el nivel de hemoglobina $< 9,0$ g/dL acortando este tiempo libre de transfusión en 17 meses (mediana de tiempo hasta la DT de 23 meses para pacientes con cifra de Hb al diagnóstico \geq de 9 g/dL, frente a 6 meses para pacientes con una cifra < 9 g/dL, ($p=0.008$) (Fig. 2). Este valor retuvo significación estadística en el análisis multivariante. [HR: 3,490 (IC 95%: 1,274-9,560) ($p=0,015$)] (Tabla.12).

Tabla 11. Análisis Univariante de los factores con impacto sobre la SLT, SG y Supervivencia libre de Leucemia. (Kaplan-Meier)

		Supervivencia libre de transfusiones		Supervivencia Global		Supervivencia libre de Leucemia	
Variable	%	Mediana en meses	p	Mediana en meses	p	Mediana en meses	p
ANC							
≥1000(x10 ³ /μL)	92	24	0,590	68	0,958	99	0,37
<1000(x10 ³ /μL)	8	12		53		NR	
Hb							
≥9,0 (gr/dL)	93	23	0,008	68	0,629	NR	0,22
<9,0 (gr/dL)	7	6		49		NR	
Plaquetas							
≥100 (x10 ³ /μL)	93	21	0,942	84	0,001	98	0,000
<100 (x10 ³ /μL)	7	7		42		20	
Blastos en MO							
≤2%	62	21	0,661	96	0,443	78	0,700
>2%	38	24		68		100	
Sexo							
Hombre	23	30	0,890	84	0,505	77	0,502
Mujer	77	18		65		97	
Riesgo citogenético							
Bueno	99	21	0,517	66	0,785	98	0,910
Intermedio	1	49		120		120	
Cariotipo							
del(5q) aislada	90	21	0,596	68	0,554	98	0,209
del 5(q)+1 alteración	10	9		50		77	
FAB							
AR	51	21	0,995	120	0,585	88	0,465
ARS	43	28		56		NR	
AREB	6	18		58		97	
OMS							
AREB I	6	18	0,936	58	0,359	98	0,575
Otros	94	21		68		100	
IPSS							
Bajo	78	24	0,241	68	0,664	88	0,482
Intermedio	22	14		60		98	
IPSS-R							
Muy bajo	46	21	0,429	66	0,019	88	0,846
Bajo	50	23		121		100	
Intermedio	4	10		49		NR	
Transfusiones							
si	73	-----	-----	66	0,527	120	0,082
No	27			NR		88	
Tratamientos							
Si	77	-----	-----	84	0,017	100	0,002
No	23			52		43	
Lenalidomida	31	-----	-----	NR	0,015	101	0,017
EPO y otros	45	-----	-----	69		NR	
No tratamiento	24	-----	-----	50		89	

ANC: Neutrófilos; Hb: hemoglobina; AR: anemia refractaria; ARS: anemia refractaria con sideroblastos ; AREB: anemia refractaria con exceso de blastos; AREB-I : anemia refractaria con exceso de blastos CRDM: Citopenia refractaria con displasia multilínea; EPO: eritropoyetina.

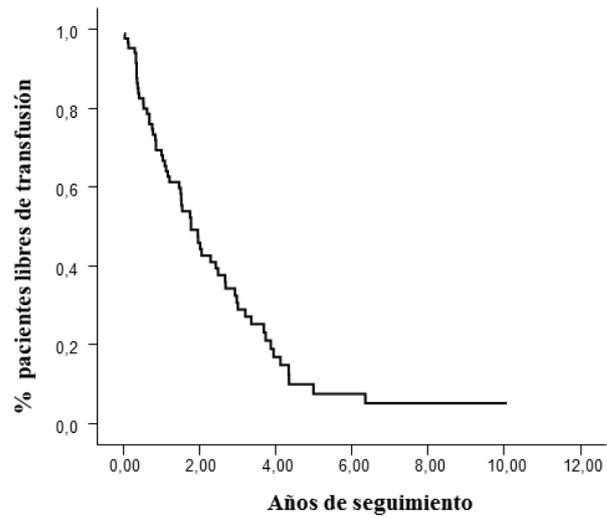


Figura 1. Tiempo hasta el desarrollo de la dependencia transfusional (años).

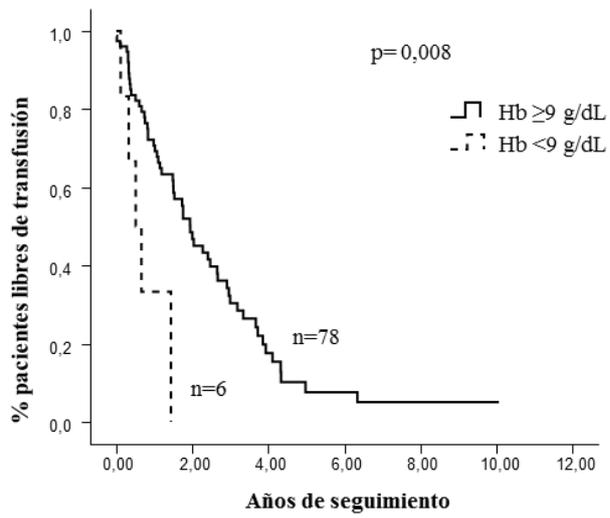


Figura 2. Supervivencia libre de transfusiones en función con la cifra de hemoglobina al diagnóstico.

