

Caracterización biológica de hemopatías malignas mieloides frente a su contrapartida normal: relación con las vías de transformación maligna.

Carlos María Fernández Giménez

Directores:

Dr. Alberto Orfao

Dr. Sergio Matarraz

TESIS DOCTORAL 2016



**VNIVERSIDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL





**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



DEPARTAMENTO D MEDICINA

D. Alberto Orfão de Matos Correia e Vale, Doctor en Medicina y Cirugía y Catedrático del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que el trabajo doctoral realizado en formato de compendio de artículos/publicaciones bajo mi dirección por Dña. Carlos María Fernández Giménez y titulado “Caracterización biológica de hemopatías malignas mieloides frente a su contrapartida normal: relación con las vías de transformación maligna”, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmo la presente certificación en Salamanca a 1 de septiembre del año 2016.

Fdo.: Dr. Alberto Orfão de Matos



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



DEPARTAMENTO D MEDICINA

D. Sergio Matarraz Sudón, Doctor en Medicina por la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que el trabajo doctoral realizado en formato de compendio de artículos/publicaciones bajo mi dirección por Dña. Carlos María Fernández Giménez y titulado “Caracterización biológica de hemopatías malignas mieloides frente a su contrapartida normal: relación con las vías de transformación maligna”, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmo la presente certificación en Salamanca a 1 de septiembre del año 2016.

Fdo.: Dr. Sergio Matarraz Sudón

La presente tesis doctoral incluye tres trabajos originales publicados en revistas científicas indexadas en *Science Citation Reports*, y un artículo original sometido a revisión en la revista *Blood*, según se detalla a continuación:

1. Cell-cycle distribution of different cell compartments in normal versus reactive bone marrow: a frame of reference for the study of dysplastic hematopoiesis.

Sergio Matarraz,¹ Carlos Fernandez,¹ Manuel Albors,² Cristina Teodosio,¹ Antonio López,¹ María Jara-Acevedo,¹ Carlos Cervero,³ Gonzalo Caballero,⁴ Oliver Gutierrez,⁵, Alberto Orfao¹
Cytometry B Clin Cytom. 2011 Nov;80(6):354-61. doi: 10.1002/cyto.b.20605. Epub 2011 Jun 2

2. The proliferation index of specific bone marrow cell compartments from myelodysplastic syndromes is associated with the diagnostic and patient outcome.

Matarraz, S¹, Teodosio, C¹, Fernandez, C.¹ Albors, M², Jara-Acevedo, M.¹, Lopez, A¹. Gonzalez-Gonzalez, M.¹, Gutierrez, M. L.¹, Flores-Montero, J.¹, Cerveró, C.³, Pizarro-Perea, M.⁶, Paz Garrastazul, M.⁷, Caballero, G.⁴, Gutierrez, O.⁵ Mendez, G. D.⁸, Gonzalez-Silva M.⁹, Laranjeira, P.¹, Orfao, A.¹
PLoS One. 2012;7(8): e44321. doi: 10.1371/journal.pone.0044321. Epub 2012 Aug 31.

3. Newly diagnosed adult AML and MPAL patients frequently show clonal residual hematopoiesis.

C Fernandez[†], MC Santos-Silva¹⁰, A López¹, S Matarraz¹, M Jara-Acevedo¹, J Ciudad¹, ML Gutierrez¹, ML Sánchez¹, C Salvador-Osuna¹¹, MJ Berrueto¹², JA Díaz-Arias¹³, AM Palomo-Hernández¹⁴, E Colado¹⁵, N González¹⁶, D Gallardo¹⁷, A Asensio¹⁸, R García-Sánchez¹⁹, R Saldaña²⁰, C Cerveró³, A Carboné²¹, O Gutierrez⁵ y A Orfao¹
Leukemia. 2013 Nov;27(11):2149-56. doi: 10.1038/leu.2013.109. Epub 2013 Apr 12.

4. Clinical impact of oncogenetic profiles in systemic mastocytosis with an associated hematological non-mast cell disease.

Carlos Fernández¹, Cristina Teodosio²², Sergio Matarraz¹, Antonio López¹, María Jara-Acevedo¹, Andrea Mayado¹ Ivan Álvarez-Twose²³, Laura Sánchez-Muñoz²³, Andrés García-Montero¹, Carolina Caldas¹, María Laura Gutierrez¹ Paloma Bárcena¹, Marina Díaz-Beyá^{24,25,26}, Jordi Esteve^{24,25,26}, Lourdes Florensa²⁷, Enrique Colado¹⁵, Álvaro Lorenzo⁶, Mar Luis-Hidalgo²⁸, Leonor Senent²⁹, Nerea Uresandi³⁰, Carlos Salvador Osuna¹¹, Matxalen Olivares³¹, José Mario Morgado⁴, Luis Escribano⁴, Alberto Orfao¹
Submission code: BLOOD/2016/699116

¹Servicio General de Citometría (NUCLEUS), Centro de Investigación del Cáncer – Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC-CSIC/USAL) and Instituto Biosanitario de Salamanca (IBSAL) y Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, ²Servicio de Hematología, Hospital Juan Canalejo, La Coruña, ³Servicio de Hematología, Hospital Virgen de la Luz, Cuenca, ⁴Servicio de Hematología, Hospital San Jorge, Huesca, ⁵Servicio de Hematología, Hospital Rio Hortega, Valladolid, ⁶Servicio de Hematología, Hospital Lucus Augusti, Lugo, ⁷Servicio de Hematología, Hospital Punta de Europa, Algeciras, ⁸Servicio de Hematología, Hospital de Jerez de la Frontera, Cádiz, ⁹Servicio de Hematología, Hospital La Línea, Cádiz, ¹⁰Laboratorio de Oncología Experimental e Hemopatias do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil; ¹¹Servicio de Hematología, Hospital Miguel Servet, Zaragoza, ¹²Hospital Punta de Europa, Algeciras, ¹³Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, ¹⁴Hospital Xeral Calde, Lugo, ¹⁵Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo ¹⁶Hospital Obispo Polanco, Teruel, ¹⁷Servicio de Hematología Institut Catala` d'Oncologia, Hospital Josep Trueta, Girona, ¹⁸Hospital San Jorge, Huesca, ¹⁹Hospital Virgen de la Victoria de Málaga, ²⁰Hospital de Jerez de la Frontera, Jerez de la Frontera, Cádiz, ²¹Unidad de Oncopediatría, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, ²²Department of Immunohematology and Blood Transfusion, Leiden University Medical Center, Leiden, Holanda; ²³Instituto de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha, Hospital Virgen del Valle, Toledo, ²⁴Instituto de investigación de la Leucemia Josep Carreras, Campus Clínic-Universidad de Barcelona, ²⁵Departamento de Hematología, Hospital Clínic, Barcelona, ²⁶Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona, ²⁷Laboratori de Citologia Hematològica. Servei de Patologia, H. del Mar. Barcelona, ²⁸Servicio de Hematología, Hospital Arnau de Vilanova, Valencia, ²⁹Servicio de Hematología, Hospital Universitari i Politècnic la Fe, Valencia, ³⁰Servicio de Hematología, Hospital de Donostia, Guipuzkoa, ³¹Servicio de Hematología, Hospital de Galdakao, Guipuzkoa.

*A mi esposa, a María, a Juan Pablo y a los
otros dos angelitos que están allí arriba*

"Nada te turbe, nada te espante, quien a Dios tiene, nada le falte;
la paciencia todo lo alcanza. Sólo Dios basta"

Santa Teresa de Jesús

Agradecimientos

La vida pasa muy deprisa, más incluso de lo que uno quisiera. Es entonces, cuando al echar la vista atrás, se valora aún más si cabe todo aquello que a uno le sucede, así sean acontecimientos que nos hicieron felices, como aquellos que nos hicieron sufrir e incluso llorar. Pero sin duda, lo que uno aprende es que todo sucede por alguna razón, y aunque paradójicamente no suele estar al alcance inmediato de la razón, todo ello nos hace crecer como personas. La gratitud es algo que nos hace crecer día a día como científicos y como personas de bien.

Por eso, quiero empezar mis agradecimientos de manera cronológica. Apenas recién licenciado, en mis primeros días como médico residente en Bioquímica Clínica, Rosana, Toño y Juana, hicieron que aquella tarde de septiembre del año 2000 no fuera una tarde cualquiera, sino el principio de esta apasionante aventura. Se abrió entonces un sendero de puntos y colores que con los años me han conducido hasta este lugar y este momento. Gracias a los tres, que a través de aquel curso de Citometría básica hicisteis que mi vida diera un giro de 180 grados. Así, poco a poco, fui conociendo a mis futuros compañeros, algunos de los cuales todavía siguen siendo parte de mi familia científica y humana. Durante los primeros años, en el hospital tuve la oportunidad de compartir ciencia y trabajo con Juan, Sandra Quijano, Josito, Chema y un poquito después Wendy. Gracias a todos vosotros por vuestra amistad eterna, consejos, confianzas y tantas cosas que no cabrían en estas páginas. También Gloria, Isabel, Maite, incombustibles ante vuestros citómetros, siempre aportando vida y alegría al trabajo cotidiano. Gracias a Belén Vidriales por su paciencia, a Noemí, Nacho y a Alejandro, por su valentía y perseverancia, vuestras sonrisas y buenas palabras siempre conmigo. Poco a poco, el grupo fue creciendo y entró savia nueva al laboratorio; se incorporaron personas de extraordinaria valía humana y técnica como Miriam, Marian, Cristina y finalmente a nuestra última Miriam a las que tengo que agradecer su buen hacer y dedicación en la ardua tarea de la preparación de las muestras y mostrarles mi gratitud también por enseñarme a caminar delante del citómetro. Gracias a mis compañeros entonces del CIC, muchos ahora en el I+D+I. Gracias a María Almeida por su simpatía y siempre buenos consejos. Andrés y Arancha, gracias por vuestra amistad, consejos personales y profesionales; gracias por acortar vuestra luna de miel para acudir a nuestra boda y en esta última etapa de mi tesis doctoral, gracias por vuestros ánimos y apoyo. Muchas gracias también a Andrea, Paula que, a pesar de ser tan distintas, todavía mi cerebro se empeña en confundiros, tal vez por vuestra simpatía y amabilidad siempre conmigo. Gracias Manuel por tus consejos, amistad y todos los ratos que hemos pasado juntos y con nuestras respectivas familias. También agradecer a Guillermo su profesionalidad y eficiencia, a Quentin, por su inagotable sonrisa, cambios de look y originalidad que me han permitido conocer a fondo, las entrañas de “nuestro juguete”, versión tras versión; a Carmen, que siempre ha tenido conmigo una sonrisa en los labios y una palabra de ánimo; a María Gonzáles por su alegría, siempre con una buena cara para mí, y a María Campos, por