4.1.3 Supervivencia Global

La mediana de seguimiento de la serie global fue de 48 meses. El 46% de los pacientes estaban vivos en el momento del último seguimiento, el 43% habían muerto y el 31% habían desarrollado una LMA-s. La supervivencia global a los 2 y 5 años fue del 92% y 50% respectivamente, (fig. 3). En el análisis univariante que se detalla en la tabla 11, los factores que se asociaron a una menor supervivencia fueron: el tener una cifra de plaquetas por debajo de $100 \times 10^3/\mu\text{L}$ [(mediana de seguimiento de 84 meses para pacientes con más de $100 \times 10^3/\mu\text{L}$ vs 42 meses para los pacientes con menos de $100 \times 10^3/\mu\text{L}$. ($p=0,001$)], y el pertenecer al grupo de riesgo intermedio del IPSS-R [(mediana de SG de 66 meses para los pacientes de grupo muy bajo riesgo vs 121 meses para los de bajo riesgo vs 49 meses para los de riesgo intermedio respectivamente, ($p= 0,019$)] (fig. 4 y 5). Por el contrario, aquellos pacientes que habían recibido algún tipo de tratamiento presentaron una mayor supervivencia que fue significativamente superior en los pacientes que habían recibido Lenalidomida frente a otros tratamientos [(mediana de supervivencia no alcanzada para los pacientes que recibieron Lenalidomida vs 69 meses para los que recibieron EPO vs 50 meses para los que no recibieron tratamiento, respectivamente, $p= 0,015$)] (fig. 6). En el análisis multivariante, el recuento de plaquetas $<100 \times 10^3/\mu\text{L}$ y el tratamiento con Lenalidomida fueron las únicas variables que retuvieron significación estadística y mejoraron la SG de los pacientes con esas características [HR: 3,3 (IC 95% 1,07-10,36) ($p= 0,038$)] y [HR: 0,353 (IC 95% 0,129-0,963) ($p=0,042$)] respectivamente (tabla.12).

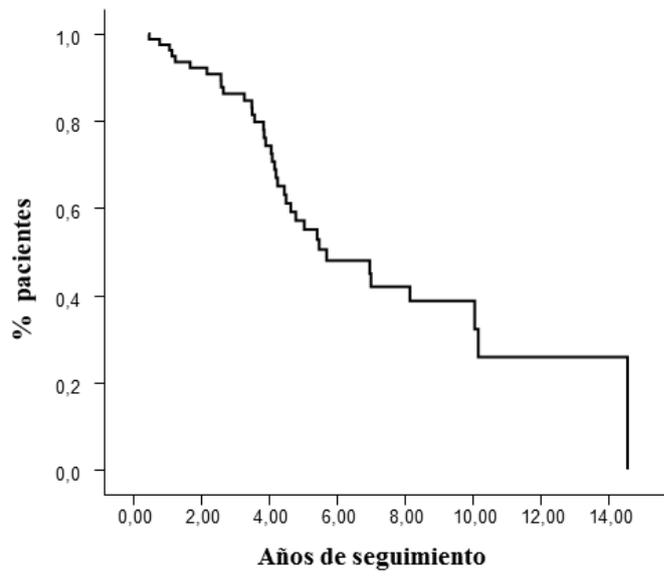


Figura 3. Supervivencia global

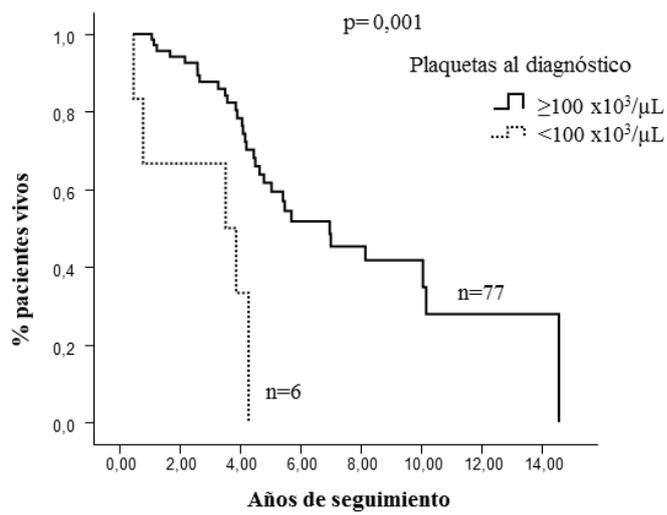


Figura 4. Supervivencia global en relación a la cifra de plaquetas.

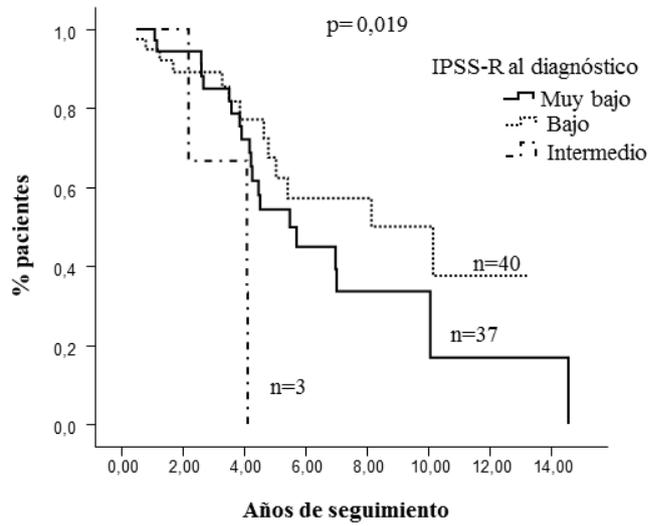


Figura 5. Supervivencia global en relación con la estratificación de riesgo IPSS-R.

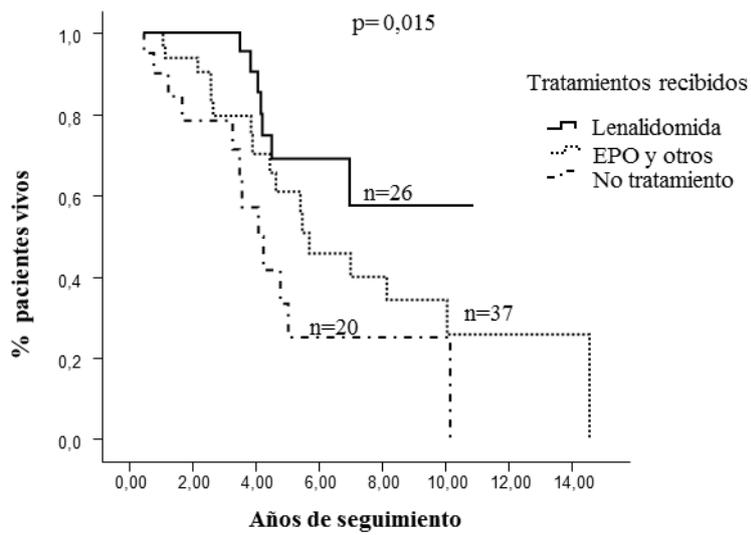


Figura 6. Supervivencia global en relación al tipo de tratamiento recibido.

4.1.4 Progresión a LMA-s

En nuestra serie, 26 pacientes (31%) progresaron a LMA-s durante el seguimiento. Utilizando el método de análisis de riesgos competitivos comprobamos que la incidencia acumulada de progresión a LMA-s fue de 4,4% a los 2 años y del 12,7% a los 5 años desde el diagnóstico. La mediana de tiempo hasta la transformación a LMA-s fue de 8.16 años (IC 95%: 6.05-10.27). La supervivencia libre de transformación a LMA a los 2 y 5 años fue de 86% y 73% respectivamente (Fig.7). En el análisis univariante aquellos pacientes con plaquetas $<100 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($p=<0,001$) presentaron un mayor porcentaje de transformación a LMA con respecto a los que tenían plaquetas $\geq 100 \times 10^3/\mu\text{L}$ [Supervivencia libre de transformación a LMA de 98 meses para $\geq 100 \times 10^3/\mu\text{L}$ vs 20 meses en los de $<100 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($p= <0,000$)] (Fig.8). Por el contrario, el porcentaje de pacientes que se transformó a LMA fue menor, en aquellos pacientes que habían recibido tratamiento con Lenalidomida frente a otros tratamientos [(SLT a LMA-s de 101 meses para los tratados con lenalidomida vs mediana de supervivencia no alcanzada para los de otros tratamientos vs 89 meses en los que no recibieron tratamiento respectivamente, $p=0,017$)] (tabla.11). En el análisis multivariante, únicamente la trombopenia mantuvo su impacto pronóstico independiente en la progresión a LMA-s [HR: 5,708 (IC 95%: 1,791-18,192) ($p=0,03$)] (tabla.12).

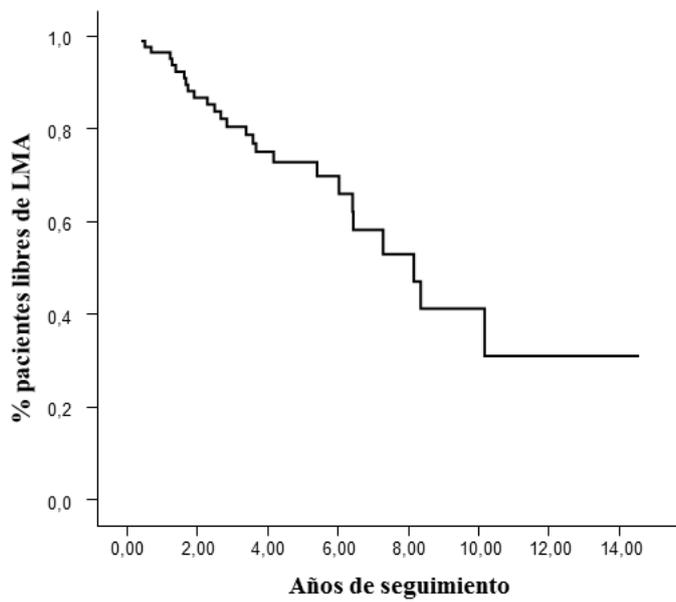


Figura 7. Supervivencia libre de transformación a LMA.

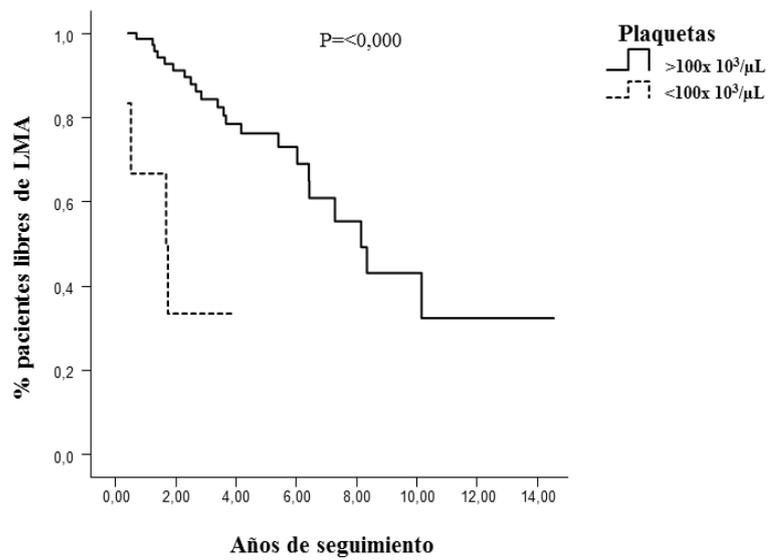


Figura 8. Supervivencia libre de transformación a LMA-s en relación con la cifra de plaquetas al diagnóstico.

Tabla 12. Análisis Multivariante

Variable	HR (95% IC)	p
Dependencia transfusional		
Hb < 9 gr /dL	3,490 (1,274-9,560)	0,015
Supervivencia Global		
Plaquetas < 100 x10 ³ /μL	3,3 (1,07-10,36)	0,038
Tratamiento: Lenalidomida	0,353 (0,129-0,963)	0,042
Epo/u otros tratamientos		ns
No recibir tratamiento		ns
Progresión a LMA-s		
Plaquetas < 100 x10 ³ /μL	5,708 (1,791-18,192)	0,003

HR: hazard ratio; IC: intervalo de confianza; ns: no significativo; Hb: hemoglobina; EPO: eritropoyetina; LMA-s: leucemia mieloblástica aguda secundaria.