su ternura, su simpatía sin límites, y su enorme corazón. Un recuerdo agradecido también para Cristina Teodosio, por todo lo que me enseñó dentro y fuera del laboratorio, por su simpatía y entrega generosa. A mis compañeros más jóvenes del I+D+I, con los que tanto he compartido durante estos dos últimos años: Lourdes, María Jara y Laura que, junto con Juan y María G., supimos sufrir y apretar los dientes para alcanzar la meta soñada y casi siempre, con buen humor. Gracias Daniela por tu sentido del humor, tu amabilidad y simpatía, e incluso por organizar aquel partido de baloncesto tan especial, que nos permitió conocernos un poquito más entre todos los “pre” y “post” doc. y estrechar más nuestros lazos. A Nacho y a Elena, gracias por vuestra delicadeza conmigo, por estar siempre pendientes de que el ruido y la temperatura no fueran obstáculo para mantener la concentración por las mañanas, las tardes y muchas noches. Gracias Susana por tu comprensión y colaboración durante tantos años. A Noelia, gracias porque siempre me animaste, incluso cuando tus condiciones de salud no fueran las mejores. A Alba y a Luz Alba, porque a pesar de estar a caballo entre el hospital y el I+D+I, siempre también estabais ahí, con una palabra de apoyo y cariño. A Martín, por tus consejos respecto a la tesis y tu colaboración con la organización de la docencia. Gracias Javi y Carolina, los chicos más “moleculares” junto con María Jara y Noelia, por vuestros ánimos, simpatía y colaboración en todo lo que pude necesitar. Gracias a Sheila por tu disposición y colaboración docente cuando alguien se proponía aprender aquello que muchos llamamos “*sorting*” (aunque no tenga nada que ver con un sorteo), igual que Mari Luz, en el CIC, y de eso ya han pasado años e igual que Paloma, que además junto con Felipe os atrevisteis a volar unos miles de kilómetros para estar con nosotros en nuestra boda, y junto con el resto de los ya mencionados, nos regalasteis vuestra presencia y amistad en el día más importante de nuestra vida como matrimonio. Gracias también a Virginia y a Laura por vuestra paciencia conmigo, especialmente en los últimos meses, sobre todo a la hora de aconsejarme y buscar la mejor manera de representar los datos, las figuras, las tablas, y hacer que la búsqueda entre millones y millones de hojas de papel fuera un poquito más amena y eficaz; gracias además por recibir siempre a la gente que deseaba aprender FISH con una sonrisa en los labios, aunque tuvierais mucho trabajo.

Finalmente, en este apartado no quisiera olvidarme de Julia Almeida: gracias por tu apoyo y comprensión en los mejores y peores momentos, siempre prudente y dispuesta a ayudarme en todo aquello que necesitara, y por confiar en mi capacidad docente incluso en temas de inmunohistoquímica. A Sergio, muchas gracias por todo lo que me has demostrado en todos estos años, más allá de tu simpatía; tanto en lo humano como en lo profesional, has demostrado tener un corazón y una inteligencia extraordinarios. Juntos nos tocó aprender a dirigir y ser dirigido, a colaborar mutuamente en el desarrollo de nuestras capacidades intelectuales y humanas, algo que creo hemos conseguido, si bien aún nos queda mucho camino por recorrer, que seguro será apasionante. Por último, agradecer al Dr. Alberto Orfao, el primero que confió en mí como persona y como profesional. Gracias por abrirme las puertas de tu laboratorio, por recibirme y enseñarme todo lo que sé; porque tuve muchos profesores, pero

muy pocos maestros de verdad, capaces de transmitir mucho más que puro conocimiento. Tú también me enseñaste a ser mejor como persona, a crecer intelectualmente y más aún, me hiciste progresar y prestar todavía más cuidado en el desarrollo de las cualidades humanas. Me enseñaste a enseñar y a desarrollar cualidades nuevas para mí. Me demostraste ser un extraordinario científico, pero aun una mejor persona. Por tu confianza, me permitiste desarrollar una labor docente privilegiada y siempre al servicio de los pacientes y de sus familias: más de 600 profesionales de todos los continentes (menos Antártida), a los que me diste la oportunidad de enseñar y de los que hoy me siento orgulloso. Si a todos ellos pude enseñarles algo, de lo que sí estoy seguro es que de cada uno de ellos recibí mucho, tanto en el aspecto científico como en el humano y esto es uno de los mejores regalos que llevaré siempre en mi corazón. Cada uno, en mayor o menor medida, forman parte de mi vida. Gracias también a Valentina, que tanto ha hecho por mí y mi familia. Gracias por tu sonrisa eterna, tus pizzas, tu alegría y tu corazón generoso que no conoce límites.

En el ámbito más personal, no podría dejar de agradecer en esta vida, ni en las siguientes, todo lo que mis padres han hecho por mí. Me enseñasteis a luchar, a vivir, a valorar el trabajo y la familia. Os debo todo lo que soy y estoy orgulloso de teneros como padres. Gracias por vuestros desvelos, vuestro apoyo incondicional en todo. Gracias Alfredo, mi querido hermano, por tu ejemplo, tu cariño, tantos y tantos ratos juntos vividos. Gracias por tu ejemplo de vocación, que tan importante ha sido para encontrar la mía, gracias por tus rezos e insistencia que, como hermano mayor, ha servido para tener en ti un modelo a seguir, el mejor de todos. Sin vosotros, todo hubiera sido muchísimo más difícil.

Mi querida y amada Basia, sin ti, nada de esto hubiera sido posible. Me enseñaste lo más importante en esta vida, que es amar y entregarse hasta las últimas consecuencias. Gracias por confiar en mí, por demostrarme tu amor en las buenas y en las malas; gracias por tu apoyo incondicional y tu sacrificio, especialmente durante estos dos últimos años, en los que aceptaste el reto de estar separados tanto tiempo y sola con los niños. Fuimos capaces de estar más unidos que nunca y sacar a la familia adelante y sólo así se pudo lograr el objetivo de finalizar este trabajo de tesis doctoral. Gracias por ser mi compañera más fiel, la mejor esposa y la madre de nuestros dos angelitos, María y Juan Pablo; como os prometí, acabé el libro por y para vosotros tres. Fueron muchas horas, muchos días, muchos meses sin vosotros, dedicado sólo a este proyecto y vosotros lo supisteis entender y me apoyasteis. Gracias por vuestras sonrisas, que curaban todo dolor y por vuestras visitas furtivas de las mañanas de los sábados al I+D+I, que me llenaban de fuerza. Sois la mejor familia que he podido tener. Así naciera mil veces, mil veces os elegiría. Me siento enormemente gratificado por vuestra existencia. Cuando ya no podía más, vuestra sola presencia y sonrisas hacían que sacara las fuerzas, para que un día estuvierais orgullosos de papá.

Y finalmente, gracias a Dios, principio y fin de mi existencia, al que le debo todo lo que soy, todo lo que

de Él he recibido gratuitamente; mi familia, mis amigos mis compañeros y mi vocación. Gracias por no abandonarme en los momentos de total desencanto, de amargura, de desesperanza. Tu sola presencia, Tu Palabra, Tu imagen llenaron y transformaron aquellos instantes en entrega y confianza, con el fin de servir, a través de este trabajo a todos aquellos que sufren la enfermedad con miedo, dolor y tristeza. Ojalá que este trabajo sirva para mejorar el abordaje terapéutico y la calidad de vida de los que la padecen.

Índice.

Glosario de abreviaturas.	3
CAPITULO I. Introducción	9
1.- La hematopoyesis.	11
1.1.- Localización de la hematopoyesis en las primeras etapas del desarrollo.	11
1.2.- Regulación de la hematopoyesis.	14
1.3.- El nicho hematopoyético.	15
1.4.- Estadios iniciales de diferenciación de la célula <i>stem</i> hematopoyética.	19
1.5.- Diferenciación hematopoyética.	20
1.5.1.- Diferenciación mieloide.	23
1.5.1.1.- Diferenciación a línea granulocítica y monocítica	25
1.5.1.2.- Diferenciación a granulocito eosinófilo, granulocito basófilo y mastocito.	27
1.5.1.3.- Diferenciación eritroide.	28
1.5.1.4.- Diferenciación megacariocítica	29
1.5.2.- Diferenciación a célula dendrítica.	30
1.5.3.- Diferenciación a líneas celulares linfoides.	32
1.6.- Proliferación celular durante la hematopoyesis.	34
2.- Hematopoyesis clonal.	35
2.1.-Hematopoyesis clonal de potencial indeterminado (CHIP) y otras hemopatías mieloides pre-malignas.	38
2.2.- Neoplasias de la célula <i>stem</i> hematopoyética.	41
2.2.1.- Hemopatías malignas mieloides.	41
2.2.1.1.- Síndromes mielodisplásicos (SMD).	43
2.2.1.1.1.- Características morfológicas de las células tumorales en los SMD.	44
2.2.1.1.2.- Características genéticas y moleculares de las células tumorales en los SMD.	45
2.2.1.1.3.- Características fenotípicas de las células tumorales en los SMD.	49
2.2.1.1.4.- Diagnóstico de los SMD.	52
2.2.1.1.5.- Clasificación (pronóstica) de los SMD.	54
2.2.1.2.- Neoplasias Mieloproliferativas (NMP).	57
2.2.1.2.1.-Características genéticas y moleculares de las células tumorales de las NMP.	58
2.2.1.2.2- Características fenotípicas de las células tumorales de las NMP.	59
2.2.1.3.- Síndromes mielodisplásicos/mieloproliferativos (SMD/NMP).	59
2.2.1.3.1.- Características morfológicas de las células tumorales de la LMMC.	60
2.2.1.3.2.- Características genéticas y moleculares de las células tumorales de la LMMC.	60
2.2.1.3.3.- Características fenotípicas de las células tumorales de la LMMC.	60
2.2.1.4.- Leucemia mieloide aguda (LMA).	61
2.2.1.4.1.- Características morfológicas de las células tumorales de la LMA.	62
2.2.1.4.2.- Características genéticas y moleculares de las células tumorales de la LMA	62
2.2.1.4.3.- Características inmunofenotípicas de la LMA.	66
2.2.1.4.4.- Clasificación de la LMA	67