DISCUSSION



4. DISCUSIÓN

Los Síndromes Mielodisplásicos son una serie heterogénea de enfermedades clonales de las células hematopoyéticas caracterizados por una hematopoyesis ineficaz, cambios displásicos en la MO, y riesgo de transformación a LMA [72]. Cerca del 50% de los casos presentan alteraciones citogenéticas y dentro de estas la más frecuente es la delección del brazo largo del cromosoma 5, la cual aparece en el 15% de los casos [73]. Sin embargo, debido a la heterogeneidad de los SMD, el pronóstico que conlleva esta alteración es variable y depende de otros factores como la presencia de alteraciones cromosómicas añadidas, el porcentaje de blastos en la MO o la dependencia de transfusión [74].

Probablemente el grupo de SMD 5q- es el mejor caracterizado desde el punto de vista patogénico, morfológico, citogenético, clínico y con un tratamiento específico, la Lenalidomida [57]. Sin embargo, aún existen muchas incógnitas en su patogenia, evolución y mecanismos de respuesta al tratamiento. En el presente trabajo hemos pretendido profundizar en el conocimiento de algunos datos clínicos pronósticos así como alguno de los mecanismos que podrían estar implicados en la respuesta a la Lenalidomida.

A pesar de ser generalmente una entidad de buen pronóstico, en los SMD con 5q- el desarrollo de la dependencia transfusional condiciona un efecto negativo en la morbimortalidad de los pacientes, hecho que ya ha sido previamente demostrado en otras publicaciones [37-39] pero en la mayoría de las series publicadas los datos provienen de series globales y no centradas en los estadios precoces de la enfermedad. No existen datos en la literatura en donde se describa cuál es la evolución natural de la anemia en los pacientes con SMD y del (5q), cuánto es el tiempo hasta la dependencia transfusional, o qué factores pueden modificarlo; por lo tanto el primer objetivo del presente trabajo ha sido intentar dar respuesta a estos interrogantes.

La primera cuestión que nos planteamos fue establecer el tiempo desde el diagnóstico hasta la aparición de la dependencia transfusional y la segunda, encontrar qué variables podrían influir en su aparición. Para ello, hemos utilizado los datos de una serie de 84 pacientes incluidos en el registro español de SMD (RESMD), con SMD y del (5q) y que eran de buen pronóstico según el actual IPSS-R.

En relación a la primera cuestión, en nuestra serie el tiempo hasta el desarrollo de la dependencia transfusional fue de 1,7 años. En el estudio del grupo Alemán la mediana de tiempo en la que sus pacientes alcanzaron la DT fue de 9.8 meses a partir del diagnóstico [75], algo menor que en nuestra serie, lo que podría justificarse porque incluye también pacientes de mayor riesgo pronóstico en comparación con nuestro estudio.

Cuando analizamos la segunda cuestión, pudimos comprobar que la única variable que mostró impacto en el desarrollo de la DT fue la concentración de hemoglobina al diagnóstico, siendo el valor de 9 g/dL el punto de corte que marcaba claramente un

mayor riesgo de desarrollo de la DT y por lo tanto la conveniencia de iniciar un tratamiento adecuado orientado a retrasar el comienzo de la transfusión de hematíes y así su impacto perjudicial sobre la morbimortalidad de estos pacientes.

Quisimos también estudiar la evolución de estos pacientes teóricamente diagnosticados en fases muy precoces de la enfermedad pues aun no tenían necesidades transfusionales. La mediana de supervivencia global de nuestra serie fue de 5,5 años similar a la observada por otros grupos (entre 6,2 años y 3,9 años) [75,76]. Estas variaciones en la supervivencia podrían ser debidas a las distintas características de los pacientes, los diferentes grupos de riesgo pronóstico y sobre todo la proporción de pacientes ya dependientes de transfusión al diagnóstico. De hecho en la primera serie solo el 58% de los casos eran dependientes de transfusión, mientras que en la segunda lo eran el 93% y el grupo de pacientes de esta publicación es el que peor supervivencia mostraba.

Cuando analizamos los factores que en esta serie de pacientes sin DT tenían impacto en la supervivencia, en el análisis multivariante las dos únicas variables que demostraron impacto en nuestra serie fueron la cifra de plaquetas y el haber recibido algún tipo de tratamiento. La primera acortando la SG pero la segunda con un impacto positivo. En relación con la primera variable, ésta también ha demostrado el impacto negativo en términos de supervivencia en otras series ya publicadas, ya sea en pacientes de bajo riesgo con del (5q) u otros SMD de bajo riesgo [77,78] La presencia de trombocitopenia podría reflejar un estadio de enfermedad más avanzada o, alternativamente, una biogénesis diferente de la enfermedad con la implicación de varios linajes de células hematopoyéticas.

La segunda variable, con impacto favorable en la supervivencia global fue el haber recibido tratamiento, beneficio que se observó sobre todo cuando se utilizó la Lenalidomida. Es ampliamente conocido que con Lenalidomida se obtienen respuestas significativas en pacientes con SMD y del (5q) y dependencia transfusional [57,79,80] tanto en términos de respuesta eritroide e independencia transfusional como en mejoría de la supervivencia global. En este sentido, las autoridades Europeas han aprobado recientemente la Lenalidomida en pacientes con SMD y del (5q) que presenten anemia y sean dependientes de transfusión. Con estos datos y nuestros resultados parece razonable pensar que podría ser beneficioso para el paciente, comenzar con este tratamiento de una forma más precoz cuando la cifra de Hb sea de 9 g/dL y antes de empezar a requerir transfusiones. Se necesitaría sin embargo un ensayo prospectivo randomizado para confirmar nuestros resultados. Dicho ensayo está llevándose a cabo dentro de los grupos Español y Francés de SMD (N° EudraCT: 2009-013619-36).

Algunos autores han demostrado en estudios previos que pacientes con SMD y del (5q) muestran menor riesgo de desarrollar LMA-s en comparación con otros subtipos de SMD [37,39,74,75,76]. En el presente estudio, el riesgo de progresión a LMA-s fue de 4,4 % y 12,7 % a los 2 y 5 años respectivamente, similar a la observada por otros investigadores [74,75]. La única característica con un impacto en el riesgo de evolución a LMA-s fue la cifra de plaquetas. Con respecto a esta variable, otros grupos también han obtenido resultados similares, esta vez en pacientes con dependencia transfusional [39, 78, 79, 81] demostrando quizás como comentábamos previamente la existencia de una enfermedad más avanzada. La presencia de trombocitopenia se ha asociado a un pronóstico adverso en otros estudios con una

población similar de pacientes con SMD y del (5q). Esta variable recientemente se ha asociado a otras características de mal pronóstico por lo que su presencia nos debe alertar sobre el mayor riesgo de estos pacientes de desarrollar LMA-s a pesar de estar incluidos en grupos pronósticos de bajo riesgo [39, 76, 78, 82].

En resumen, los resultados de este estudio demuestran que el nivel de Hb < 9 g / dL debe alertarnos sobre el rápido desarrollo de la DT y que probablemente el ofrecer un tratamiento precoz a estos pacientes sería beneficioso y podría alargar el tiempo de desarrollo de la dependencia transfusional y con ello evitar una menor supervivencia.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

De lo expuesto en el presente trabajo podemos concluir:

1. En relación a los factores clínicos y biológicos que pueden predecir el desarrollo de dependencia transfusional en pacientes con SMD y del (5q):

1a. La única variable con impacto en el desarrollo de la DT es tener una Hemoglobina al diagnóstico, con un valor de ≤ 9 g/dL.

1b. La trombocitopenia condiciona un impacto negativo en la supervivencia global y mayor riesgo de transformación a LMA-s en estos pacientes. El recibir tratamiento tiene un impacto positivo en la supervivencia global, de los pacientes.

ANEXO

7. ANEXO 1

HOJA DE RECOGIDA DE DATOS

TEMA:

FACTORES CLINICO-BIOLÓGICOS QUE INFLUYEN HASTA EL INICIO DE LA TRANSFUSION DEPENDENCIA EN LOS PACIENTES CON SINDROMES MIELODISPLÁSICOS 5 q-

“Tiempo hasta la progresión a SMD con anemia dependiente de transfusión”

HOSPITAL

N. WEB

HISTORIA CLINICA

A. DATOS AL DIAGNOSTICO (ya recogidos en la web del RESMD)

- DIAGNOSTICO FAB/OMS
- SMD PRIMARIO O SECUNDARIO
- HEMOGLOBINA g/dl AL DIAGNOSTICO
- PLAQUETAS AL DIAGNOSTICO
- CIFRA DE LEUCOCITOS
- POLIMORFONUCLEARES
- MONOCITOS
- BLASTOS EN SANGRE PERIFERICA Y EN MEDULA OSEA AL DIAGNOSTICO.
- CIFRA LDH
- CIFRA DE B2 MICROGLOBULINA
- SI ESTA SOLICITADO: VALOR DE ERITROPOYETINA

- FERRITINA

- FORMULA CROMOSOMICA AL DIAGNOSTICO

B. EVOLUCION DEL PACIENTE

Se considera dependencia transfusional: confirmación documentada de que el paciente aquejado de anemia debida al SMD precisa de transfusión de al menos 2 UCH/56 días (2 meses) con un seguimiento mínimo de 112 días (4 meses).

1. FECHA DE LA “TRANSFUSION DEPENDENCIA”

2. DATOS DEL HEMOGRAMA DE SEGUIMIENTO:

- HEMOGLOBINA
- LEUCOCITOS
- POLIMORFONUCLEARES
- PLAQUETAS

3. DATOS EN MEDULA OSEA:

- PORCENTAJE DE BLASTOS
- CLASIFICACION FAB/OMS
- CARIOTIPO

C. ACERCA DE TRATAMIENTOS

1. HA RECIBIDO TRATAMIENTO SI o NO ?

SI HA RECIBIDO:

- FECHA DE INICIO
- TIPO DE TRATAMIENTO: LENALIDOMIDA-ERITROPOYETINA-OTROS

SANGRE PERIFERICA AL TRATAMIETO

- - HEMOGLOBINA g/dl

- - PLAQUETAS
- - CIFRA DE LEUCOCITOS
- - POLIMORFONUCLEARES
- - MONOCITOS
- - BLASTOS EN SANGRE PERIFERICA

MEDULA OSEA AL TRATAMIENTO

- PORCENTAJE DE BLASTOS
- CLASIFICACION FAB/OMS
- CARIOTIPO

D. ESTADO ACTUAL DEL PACIENTE VIVO O MUERTO

E. FECHA DEL ULTIMO SEGUIMIENTO

BIBLIOGRAFIA

8. BIBLIOGRAFIA

1. Tefferi A, Vardiman JW. Myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*, 2009; 361 (19): 1872-85.
2. Rollison DE, Howlader N, Smith MT et al. Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001- 2004, using data from the NAACCR and SEER programs. *Blood*, 2008;45-52.
3. Catenacci DV, Schiller GJ. Myelodysplastic syndromes: a comprehensive review. *Blood Rev*. 2005;19:301-319.
4. Germing U, Strupp C, Kundgen A, et al. No increase in age-specific incidence of Myelodysplastic syndromes. *Haematologica*, 2004; 89 (8):905-10.
5. Ma X, Epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Am J Med*. 2012 Jul;125(7 Suppl):S2-5.
6. Reddy KS, Parsons L, Mak L,et al. Segmental amplification of 11q23 region identified by FISH in four patients with myeloid disorders: a review. *Cancer Genet Cytogenet*. 2001;126: 39.
7. Malcovati L, Della Porta MG, Pascutt C, et al. Prognostic factors and life expectancy in MDS classified according to the WHO criteria: a basic for clinical decision making. 2005; *J Clin Oncol* 23: 7594.
8. Sawada K, Sato N, Tarumi T, et al. Proliferation and differentiation of Myelodysplastic CD34+ cells in serum-free medium: response to individual colony-stimulating factors. *Br J Haematol* 1993;83:349-358.
9. Kordasti SY, Afzali B, Lim Z, et al. IL-17-producing CD4(+) T cells, pro-inflammatory cytokines and apoptosis are increased in low risk myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 2009;145:64-72.
10. Keith T, Araki Y, Ohyagi M, et al. Regulation of angiogenesis in the bone marrow of myelodysplastic syndromes transforming to overt leukaemia. *Br J Haematol* 2007;137:206- 215.