3.- Mastocitosis sistémica.	72
3.1.- Diagnóstico de mastocitosis sistémica.	73
3.2.- Variantes de mastocitosis sistémica.	74
3.2.1.- Mastocitosis sistémica indolente (MSI).	74
3.2.2.- Mastocitosis sistémica agresiva (MSA).	76
3.2.3.- Mastocitosis sistémica asociada a otra hemopatía (MS-AHN).	76
3.2.4.- Leucemia de mastocitos (MCL).	77
3.2.5.- Variantes de mastocitosis sistémica bien diferenciada (WDSM).	78
3.2.6.- Sarcoma de mastocitos y mastocitoma extracutáneo.	78
3.3.- Evolución clínica y pronóstico de la mastocitosis sistémica.	79
CAPITULO II. Hipótesis de trabajo y objetivos.	83
CAPITULO III. Material, métodos y resultados.	89
ARTÍCULO 1:	91
“Distribución de los diferentes compartimentos celulares de médula ósea normal versus reactiva a lo largo de las distintas fases del ciclo celular: un marco de referencia para el estudio de la hematopoyesis displásica.”	
ARTÍCULO 2:	101
“El índice de proliferación de algunos compartimentos celulares de médula ósea de pacientes con síndrome mielodisplásico se asocia con el subtipo diagnóstico y la evolución de la enfermedad.”	
ARTÍCULO 3:	115
“La leucemia mieloide aguda (LMA) “ <i>de novo</i> ” y la leucemia aguda de fenotipo mixto (MPAL) del adulto con frecuencia se asocian a la presencia de una hematopoyesis residual clonal, al diagnóstico.”	
ARTÍCULO 4:	125
“Impacto clínico de los perfiles oncogénicos presentes en mastocitosis sistémica asociada a otra hemopatía clonal.”	
CAPITULO IV. Discusión.	161
CAPITULO V. Conclusiones.	179
Bibliografía.	185

Glosario de abreviaturas.

A

ABL1: ABL Proto-Oncogene 1
ADN: ácido desoxirribonucleico
AGM: aorta-gonado-mesonefro
ALX1: ALX Homeobox-1
Ang-1: angiopoyetina-1
ARN: ácido ribonucleico
ARSA-T: anemia refractaria con sideroblastos en anillo y trombocitosis
ASXL1: additional sex combs like-1
ATRA: ácido trans-retinoico

B

BCL2: B-cell lymphoma 2
BCOR: BCL6 Corepressor
BCR: breakpoint cluster region
BFU-E: unidades formadoras de "brotes" eritroides
BMP: proteína morfogénica del hueso
BMPEo: proteína básica principal de eosinófilo
BRAF: B-Raf proto-oncogene, Serine/Threonine Kinase

C

CALR: calreticulina
CAR: célula reticular con abundante expresión de CXCL12
CBF: core binding factor
CBFB: core-binding factor, beta subunit
CCND1: ciclina D1
CCUS: citopenia clonal de significado incierto
CD: célula dendrítica
CDc: célula dendrítica clásica
CDp: célula dendrítica plasmocitoide
CDK: quinasa dependiente de ciclina
CEBPA: CCAAT/enhancer binding protein alpha
CFU-E: unidades formadoras de colonias eritroides
CFU-G: unidades formadoras de colonias granulocíticas
CFU-GM: unidades formadoras de colonias granulomonocíticas

CFU-M: unidades formadoras de colonias monocíticas

CHIC2: Cysteine Rich Hydrophobic Domain-2

CHIP: hematopoyesis clonal de significado indeterminado

CHEP: hematopoyesis clonal de potencial clínico evidente

CMF: citometría de flujo

CPA: célula presentadora de antígeno

CPH: célula progenitora hematopoyética

CPreH: célula precursora hematopoyética

CSF: factor estimulante de colonias

CSH: célula stem hematopoyética

D

DEK: DEK proto-oncogene

DNMT3A: DNA (Cytosine-5-)-methyltransferase-3-alpha

E

ELP: early lymphoid progenitor

EoP: peroxidasa de eosinófilo

EPO: eritropoyetina

F

FAB: clasificación franco-americano-británica

FcεRI: receptor de alta afinidad para la IgE

FGF: factor de crecimiento de fibroblastos

FGFR1: factor de crecimiento de fibroblastos (receptor-1)

FIP1L1: factor interacting with PAPOLA And CPSF1

FISH: hibridación in situ fluorescente.

FLT3-ITD: Fms related tyrosine kinase-3 con duplicación interna en tándem

G

G-CSF: factor estimulante de colonias granulocíticas

GM-CSF: factor estimulante de colonias granulomonocíticas

GMSI: gammapatía monoclonal de significado incierto

GNAS: GNAS complex locus

H

Hb: hemoglobina

HDAC2: histone deacetylase-2
HIF-1 α : hypoxia inducible factor-1 (subunidad alfa)
HLH: helixloop-helix
HPN: hemoglobinuria paroxística nocturna
HRAS: harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
HUMARA: human androgen receptor assay.

I

ICUS: citopenia idiopática de significado incierto
IDH1: Isocitrato Deshidrogenasa (NADP(+))-1, citosólico
IDH2: Isocitrato Deshidrogenasa (NADP(+))-2, mitocondrial
IDUS: displasia idiopática de significado incierto
IFN: interferón
IFN- β : interferón-beta
Ig: inmunoglobulina
IGH: immunoglobulin heavy locus
IL: interleucina
IPSS: international prognostic scoring system
IPSS-R: revised international prognostic scoring system

J

JAK2: Janus kinasa-2

K

KIT: *KIT* proto-oncogene receptor tyrosine kinase
KMT2A: lisina (K) específica metil transferasa
KRAS: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

L

LB: linfoma de Burkitt
LCE: leucemia crónica de eosinófilos
LCM: linfoma de células del manto
LCN: leucemia crónica de neutrófilos
LDH: lactato deshidrogenasa.
LEC/SHE: leucemia eosinofílica crónica/síndrome hipereosinofílico
LF: linfoma folicular
LLA-B: leucemia linfoblástica aguda de precursores de célula B

LMA: leucemia mieloide aguda
LMA-t: leucemia mieloide aguda asociada a (quimio)terapia
LMC: leucemia mieloide crónica
LMCa: leucemia mieloide crónica atípica
LMMC: leucemia mielomonocítica crónica
LMMJ: leucemia mielomonocítica juvenil
LPA: leucemia promielocítica aguda
LT: linfotóxina
LT-CSH: célula stem hematopoyética "long-term"

M

M-CSF: factor estimulante de colonias monocíticas
MBL: linfocitosis B monoclonal
MCAM: molécula de adhesión de célula mesenquimal
MC: mastocitosis cutánea
MCD: mastocitosis cutánea difusa
MCMP: mastocitosis cutánea maculopapular
MCL: leucemia de mastocitos
MECOM: MDS1 and EVI1 complex locus
Meg-BFU: unidades formadoras de brotes megacariocíticos
Meg-CFC: células formadoras de colonias megacariocíticas
MFP: mielofibrosis primaria
MIP-1 α : proteína inflamatoria de macrófagos-1 α
MLL: myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia
MO: médula ósea
MPL: MPL proto-oncogene, thrombopoietin receptor
MPO: mieloperoxidasa citoplasmática
MSC célula *stem* mesenquimal
MS: mastocitosis sistémica
MRC: myelodysplasia related changes
MSIs+: mastocitosis sistémica indolente con lesión cutánea
MSIs-: mastocitosis sistémica indolente sin lesión cutánea
MS-AHNMD: systemic mastocytosis with an associated clonal hematological non-mast cell lineage disease
MS-AHN: systemic mastocytosis with an associated hematologic neoplasm
MSS: mastocitosis quiescente o "smoldering"

MYH11: myosin heavy chain 11, (músculo liso)

N

NGFR: factor de crecimiento neuronal de baja afinidad

NGS: next generation sequencing

NK: célula natural killer

NMP: neoplasia mieloproliferativa

NM-t: neoplasia mielóide asociado a (quimio)terapia

NPM1: nucleofosmina-1

NRAS: neuroblastoma RAS viral oncogene homolog

NUP214: nucleoporina de 214 kDa

O

OMS: Organización Mundial de la Salud

P

PCD: precursor específico de célula dendrítica

PDGFRA: platelet derived growth factor receptor alpha

PDGFRB: platelet derived growth factor receptor beta

PLC: progenitor linfóide común

PMC: progenitor mielóide común

PML: promyelocytic leukemia

PPM1D: protein phosphatase, Mg²⁺/Mn²⁺ dependent 1D

PTD: protein transduction domain

PV: policitemia vera

R

RARA: retinoic acid receptor alpha

RUNX1: runt related transcription factor 1

S

SCF: factor estimulante de células *stem*

SDF-1: factor de crecimiento derivado de células estromales de tipo-1

SETBP1: SET Binding Protein-1

SF3B1: splicing factor-3b subunit-1

SHH: sonic hedgehog

SLAM: signaling lymphocytic activation molecule

SMD: síndrome mielodisplásico

SMD/NMP: neoplasia mielodisplásica/mieloproliferativa

SMD-t: síndromes mielodisplásicos relacionados con (quimio)terapia

SRSF2: serine/arginine-rich splicing factor 2

SP: sangre periférica

SSC: sideward light scatter

STAG2: stromal antigen-2

STAT: signal transducer and activator of transcription

T

TCR: receptor de la célula T

TDGF-1/Cripto: factor-1 de crecimiento derivado de teratocarcinoma

TE: trombocitemia esencial

TET2: tet methylcytosine dioxygenase-2

TGF-β: factor transformante del crecimiento beta

TKI: inhibidores de tirosín kinasa

TNFα: factor de necrosis tumoral alfa

TNFβ: factor de necrosis tumoral beta

TP53: tumor protein P53

TPH: trasplante de precursores hematopoyéticos

TPO: trombopoyetina

U

U2AF1: U2 small nuclear RNA auxiliary factor-1

UP: urticaria pigmentosa

V

VE-cadherin: cadherina del endotelio vascular

VEGFα: factor alfa de crecimiento del endotelio vascular

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

W

WDSM: mastocitosis sistémica bien diferenciada

WPSS: WHO classification-based prognostic scoring system

Z

ZRSR2: zinc finger CCCH-Type, RNA binding motif and serine/arginine rich-2

CAPÍTULO I. Introducción

1.- La hematopoyesis.