11. Ogata K, Satoh C, Tachibana M et al. Identification and hematopoietic potential of CD45- clonla cells with very immature phenotype (CD45-CD34-CD38-Lin-) in patients with myelodysplastic syndromes. *Stem Cells* 2005;23:619-630.
12. Chamuleau ME, Westers TM, van Dreunen L, et al. Immune mediated autologous cytotoxicity against hematopoietic precursor cells in patients with Myelodysplastic syndrome. *Haematologica* 2009;94:496-506.
13. Fozza C, Contini S, Galleu A, et al. Patients with myelodysplastic syndromes display several T-cell expansions which are mostly polyclonal in the CD4(+) subset and oligoclonal in the CD8(+) subset. *Exp Hematol* 2009;37:947-955.
14. Kochenderfer JN, Kobayashi S, Wieder ED, Su C, Molldrem JJ. Loss of T-lymphocyte clonal dominance in patients with myelodysplastic syndrome responsive to immunosuppression. *Blood*, 2002;100:3639-3645.
15. Schanz J, Tuchler H, Sole F, et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol* 2012; 30 (8): 820-9.
16. Nishino HT, Chang CC. Myelodisplastic syndromes: clinicopathologic features, pathobiology, and molecular pathogenesis. *Arch Pathol lab Med.* ;129:1299- 1310.
17. Esteller M. Epigenectics provides a new generation of oncogenes and tumoursupressor genes. *Br J Cancer*. 2006;94:179-183
18. Ahmad YH, Kiehl R, Papac RJ, Myelodysplastic. The clinical spectrum of 51 patients. *Cancer* 1995. 76(5):869-74.
19. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1982; 51 (2):189-99.
20. Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L.WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC, 2008.
21. Sanz GF, Sanz MA, Greenberg PL. Prognostic factors and scoring systems in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 1998; 83 (4): 358-68.
22. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenau P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997; 89 (6): 2079-88.

23. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al, Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*.2012;120(12):2454-65.
24. 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
25. Sanz G, Nomdedeu B, Such E, et al. Independent impact of iron overload and transfusion dependency on survival and leukemic evolution in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood* 2008; 112 (11): 640.
26. Della Porta MG, Malcovati L, Boveri E, Travaglino E, Pietra D, Pascutto C, et al. Clinical relevance of bone marrow fibrosis and CD34-positive cell clusters in primary Myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 2009; 27 (5): 754-62.
27. González-Porrás 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.
28. Córdoba I, González-Porrás JR, Such E, Nomdedeu B, Luno 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.
29. Friedenstein AJ, P.-S.I., Petrakova KV, Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. . *J.Embryol.Exp.Morphol*, 1966. 16: 381-390.
30. Scheres B. Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2007; 8:345-354.
31. Dominici M, Le BK, Mueller I et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8:315-317.
32. Dexter TM. Stromal cell associated haemopoiesis. *J.Cell Physiol Suppl* 1982;1:87-94.
33. Verma A, List AF. Cytokine targets in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Curr.Hematol.Rep.* 2005;4:429-435.
34. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood.* 2002;100(7):2292-2302.

35. Boultwood J, Lewis S, Wainscoat JS. The 5q-syndrome. *Blood*. 1994; 84(10):3253-60.
36. Giagounidis AA, Germing U, Wainscoat JS, The 5q- syndrome. *Hematology*. 2004 Aug; 9(4):271-7.
37. Patnaik MM, Lasho TL, Finke CM, et al. WHO-defined 'myelodysplastic syndrome with isolated del(5q)' in 88 consecutive patients: survival data, leukemic transformation rates and prevalence of JAK2, MPL and IDH mutations. *Leukemia* 2010; 24: 1283 -1289.
38. Giagounidis AA, Germing U, Aul C. Biological and prognostic significance of chromosome 5q deletions in myeloid malignancies. *Clin.Cancer Res*, 2006. 12: 5-10.
39. Giagounidis AA, Germing U, Haase S. Clinical, morphological, cytogenetic, and prognostic features of patients with myelodysplastic syndromes and del(5q) including band q31. *Leukemia*, 2004. 18: p. 113-119.
40. Jaju RJ, Jones M, Boultwood J, et al. Combined immunophenotyping and FISH identifies the involvement of B-cells in 5q- syndrome. *Genes Chromosomes Cancer*. 2000;29(3):276-280.
41. Nilsson L, Astrand-Grundstrom I, Arvidsson I, et al. Isolation and characterization of hematopoietic progenitor/stem cells in 5q-deleted myelodysplastic syndromes: evidence for involvement at the hematopoietic stem cell level. *Blood*. 2000;96(6):2012-2021.
42. Nilsson L, Eden P, Olsson E, et al. The molecular signature of MDS stem cells supports a stem-cell origin of 5q myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2007;110(8):3005-3014.
43. Ebert BL, Pretz J, Bosco J et al, Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature*. 2008 Jan 17;451 (7176):335-9.
44. Garderet L, Kobari L, Mazurier C, et al. Unimpaired terminal erythroid differentiation and preserved enucleation capacity in Myelodysplastic 5q(del) clones: a single cell study. *Haematologica*. 2010;95(3):398-405.
45. Flygare J, Karlsson S. Diamond-Blackfan anemia: erythropoiesis lost in translation. *Blood*. 2007;109(8):3152-3154.
46. Barlow JL, Drynan LF, Hewett DR, Holmes LR, Lorenzo-Abalde S, Lane AL, et al. A p53-dependent mechanism underlies macrocytic anemia in a mouse model of human 5q- syndrome. *Nat Med*. 2010; 16(1):59-66.