La hematopoyesis constituye el proceso mediante el cual se generan las células hematopoyéticas (eritrocitos, leucocitos y plaquetas) a partir de la diferenciación y maduración de un precursor común conocido como célula *stem* hematopoyética (CSH). El desarrollo y diferenciación hematopoyética es un proceso biológico dinámico, complejo y finamente regulado, en el que intervienen de forma coordinada, además de los precursores de células sanguíneas, multitud de células (p.ej. células del micromedioambiente medular como las células mesenquimales y otras células del estroma) y productos celulares como citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento y diferenciación, que mediante *sistemas* de retroalimentación, activación e inhibición tienen como objetivo último mantener un número con proporciones relativas estables de células hematopoyéticas, durante toda la vida del individuo¹⁻⁵.

1.1.- Localización de la hematopoyesis en las primeras etapas del desarrollo.

Actualmente se conoce que la hematopoyesis ocurre en diferentes oleadas o etapas a lo largo del desarrollo y vida del individuo. Así, los primeros indicios de hematopoyesis la sitúan en los primeros días de vida del embrión, al tener como función primordial la oxigenación de las células y tejidos que se desarrollarán posteriormente⁶⁻¹³. La primera oleada de producción de células hematopoyéticas se localiza en el saco vitelino, donde las células *stem* se generarían a partir de un precursor mesodérmico localizado en la pared posterior del mesodermo lateral^{7,14-20}. En este período, se trataría de una hematopoyesis incompleta, en la que se producen tan sólo hematíes, junto a los primeros granulocitos, y cuya generación estaría regulada por la expresión (o inhibición de la expresión) de factores de transcripción concretos, especialmente de *PU.1* o *GATA-1*²¹.

Posteriormente, entre los días 27 y 40 de vida del embrión humano, la pared antero-lateral del mesodermo ventral del embrión se prepara para albergar el nicho hematopoyético definitivo, surgiendo en este período por primera vez, una célula con capacidad de diferenciación a precursores de células endoteliales, mesenquimales y/o hematopoyéticas, denominada hemangioblasto, célula edotelial hemogénica o célula hemangio-mesenquimal^{11,22,23}. Estos precursores hematopoyéticos más primitivos se definen además por mostrar patrones de expresión de proteínas característicos, asociados a expresión de CD31⁺, CD34⁺, CD45⁺, CD117⁺, c-myb⁺, GATA2⁺, GATA3⁺, flk1⁺ y SCL/TAL1⁺, en ausencia de CD38, lin1 y otros marcadores específicos de línea²²⁻²⁷. No obstante, entre esta célula hematopoyética primitiva y el hemangioblasto, se postula que podría existir una célula ancestral CD143⁺, CD34⁻, CD45⁻ con capacidad de diferenciación, además de al precursor hematopoyético primitivo, a la célula progenitora del endotelio vascular CD143⁺, CD34⁺, CD45^{22 28}.

En este momento del desarrollo ontogénico de la hematopoyesis, el nicho hematopoyético estaría constituido por la notocorda, células mesenquimales y células del endotelio vascular, además de los precursores ancestrales y hematopoyéticos primitivos. En este ambiente se liberan citocinas y mediadores de entre los que cabe señalar BMP (proteína morfogénica del hueso), FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), SHH (Sonic Hedgehog) y VEGF α (factor de crecimiento del endotelio vascular), cuyos efectos van a favorecer la activación de vías de señalización tales como las vías de NOTCH y WNT3, y la producción de factores de transcripción como *ldb1* y *RUNX1*, que propician la diferenciación de células mesodérmicas primitivas a hemangioblastos, que se localizan también en una estructura anatómica denominada aortagonado-mesonefro (AGM)^{7,29,30,18-21}.

La hematopoyesis se establece de forma definitiva en las etapas embrionarias. Tras la generación del primer precursor surgirán diversas oleadas hematopoyéticas con el fin de establecer nichos hematopoyéticos adicionales en diferentes órganos y tejidos como el timo, el bazo, el hígado, e incluso el endocardio, la aorta y la placenta^{11,12,21,31,32}. En estos nuevos nichos, especialmente en el hígado, las células hematopoyéticas procedentes del AGM anidan y se establecen, manteniendo la hematopoyesis intraembrionaria. De esta forma, el hígado se convierte en el principal órgano hematopoyético durante el

período embrionario y posteriormente durante el período fetal, incluso cuando la médula ósea (MO) embrionaria ya haya sido colonizada por CSHs³³.

Las señales generadas por las células estromales de cada uno de los nuevos nichos hematopoyéticos inducen la quimiotaxis selectiva de CSHs^{7,31,34,35}. Hoy se sabe que este proceso no es aleatorio y que está mediado (principalmente) por la quimiocina CXCL12, también conocida como factor de crecimiento derivado de células estromales de tipo 1 (SDF-1); se trata de una quimiocina producida en diferentes nichos hematopoyéticos y que interaccionan con su receptor CXCR4 localizado en la membrana de la CSH³⁶. Además, en este proceso de direccionamiento y anidamiento de la CSH, también colabora el factor estimulante de células *stem* (SCF)³⁶. La hipervascularización coriónica placentaria con zonas ricas en CXCL12 y SCF, especialmente llamativa en los últimos meses de gestación, explicaría la presencia de nichos hematopoyéticos con CSHs en la placenta durante la última etapa de la gestación³⁶.

La aparición de los nuevos nichos hematopoyéticos en diferentes tejidos, ha suscitado cierta controversia en relación al origen de las CSHs. Así, se plantea si estas células realmente tienen su origen en el AGM, a partir del cual mediante oleadas de siembras sucesivas, colonizarían los nuevos nichos hematopoyéticos, si por el contrario, surgen "*de novo*" a partir de la capa mesenquimal de cada tejido, o si se trata de una combinación de ambos procesos^{7,11,13-15,31,35,37,38}. Lo que sí parece demostrado es que la CSH de diferentes tejidos embrionarios tiene diferentes características proliferativas según el órgano en el que se establezca; así, a modo de ejemplo, la CSH hepática prolifera de forma casi constante, mientras que la CSH presente en la médula ósea permanecería en un estado quiescente^{11,12}. Desde la octava semana de vida fetal hasta el nacimiento, el hígado se convierte en el órgano hematopoyético más importante^{11-13,21}. Posteriormente, tras el nacimiento, la médula ósea pasará a ser el principal órgano hematopoyético (Figura 1)^{11-13,21}.

A modo de resumen, diríamos que existen indicios que avalan la teoría de que la hematopoyesis se originaría en las primeras etapas de la vida embrionaria. Inicialmente se trataría de una hematopoyesis incompleta que tendría lugar en el saco vitelino. Una vez se forma el AGM, se instauraría la hematopoyesis definitiva formándose nuevos nichos hematopoyéticos que albergan CSHs en diferentes órganos. A partir

de la octava semana de la vida fetal, el hígado asumiría la función de órgano hematopoyético principal, hasta que, tras el nacimiento, es sustituido por la médula ósea.

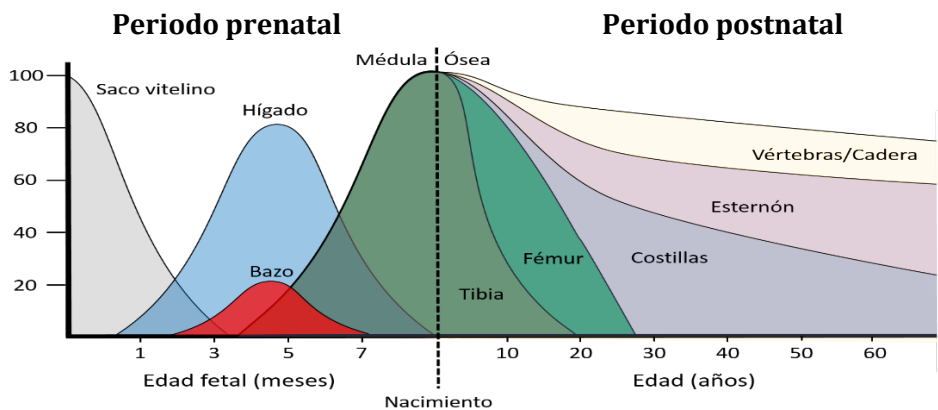


Figura 1. Evolución de la hematopoyesis en el organismo durante las etapas embrionaria, fetal, postnatal y adulta.

1.2.- Regulación de la hematopoyesis.

La regulación de la diferenciación y maduración de la CSH en el nicho hematopoyético, se lleva a cabo a nivel intracelular mediante una combinación de patrones definidos de expresión de factores de transcripción y mecanismos epigenéticos. Mediante ambos grupos de señales, se genera un complejo entramado de señales intercelulares y de cambios intracelulares que terminan condicionando la quiescencia o proliferación de la CSH, y su capacidad de diferenciación unilineal vs. multilineal. En este sentido, la activación de factores de transcripción como *RUNX1*, *NOTCH1*, *MLL*, *TEL/ETV6*, *SCL/tal1* y *LMO2* o *GATA-2* confiere a la CSH una capacidad casi ilimitada de autorrenovación en ausencia de diferenciación^{11-13,39}; hoy se cree que la competición por la activación selectiva de determinados factores de transcripción en diferentes estadios de diferenciación del progenitor hematopoyético, regularía y condicionaría la diferenciación terminal de la CSH a cada una de las distintas líneas hematopoyéticas¹¹. Así, los factores *GATA-1* y *PU.1* intervienen en la diferenciación específica de la CSH a un progenitor eritroide/megacariocítico y gránulo/monocítico, respectivamente⁴⁰; a su vez, *Gfi1* y *PU.1* compiten por la diferenciación a granulocito neutrófilo o monocito, respectivamente⁴¹; *C/EBP* y *FOG*, estarían implicados en la inducción de diferenciación a granulocito eosinófilo o a células con capacidad de diferenciación

multipotencial⁴², mientras que *EKLF* y *Fli-1*, compiten por la diferenciación a líneas eritroide vs. megacariocítica, respectivamente.