47. Jadersten M, Saft L, Smith A, et al. TP53 mutations in low risk myelodysplastic syndromes is associated with del(5q) predict disease progression. *J Clin Oncol*. 2011;29:1971-9.
48. Pellagatti A, Jadersten M, Forsblom AM, Cattani H, Christensson B, Emanuelsson EK, et al. Lenalidomide inhibits the malignant clone and up-regulates the SPARC gene mapping to the commonly deleted region in 5q-syndrome patients. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104(27):11406-11.
49. Starczynowski DT, Kuchenbauer F, Argiropoulos B, Sung S, Morin R, Muranyi A, et al. Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q- syndrome phenotype. *Nat Med*. 2010;16 (1):49-58.
50. Lopez-Villar O, Garcia JL, Sanchez-Guijo FM, Both expanded and uncultured mesenchymal stem cells from MDS patients are genomically abnormal, showing a specific genetic profile for the 5q- syndrome. *Leukemia*. 2009 Apr;23(4):664- 72
51. Raaijmakers MH, Mukherjee S, Guo S, et al. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukemia. *Nature*. 2010;464(7290):852- 7
52. Santamaría C, S. Muntión, and B. Rosón, et al. Impaired expression of DICER, DROSHA, SBDS and some microRNAs in mesenchymal stromal cells from Myelodysplastic syndrome patients. *Haematologica*, 2012. 97(8): 1218-24.
53. Raza A, Meyer P, Dutt D, et al. Thalidomide produces transfusion independence in long-standing refractory anemias of patients with myelodysplastic syndromes. *Blood* 2001; 98: 958-65.
54. Sokol L, List AF. Immunomodulatory therapy for myelodysplastic syndromes. *Int J Hematol* 2007; 86: 301-305
55. Ximeri M, Galanopoulos A, Klaus M, et al. Effect of lenalidomide therapy on hematopoiesis of patients with myelodysplastic syndrome associated with chromosome 5q deletion. *Haematologica*. 2010;95(3):406-414.
56. List A, M.D., Sandy Kurtin, C.N.P., M.S., Denise J. Efficacy of Lenalidomide in Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med* 2005; 352:549-557.
57. List A, Dewald G, Bennett J, Giagounidis A, Raza A, Feldman E, et al. Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *N Engl J Med*. 2006; 355(14):1456-65.

58. Kotla† V, Venumadhav Kotla1†, Swati Goel1†, al., Mechanism of action of lenalidomide in hematological malignancies. *Journal of Hematology & Oncology* 2009. 2:36.
59. Corral LG, Haslett PA, Muller GW, Chen R, Wong LM, Ocampo CJ, Patterson RT, Stirling DI, Kaplan G: Differential cytokine modulation and T cell activation by two distinct classes of thalidomide analogues that are potent inhibitors of TNF-alpha. *J Immunol* 1999, 163(1):380-6.
60. Bartlett JB, Dredge K, Dalglish AG. The evolution of thalidomide and its IMiD derivatives as anticancer agents. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(4):314-22.
61. Buesche G: Anti-Angiogenic in vivo effect of lenalidomide in MDS with del 5 q chromosome abnormality. Oral Abstrac Session ASCO 2007.
62. Wei S, Chen X, Rocha K, Epling-Burnette PK, Djeu JY, Liu Q, et al. A critical role for phosphatase haplodeficiency in the selective suppression of deletion 5q MDS by lenalidomide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009. 2: 12974-9.
63. J. J. Minguell, A. Erices, and P. Conget, "Mesenchymal stem cells," *Exp. Biol. Med.* (Maywood.), 2001, 226: 507-520.
64. S. Carrancio, N. Lopez-Holgado, F. M. Sanchez-Guijo, et al. "Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification," *Exp. Hematol.*, 2008, 36(8): 1014-1021.
65. Munemasa S, Sakai A, Kuroda Y et al. Osteoprogenitor differentiation is not affected by immunomodulatory thalidomide analogs but is promoted by low bortezomib concentration, while both agents suppress osteoclast differentiation. *Int J Oncol*. 2008 Jul;33(1):129-36.
66. Wobus M, Benath G, Ferrer RA, et al. Impact of lenalidomide on the functional properties of human mesenchymal stromal cells. *Exp Hematol*. 2012. 40(10):867-76.
67. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem*. 1987;162:156-159.
68. Van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999;13:1901-1928.

69. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc.* 1958;53: 457-481
70. Gooley TA, Leisenring W, Crowley J, Storer BE. Estimation of failure probabilities in the presence of competing risks: new representations of old estimators. *Stat Med.* 1999;18:695-706
71. Cox DR. Regression models and life-tables. *J Roy Stat Soc B.* 1972; 34:187-220
72. Corey SJ, Minden MD, Barber DL et al. Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. *Nat.Rev.Cancer* 2007;7:118-129.
73. Haase D, Germing U, Schanz J et al (2007) New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* 110:4385–4395.
74. Mallo M, Cervera J, Schanz J et al. Impact of adjunct cytogenetic abnormalities for prognostic stratification in patients with myelodysplastic syndrome and deletion 5q. *Leukemia* 2011. 25:110–120.
75. Germing U, Lauseker M, Hildebrandt B et al. Survival, prognostic factors and rates of leukemic transformation in 381 untreated patients with MDS and del(5q): a multicenter study. *Leukemia* 2012.26:1286–1292.
76. Mathew P, Tefferi A, Dewald GW, et al. The 5q- syndrome: A single-institution study of 43 consecutive patients. *Blood.* 1993;81:1040-1045.
77. Kantarjian H, Fenaux P, Sekeres MA, et al. Safety and efficacy of romiplostim in patients with lower-risk Myelodysplastic syndrome and thrombocytopenia. *J Clin Oncol.* 2010;28 (3):437-444.
78. Garcia-Manero G, Shan J, Faderl S, et al. A prognostic score for patients with lower risk myelodysplastic syndrome. *Leukemia.* 2008;22:538-543.
79. Fenaux P, Giagounidis A, Selleslag D, et al. A randomized phase 3 study of lenalidomide versus placebo in RBC transfusiondependent patients with Low-/Intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes with del 5q. *Blood* 2011;118:3765-3776.
80. Raza A, Reeves JA, Feldman EJ, et al. Phase 2 study of lenalidomide in transfusion-dependent, low-risk, and intermediate-1 risk myelodysplastic syndromes with karyotypes other than deletion 5q. *Blood* 2008;111(1):86-93.