En cierta medida, las hemopatías malignas en las que existe afectación de la CSH, presentan alteraciones genéticas que involucran a los genes que codifican para estos factores de transcripción, siendo incluso algunas de estas alteraciones, altamente específicas de subtipos particulares de leucemias mieloides agudas (LMA) y de leucemias linfoblásticas agudas de precursores de célula B (LLA-B); tal es el caso de *PU.1* y *C/EBP α* en LMA megacarioblástica asociada a Síndrome de Down y de *Pax5*, *E2A* y *EBF* en algunos subtipos concretos de LLA-B^{11,43}.

De igual modo, a nivel epigenético se ha demostrado la participación de alrededor de medio centenar de factores reguladores que intervendrían a distintos niveles⁴⁴, generalmente a través de la formación de complejos que activan o inhiben selectivamente a los factores de transcripción que intervienen en la diferenciación hematopoyética, a nivel de los distintos estadios madurativos³⁹, y que mencionaremos de forma más detallada en las siguientes secciones de esta introducción.

1.3.- El nicho hematopoyético.

El concepto de “nicho hematopoyético” fue acuñado inicialmente por Schofield, en 1978⁴⁵. Desde entonces, ha adquirido un protagonismo notable, siendo uno de los focos centrales del estudio de la hematopoyesis⁴⁶. En general, el término “nicho hematopoyético” se refiere a zonas concretas de un tejido localizadas en los diferentes órganos hematopoyéticos donde anida la CSH, y en la que se distinguen habitualmente tres componentes celulares con un origen distinto (mesenquimal, hematopoyético y endotelial). Estos componentes mesenquimal, hematopoyético y endotelial delimitan tres áreas o nichos histológicos, conocidos como los nichos endóstico, vascular y trabecular^{31,34,47,48}.

El componente mesenquimal del nicho hematopoyético está integrado por un grupo heterogéneo de células derivadas de un precursor común mesenquimal (célula *stem* mesenquimal o MSC) entre las que se

incluyen fibroblastos, osteoblastos y condrocitos, además de las células mesenquimales y los adipocitos^{31,49-52}.

Además de su función osteogénica, condrogénica y adipogénica,^{31,53} las células del componente mesenquimal del nicho hematopoyético intervienen directamente en los procesos de proliferación, diferenciación, adhesión y migración de las células hematopoyéticas^{31,34,54-57}, mediante la producción y liberación de diferentes citocinas, factores de crecimiento y quimiocinas, entre otros mediadores. En este sentido cabe señalar que, los fibroblastos, osteoblastos, y en menor medida los condrocitos, producen y liberan interleucina (IL)1, IL6, IL7, IL8, IL11, factor estimulante de colonias (CSF) monocíticas (M-CSF) y granulocíticas (G-CSF), SCF, interferón-beta (IFN- β), fibronectina, colágeno tipo I y tipo III, heparán sulfato, ácido hialurónico, VLA-4, VLA-5, α L β 2 integrina o LFA-1(CD11a/CD18), CD44, SDF-1, factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y TNF β , angiopoyetina 1 (Ang-1), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), factor transformante del crecimiento beta (TGF- β) y linfotoxina (LT). Se ha observado además que a nivel de su superficie, los osteoblastos expresan vitronectina (α V β 3 o CD51/CD61), N-cadherina, Tie2 y Jagged-1, moléculas capaces de aglutinar selectivamente a las CSHs más primitivas, favoreciendo de este modo su expansión^{48,56,58-63}. Por el contrario, en el nicho hematopoyético, los adipocitos parecen desarrollar una función inhibidora de la hematopoyesis, modulada por la producción de leptina^{54,55,64,65}. Por su parte, la MSC del nicho hematopoyético se caracteriza por expresar la molécula de adhesión de célula mesenquimal (MCAM o CD146) y/o el factor de crecimiento neuronal de baja afinidad (NGFR o CD271); al parecer, dicha expresión depende de la zona del nicho hematopoyético donde se encuentre la MSC, lo cual pone de manifiesto la heterogeneidad de estas células^{66,67}. La MSC regula la osteogénesis, adipogénesis y condrogénesis, además de liberar nestina y SDF-1, factores necesarios para la adhesión y migración de la CSH hacia el nicho vascular. Pese a todo lo anteriormente descrito, cabe señalar que, aunque todavía se conoce muy poco sobre los mecanismos moleculares y las funciones específicas de la MSC, su localización en los tres nichos hematopoyéticos (endóstico, vascular y reticular) hace pensar que se trata de una célula determinante en el control de la proliferación y diferenciación celular durante toda la hematopoyesis.

El componente vascular del nicho hematopoyético está integrado fundamentalmente por células endoteliales, que al igual que la CSH, tienen su origen en el angioblasto. La célula endotelial regula el tráfico

celular y de nutrientes desde y hacia los vasos sanguíneos, estando implicada además en la proliferación de las células hematopoyéticas, debido a la producción y liberación de factores de crecimiento vascular, principalmente VEGF, isolectina y cadherina del endotelio vascular (VE-cadherin). El contacto directo entre la CSH y la célula endotelial permite, a través de estos mediadores, activar vías de señalización como las vías de NOTCH y AKT, dando lugar a la proliferación y expansión de la CSH^{31,34,68,69}.

Precisamente la CSH y su progenie constituyen el elemento principal del componente hematopoyético del nicho. Tras sufrir procesos de diferenciación y maduración, dará lugar a células hematopoyéticas maduras, que accederán al torrente circulatorio; desde ahí, algunas regresan posteriormente a la médula ósea integrándose en el estroma y microambiente medular. Así ocurre con los macrófagos, los linfocitos T y B o las células plasmáticas y el mastocito, contribuyendo así también las propias células hematopoyéticas diferenciadas, al control de la hematopoyesis mediante la producción y liberación de mediadores como citocinas de las que merece destacar factor estimulante de colonias granulomonocíticas (GM-CSF), G-CSF, IL-1, IL-3, IL-6, IL-8 y TNF α ^{53,54}, entre otras.

En la médula ósea, estos tres componentes celulares se encuentran distribuidos a su vez, en tres zonas o nichos espaciales diferenciados (Figura 2)^{31,34}: i) el nicho endóstico o trabecular, compuesto por, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos (células reguladoras del metabolismo óseo); ii) el nicho vascular integrado por arteriolas, capilares y sinusoides⁷⁰ formado principalmente por células endoteliales, y ;iii) el nicho reticular o parénquima, constituido por todos los elementos hematopoyéticos y por cantidades variables de adipocitos que forman el componente de tejido graso.

El nicho endóstico está integrado por una zona especialmente rica en osteoblastos, que facilitan la adhesión de la CSH a través de receptores de membrana como la N-cadherina⁷¹, evitando así su migración hacia otras zonas del nicho, donde tienen lugar los procesos de diferenciación y maduración hematopoyética^{72,73}. Como hemos referido anteriormente, el nicho vascular es una zona rica en células endoteliales⁷⁴ secretoras de CXCL12 y que están en contacto directo con células progenitoras hematopoyéticas ricas en moléculas que señalizan para la activación de linfocito (SLAM)⁷⁵ en distintos estados funcionales. Así, estas CSHs pueden agruparse en: i) CSHs CD150⁺ CD244⁻ CD48⁻ localizadas de forma preferente alrededor de los sinusoides vasculares; ii) progenitores multipotentes CD150⁻ CD244⁺

CD48⁻, y; iii) progenitores más maduros CD150⁻ CD244⁺ CD48⁺⁷⁵. Finalmente, el nicho reticular (o parénquima) descrito en 2010, está definido por la zona del nicho hematopoyético comprendida entre los nichos endóstico y vascular, en la que la CSH interactúa con la MSC. Esta MSC libera nestina y gran cantidad de CXCL12, hecho por el que a esta célula se la denomina también célula CAR (célula reticular con abundante expresión de CXCL12)⁷⁶⁻⁷⁸. De hecho, aunque inicialmente se pensaba que la CSH estaría localizada cerca del endostio, hoy se sabe que en realidad, la mayoría de las CSH se localizan lejos del endostio, siguiendo una distribución perivascular, en contacto directo (adyacente) con las células CAR^{50,77,79,80}. Además de CXCL12 y nestina, las células CAR también producen SCF, un mediador esencial a la hora de mantener la viabilidad de la CSH^{77,81}.

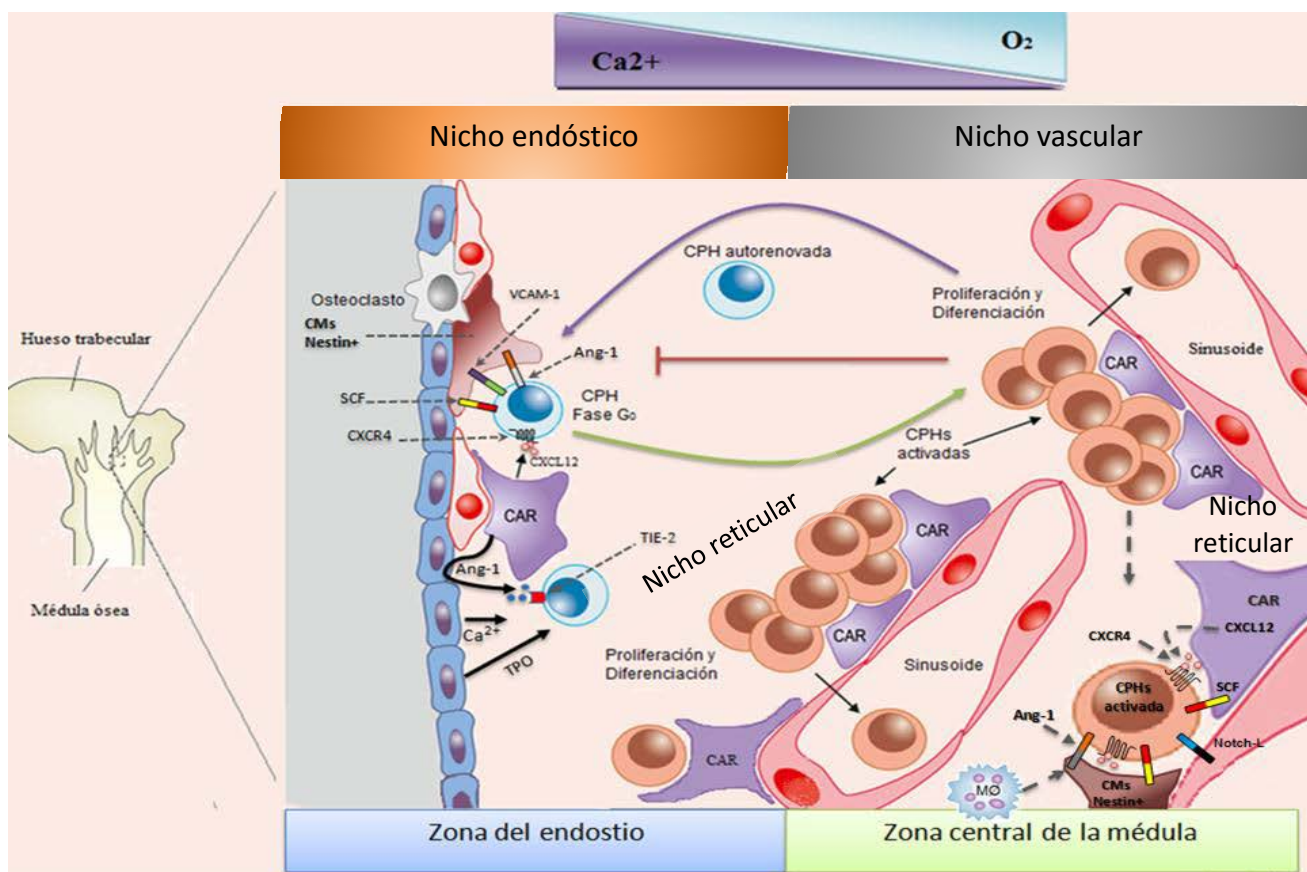


Figura 2. Representación gráfica del nicho hematopoyético de médula ósea. Las subpoblaciones de células progenitoras hematopoyéticas quiescentes y activas coexisten en un mismo microambiente específico denominado "nicho" hematopoyético. Este microambiente mantiene a la CSH en un equilibrio dinámico entre autorenovación y diferenciación. En el nicho endóstico las CSH inactivas (en fase G₀ del ciclo celular) quedan fuertemente ancladas a través de interacciones mediadas por moléculas de adhesión expresadas por la CPH, la célula reticular (CAR) y la célula mesenquimal del nicho (CM nestina⁺) como N-cadherina, CD44 y diversas integrinas (VLA-4). En el nicho vascular, la CSH prolifera y se diferencia gracias a la modulación ejercida por mediadores como la angiopoyetina 1 (Ang-1) y VEGF. En el nicho vascular, además, la interacción de moléculas que inducen quiescencia de la CSH, como TIE2 provoca un aumento de los niveles de expresión de N-cadherina en la CPH, en equilibrio con los factores activadores de la diferenciación de la CSH (por ejemplo, SCF, CXCR4 y TPO) producidos y liberados por el componente mesenquimal del nicho reticular. *Modificado de Berrueta et al*⁸¹

1.4.- Estadios iniciales de diferenciación de la célula *stem* hematopoyética.

En la actualidad se estima que un individuo adulto produce alrededor de un millón de CSHs por minuto⁸². A través de un mecanismo de división asimétrica, estas células garantizan el mantenimiento de niveles constantes de CSHs durante toda la vida⁸². Para mantener el equilibrio entre las células que se pierden diariamente y las necesarias para mantener niveles estables de las mismas en el organismo, se calcula que para un adulto de unos 70 kg de peso, la producción media diaria de eritrocitos, plaquetas y leucocitos se situaría en torno a 2×10^{11} , 2×10^{11} y 7×10^{10} células, respectivamente⁸³. Todas estas células se generarían a partir de CSHs capaces de dividirse de manera asimétrica, dando lugar a dos células hijas con diferentes características: una capaz de reintegrarse al pool existente de CSH (capacidad de autorrenovación) sin apenas sufrir diferenciación, y otra que terminaría por diferenciarse⁸⁴. En este proceso juega un importante papel la interacción de SCF y de la trombopoyetina (TPO) con sus receptores *KIT* y *c-Mpl*, respectivamente⁸⁵. Otras citocinas como IL3, IL6, IL11 y el ligando de Flt-3, actuarían de forma sinérgica con SCF y TPO para regular estas fases iniciales de la diferenciación y autorrenovación de la CSH⁸⁶⁻⁸⁸. De esta forma se garantizaría la supervivencia y proliferación de la CSH, a la vez que el control de su pool en el organismo⁸⁹.

La capacidad de autorrenovación de la CSH está directamente relacionada con el número de divisiones que ésta haya sufrido, y que se estima podría ocurrir con una frecuencia de aproximadamente una vez al mes⁸⁶. Durante los intervalos de latencia (fase G_0 del ciclo celular), diferentes proteínas y factores autocrinos y paracrinos como TGF β 1, Tie2 y su ligando Ang1, N-cadherina, TGF β /Smad o β -catenina^{58,89-93}, favorecen la adhesión de la CSH al nicho endóstico⁹⁴; ahí, las condiciones de hipoxia son más favorables para mantener una actividad mitocondrial mínima (ocurriendo procesos de autofagia y mitofagia)⁹⁵⁻⁹⁸. Todo esto termina favoreciendo que la célula se mantenga en un estado quiescente fuera de ciclo celular, (en fase G_0). A su vez, en el nicho endóstico, la hipoxia celular estaría regulada por mediadores como el factor-1 de crecimiento derivado de teratocarcinoma (TDGF-1/Cripto), con las proteínas WNT y NOTCH, TGF β , GRP78 y factor-1 inducible por hipoxia (HIF-1 α), proteínas que regulan la expresión de los factores de transcripción *WNT*, *NOTCH*, y *SHH*^{88,91,99-101}, la actividad de la telomerasa¹⁰² y la entrada al ciclo celular de la CSH, directamente

mediante la inhibición de quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) inducidas por la producción de p21 y p57¹⁰³⁻¹⁰⁵, entre otras proteínas inhibidoras.

Tras el período de latencia, la entrada en ciclo celular de la CSH del nicho endóstico daría lugar a la formación de un huso mitótico perpendicular al polo de unión al endostio¹⁰⁶. Las células más próximas al mismo, silencian la expresión de factores necesarios para la diferenciación y maduración, (p. ej. *SMAD*)¹⁰⁷, mientras que activan *NOTCH*, *WNT*, *SHH*, *HELIXLOOP-HELIX (HLH)*, *HES* y *HESRELATED*, junto a programas epigenéticos^{24,88} que favorecen la quiescencia e inhiben la diferenciación de esa célula hija¹⁰⁸.

Con el envejecimiento, el nicho hematopoyético sufre alteraciones estructurales que afectan directamente a la organización y distribución de los distintos componentes celulares del mismo. Así, disminuiría la capacidad de la CSH para producir células de línea linfóide (pero no mielóide)¹⁰⁹, lo cual explicaría, al menos en parte, el incremento progresivo de la frecuencia de las hemopatías mieloides de CSH en adultos, a medida que avanza la edad. En paralelo, se observa mayor expresión de CD150⁹⁴ y acumulación de daño en el ADN, asociado a activación de *p53* y *p16INK4a*, factores que afectan negativamente a la capacidad de autorregeneración de la CSH, favorecen la mielopoyesis y la posible transformación neoplásica a hemopatías mieloides¹¹⁰.

1.5.- Diferenciación hematopoyética.

A grandes rasgos, las células hematopoyéticas se subdividen en células linfóides y mieloides, que a su vez se subclasifican en subtipos funcionales bien diferenciados entre ellos. Así, la línea linfóide está integrada por linfocitos B y T, además de las células “natural killer” (NK), mientras que el compartimiento mielóide es más heterogéneo y se subdivide en granulocitos neutrófilos, eosinófilos y basófilos, monocitos y macrófagos, mastocitos, células dendríticas, células eritroides y megacariocíticas.

Atendiendo al grado de diferenciación celular, podemos distinguir un número variable de estadios madurativos dentro de cada una de las diferentes líneas celulares hematopoyéticas, dependiendo de los criterios y métodos concretos empleados. Así, según el patrón de expresión de múltiples proteínas analizado mediante citometría de flujo (CMF) podemos establecer ≥ 20 estadios madurativos diferentes

para cada línea. Por el contrario, según criterios morfológicos y funcionales convencionales, la diferenciación de células hematopoyéticas se define por cuatro estadios principales: CSH, célula progenitora hematopoyética (CPH), célula precursora hematopoyética (CPreH) y célula madura. El primer estadio correspondería a la célula más primitiva, la CSH, con capacidad de mantener la hematopoyesis a “largo plazo” (LT-CSH; del inglés, “long-term”) y que representa alrededor del 0.005% del conjunto de las células nucleadas de MO¹¹¹⁻¹¹⁴. Se trata de células con capacidad de diferenciación multipotencial y serían las únicas células hematopoyéticas con capacidad de autorrenovación^{11,13,112-114}. Morfológicamente la CSH tiene un aspecto inmaduro linfoblastoide y expresa antígenos de inmadurez como CD34, CD45, CD90, CD117 y CD133, en ausencia de CD38 y de marcadores fenotípicos específicos de línea linfocitoide B (CD19-, CD79a-), T(CD3-, CD7-), mielo-monocítica (CD15-, CD64-, MPO-), de granulocito basófilo (CD203c-), eosinófilo (CD193-, CD125a-, Siglec 8-), de célula eritroide (CD36-, CD235-) y megacariocítica (CD41-, CD42a-, CD42b-, CD61-)^{113,115-117} (Figura 3).