81. Mallo M, Mónica del Rey, Mariam Ibañez, et al. Response to lenalidomide in myelodysplastic syndromes with del(5q): influence of cytogenetics and mutations. *Br J Haematol.* 2013 Jul;162(1):74-86.
82. Jonasova A, Cermak J, Vondrakova J et al. Thrombocytopenia at diagnosis as important negative prognostic marker in isolated 5q- MDS (IPSS low and intermediate-1). *Leuk Res.* 2012;36(12):e222–e224.
83. Fenaux P. Myelodysplastic syndromes: From pathogenesis and prognosis to treatment. *Semin.Hematol.* 2004;41:6-12.
84. Mufti GJ. Pathobiology, classification, and diagnosis of myelodysplastic syndrome. *Best.Pract.Res.Clin.Haematol.* 2004;17:543-557.
85. Flores-Figueroa E, Arana-Trejo RM, Gutierrez-Espindola et al. Mesenchymal stem cells in myelodysplastic syndromes: phenotypic and cytogenetic characterization. *Leuk.Res.* 2005;29:215-224.
86. Deeg HJ. Marrow stroma in MDS: culprit or bystander? *Leuk Res.*2002;26(7):687–8.
87. Omatsu Y, Sugiyama T, Kohara H, Kondoh G, Fujii N, Kohno K, et al. The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity.* 2010;33(3):387–99.
88. Lo Celso C, Scadden DT. The hematopoietic stem cell niche at a glance. *JCell Sci.* 2011;124:3529-35.
89. Zhao ZG, Xu W, Yu HP, Fang BL, Wu SH, Li F, et al. Functional characteristics of mesenchymal stem cells derived from bone marrow of patients with Myelodysplastic syndromes. *Cancer Lett.* 2012; 317; 2:136-43.
90. Boultonwood J, Fidler C, Strickson AJ et al. Narrowing and genomic annotation of the commonly deleted region of the 5q syndrome. 2002. *Blood* 99:4638–4641.
91. Dutt S, Narla A, Lin K et al. Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. *Blood* 2011. 117:2567–2576.
92. Matsuoka A, Tochigi A, Kishimoto M et al. 2010. Lenalidomide induces cell death in an MDS-derived cell line with deletion of chromosome 5q by inhibition of cytokinesis. *Leukemia*, 2010. 24:748–755.

93. Peng J, Kitchen SM, West RA, et al. Myeloproliferative defects following targeting of the Drf1 gene encoding the mammalian diaphanous related formin mDia1. *Cancer Res* 2007, 67:7565–7571.
94. Sportoletti P, Grisendi S, Majid SM et al. Npm1 is a haploinsufficient suppressor of myeloid and lymphoid malignancies in the mouse. *Blood* 2008 111:3859–3862.
95. Kulasekararaj AG, Smith AE, Mian SA et al. TP53 mutations in myelodysplastic syndrome are strongly correlated with aberrations of chromosome 5, and correlate with adverse prognosis. 2013. *Br J Haematol* 160:660–672.
96. Kaneko H, Misawa S, Horiike S, Nakai H, Kashima K et al. TP53 mutations emerge at early phase of myelodysplastic syndrome and are associated with complex chromosomal abnormalities. *Blood*, 1995. 85:2189–2193.
97. Jerez A, Gondek LP, Jankowska AM et al. Topography, clinical, and genomic correlates of 5q myeloid malignancies revisited. *J Clin Oncol* 2012. 30:1343-1349.
98. Venner CP, Wegrzyn WJ, Nevill TJ et al (2012) Correlation of clinical response and response duration with miR-145 induction by lenalidomide in CD34+ cells from patients with del(5q) Myelodysplastic syndrome *Haematologica*, 2012; 98(3):409–413.
99. Narla A, Dutt S, McAuley JR, et al. Dexamethasone and lenalidomide have distinct functional effects on erythropoiesis. *Blood*. 2011;118:2296–2304.
100. Ruben A, Ferrer, Manja Wobus, Catrin List, et al. Mesenchymal stromal cells from patients with myelodysplastic syndrome display distinct functional alterations that are modulated by lenalidomide. *Haematologica* 2013;[Epub ahead of print].
101. Broudy VC, Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood*, 1997; 90:1345–64.
102. Stirewalt DL, Mhyre AJ, Marcondes M et al. Tumour necrosis factor-induced gene expression in human marrow stroma: clues to the pathophysiology of MDS? *Br.J.Haematol.* 2008;140:444-453.
103. Marcondes AM, Mhyre AJ, Stirewalt DL et al. Dysregulation of IL-32 in myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia modulates apoptosis and impairs NK function. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2008;105:2865-2870.

104. Vargova, K, Curik, N, Burda P, et al. "MYB transcriptionally regulates the miR- 155 host gene in chronic lymphocytic leukemia". *Blood*, 2011; 117 (14): 3816–3825.
105. Smallwood PM, Munoz-Sanjuan I, Tong P, et al. "Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors: new members of the FGF family implicated in nervous system development".1996. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 93(18): 9850–7.
106. Michibata H, Yanaka N, Kanoh Y, et al. "Human Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphodiesterase PDE1A: novel splice variants, their specific expression, genomic organization, and chromosomal localization". 2001. *Biochim Biophys Acta* 1517 (2): 278–87.
107. Fiedler Ulrike, Krissl Tanja, Koidl Stefanie, et al. "Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 share the same binding domains in the Tie-2 receptor involving the first Ig-like loop and the epidermal growth factor-like repeats".. *J. Biol. Chem.* 2003; 278 (3): 1721–7.
108. Lu J, Guo S, Ebert BL, et al. Micro-RNA-mediated control of cell fate in megakaryocyte-erythrocyte progenitors. *Dev Cell.* 2008; 14(6):843-53.
109. Felli N, Fontana L, Pelosi E, et al. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down modulation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(50):18081-6.
110. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation.*Science.* 2004; 303:83–86
111. Oliva EN, Cuzzola M, Nobile F, et al. Changes in RPS14 expression levels during lenalidomide treatment in Low and Intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes with chromosome 5q deletion. *Eur J Haematol.* 2010 Sep;85(3):2315.