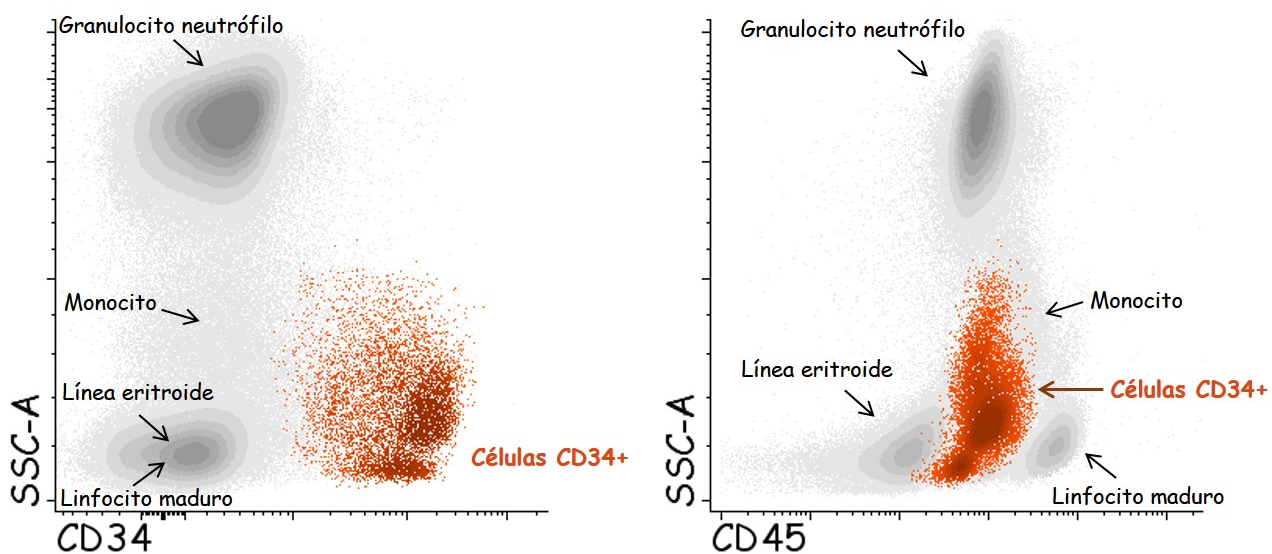


Figura 3. Evaluación de la maduración de los precursores hematopoyéticos mieloides CD34+. Representaciones biparamétricas de CD45 vs. SSC y CD34 vs SSC que ilustran la heterogeneidad de la complejidad interna de las células CD34+ (color naranja) en una MO normal.

La CSH se diferencia a CPH, que representa 0.1-0.5% de las células nucleadas de MO^{118,119}. Esta CPH pierde la capacidad de autorrenovación, aunque conserva su potencial proliferativo, siendo multipotencial, bipotencial o monopotencial. Fenotípicamente, aunque comparte ciertas características con la CSH como la expresión de CD34 y CD45, presenta reactividad para algunos antígenos específicos de la línea a la que está

iniciando su compromiso madurativo, de acuerdo a lo descrito anteriormente; además, la CPH muestra expresión fuerte y relativamente homogénea de CD38^{116,117,120,121}. La CPH a su vez, dará lugar a las CPreH de diferentes líneas identificables no sólo por el inmunofenotipo característico de cada línea, sino también por su morfología (p.ej. el mieloblasto, promielocito, mielocito, metamielocito y cayado, dentro de los precursores de línea de granulocito neutrófilo o el monoblasto y el promonocito dentro de la línea monocítica). Según avanza la diferenciación, esta CPreH muestra pérdida progresiva de positividad para marcadores de inmadurez como CD34, HLADR y CD117 –en las células mieloides y linfoides no comprometidas a líneas de célula presentadora de antígeno (CPA)^{-120,122}; tal es el caso de la CPreH de granulocito neutrófilo, basófilo y eosinófilo, del mastocito y de las célula eritroide y megacariocítica^{117,119}. Por el contrario, en el caso de las células (mieloides y linfoides) HLADR⁺ que se diferencian a CPA (principalmente a monocito, célula dendrítica y linfocito B), se observa pérdida exclusiva de CD34 y CD117^{117,119}, manteniéndose la expresión de HLADR (Figura 4A y Figura 4B).

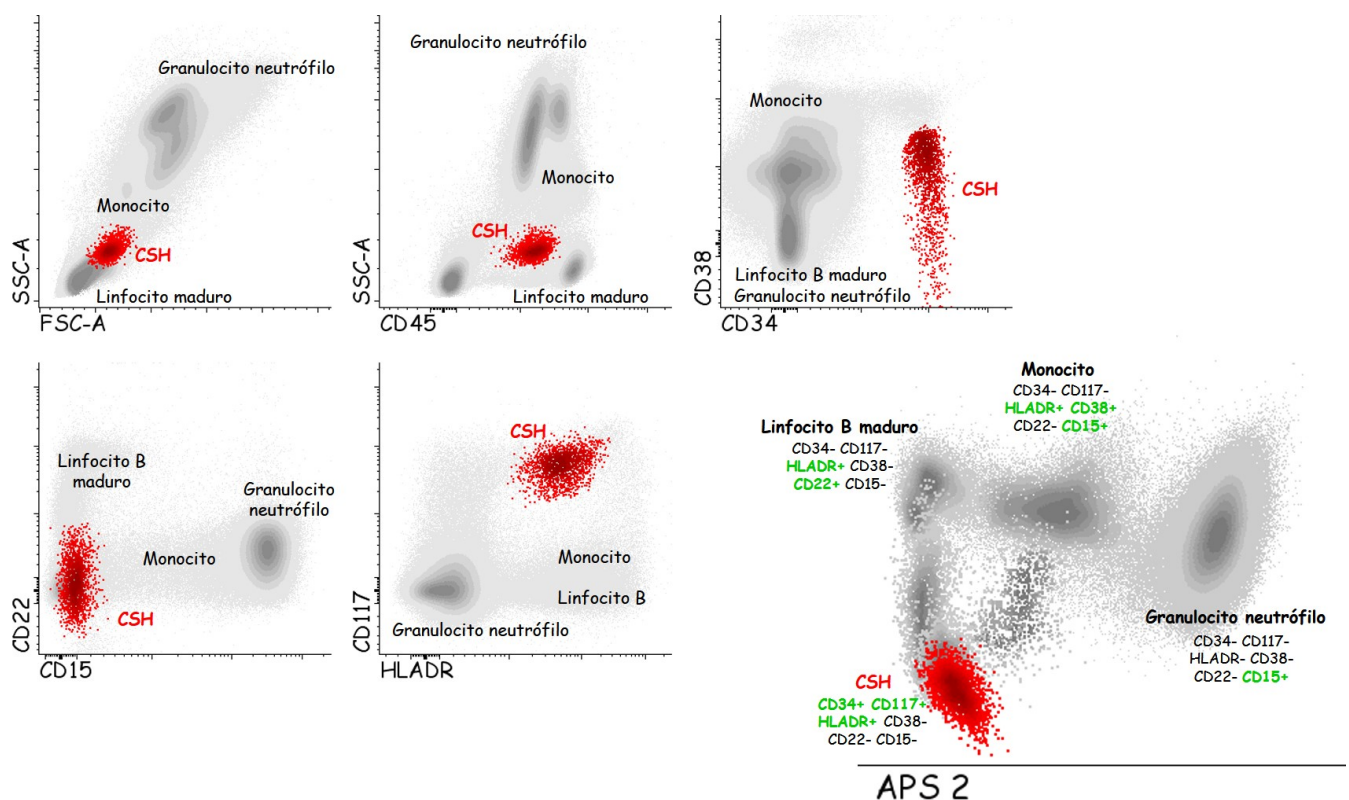


Figura 4A. Representación gráfica de la diferenciación temprana de la CSH de médula ósea normal a diferentes líneas hematopoyéticas. Representaciones biparamétricas (dot plots) y multidimensionales (APS) que ilustran los distintos estadios de diferenciación de la CSH a diferentes líneas hematopoyéticas. En el panel se representa la población de precursores hematopoyéticos (en color rojo) no comprometidos a línea linfoide ni mieloide CD34⁺ CD117⁺ HLADR⁺ y CD45⁺débil en ausencia de reactividad para CD38 y otros marcadores de línea B (CD22⁺) o mieloide (CD15⁺). En color gris se representan el resto de poblaciones hematopoyéticas de la médula ósea.

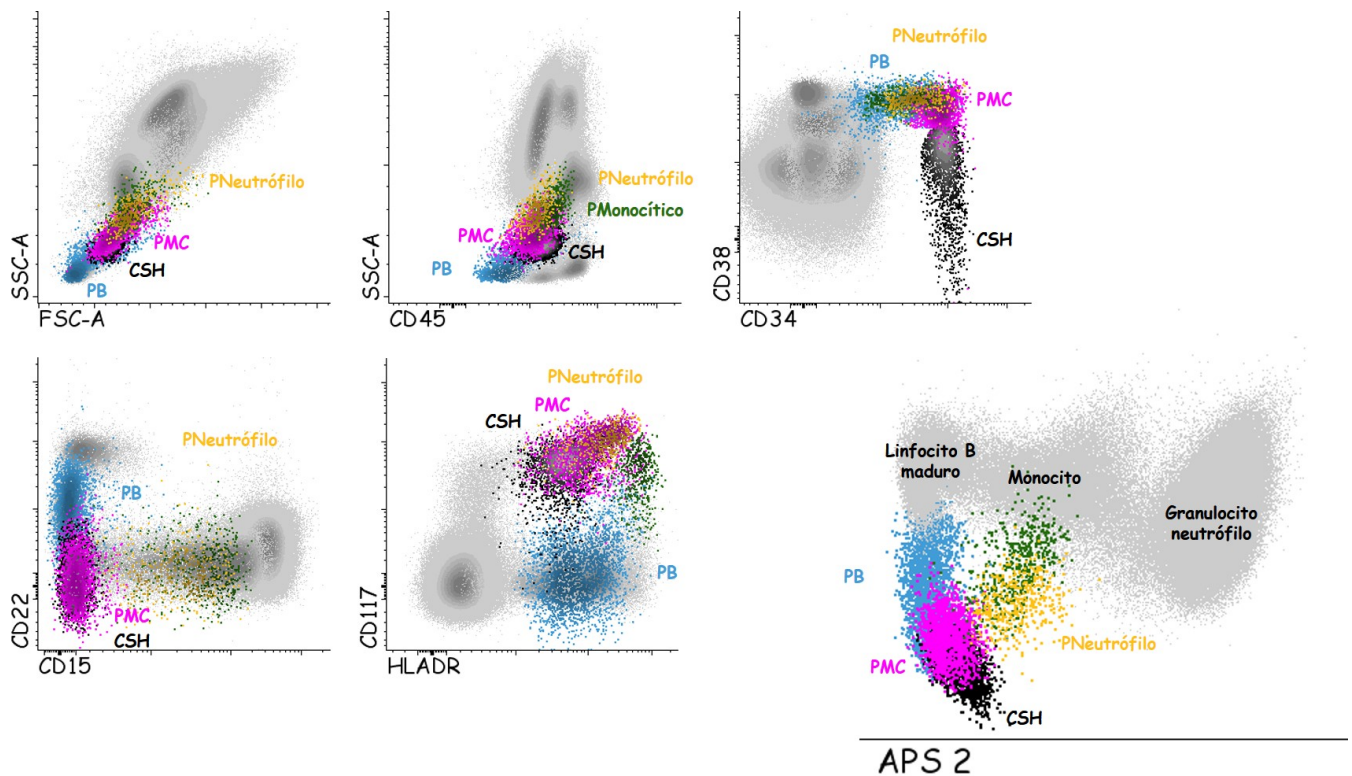


Figura 4B. Representación gráfica de la diferenciación temprana de la CSH de médula ósea normal a diferentes líneas hematopoyéticas. Representaciones biparamétricas (dot plots) y multidimensionales (APS) que ilustran los distintos estadios de diferenciación de la CSH a diferentes líneas hematopoyéticas. En el panel se representa la población de precursores no comprometidos (en color negro) junto con las poblaciones de CPrH comprometidas a línea linfoide (CD22⁺, en color azul), a línea monocítica (HLADR⁺⁺ y CD15⁺, en color verde), a línea de granulocito neutrófilo (HLADR^{-/+} CD15⁺, en color amarillo) junto con otras CPrH comprometidas a otras líneas celulares mieloides diferentes de las anteriores (HLADR⁺ CD117⁺ CD22⁻ CD15⁻), representadas en color rosa.

A continuación, revisaremos en más detalle las principales características de las células que presentan diferenciación a cada una de las líneas mieloides y a los precursores primitivos linfoides en MO humana normal. Por el contrario, no detallaremos en esta introducción la diferenciación linfoide T y B ya que las neoplasias linfoides no se reconocen habitualmente como neoplasias de la célula *stem* hematopoyética

1.5.1.- Diferenciación mieloide.

En el nicho hematopoyético se generan señales específicas que modulan la expresión génica y los perfiles epigenéticos de los precursores hematopoyéticos, orientando la diferenciación y maduración de la

CSH^{123, 124}. Entre los principales genes involucrados en la diferenciación a línea mieloide destacan: *PU.1*¹²⁵, *HOX*¹²⁶, *C/EBP α* , *C/EBP β* y *C/EBP ϵ* ¹²⁷, *RUNX1*¹²⁸, *SCL*¹²⁹, *PU.1*, *GATA 1*, *GATA 2* y *FOG*,^{130,131}. Aunque en general se asume que podría existir un precursor mieloide común, cada vez existe un mayor número de evidencias que apoyan la hipótesis de la existencia ya en las primeras etapas de la diferenciación, de una mayor diversificación, con varios precursores distintos para las diferentes líneas mieloides.

Desde un punto de vista fenotípico, la diferenciación a las distintas líneas mieloides a partir de una CSH se caracteriza por pérdida de reactividad para CD34 (un marcador cuya expresión es típica de la CSH), manteniéndose en la mayoría de los casos la expresión de CD117¹³². Al igual que los precursores CD34⁺, el compartimento de precursores CD34-CD117⁺ constituye también una población celular muy heterogénea que contiene precursores comprometidos a las diferentes líneas hematopoyéticas^{117,119}. Dentro de este compartimento resulta relativamente fácil discriminar los precursores CD34-CD117⁺ granulomonocíticos (CD33⁺⁺CD45^{débil/-}) de los precursores eritroides (CD33⁻CD45⁻) por sus notables diferencias en granularidad (SSC) y por la expresión de marcadores característicos de línea como CD13 (positivo en los precursores granulomonocíticos y progresivamente menos intenso y negativo en los precursores eritroides) (Figura 5).

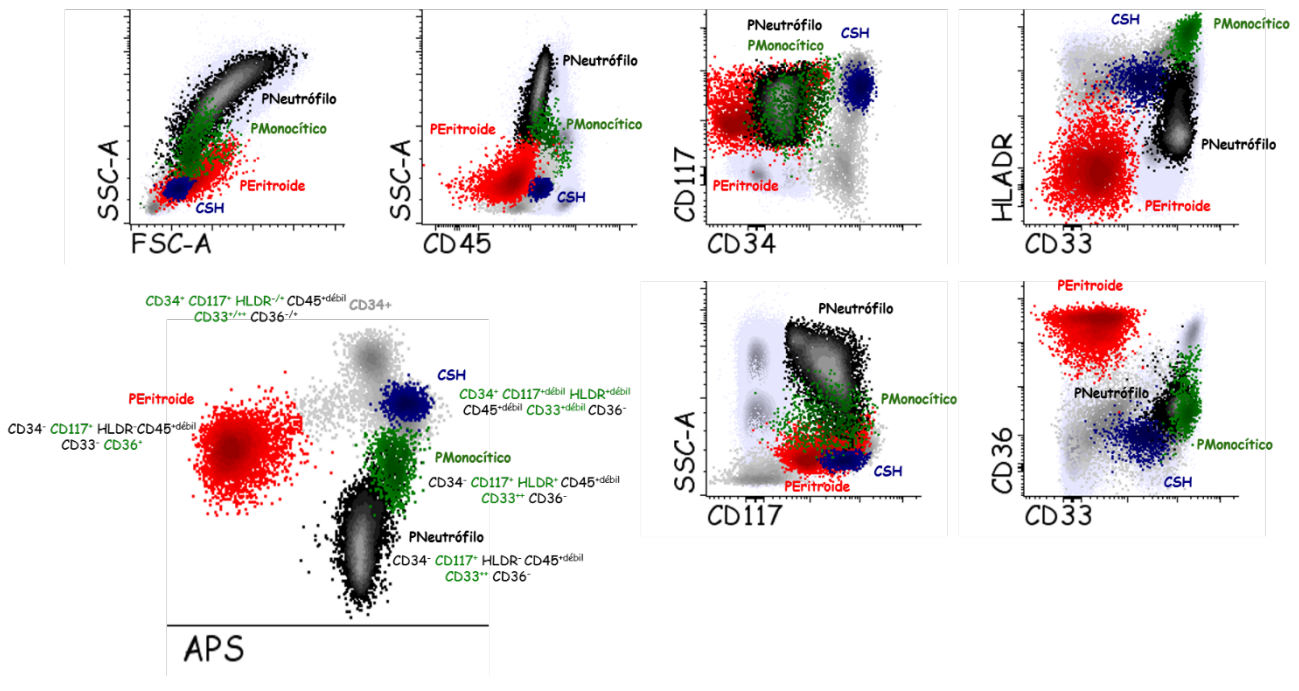


Figura 5. Identificación de precursores CD34⁻ CD117⁺ de línea de granulocito neutrófilo, monocito y eritroide. Representaciones biparamétricas (dot plots) y multiparamétrica (APS) que ilustran la estrategia empleada para la identificación de los precursores CD34-CD117⁺ de línea eritroide (HLADR⁻ CD36⁺ CD33⁻ CD45⁻), de granulocito neutrófilo (HLADR^{-/+} CD36⁻ CD33⁺⁺ CD45⁺) y de monocito (HLADR⁺⁺ CD36⁻ CD33⁺⁺ CD45⁺) en médula ósea normal, representadas en rojo, negro y verde, respectivamente.

1.5.1.1.-Diferenciación a línea granulocítica y monocítica

In vitro, los progenitores mieloides se diferencian formando distintos tipos de colonias, entre las que se identifican, unidades formadoras de colonias granulomonocíticas (CFU-GM). A su vez, éstas dan origen a unidades formadoras de colonias granulocíticas (CFU-G) y unidades formadoras de colonias monocíticas (CFU-M), responsables de la producción del granulocito neutrófilo y del monocito, respectivamente. Así, las CFU-G darían lugar de forma secuencial al mieloblasto, promielocito, mielocito, metamielocito, cayado y granulocito neutrófilo, mientras que las CFU-M se diferencian en monoblasto, promonocito, monocito, y finalmente, ya fuera de la sangre, en el macrófago tisular. La diferenciación a línea mieloides y en concreto a las líneas de granulocito neutrófilo y monocito, está regulada por un complejo entramado de citocinas que en ocasiones presentan efectos sinérgicos, a veces independientes, o incluso antagónicos, entre las que merece destacar GM-CSF, G-CSF, M-CSF, IL-3, IL-4, IL-6 y SCF, entre otras¹³³⁻¹³⁶. En cambio, otras citocinas como TNF- α , TGF- β , la proteína inflamatoria de macrófagos-1 α (MIP-1 α) y los interferones (IFN), actúan como citocinas inhibitorias de la mielopoyesis^{137,138}.

El factor de transcripción más relevante en relación con el compromiso madurativo a línea granulomonocítica es *PU.1*. Esta proteína, en colaboración con los genes *C/EBP α* y *C/EBP β* , y los reguladores epigenéticos *DNMT3A*, *DNMT3B*, *TET2* y *HDCA-1*³⁹, silencia *GATA-1* e inhibe la diferenciación a línea megacariocítica y eritroide. A su vez, la diferenciación específica de CFU-GM hacia granulocito neutrófilo está mediada por la expresión de *C/EBP β* y *C/EBP ϵ* junto con *GATA-1*, y está controlada epigenéticamente por *HDAC5*, *CBP* y *p300*^{39,136,137}. Posteriormente, en estadios de diferenciación más avanzados, *GFI-1* inhibe a *GATA-1* junto con *PU.1*, *IKAROS* y *HOXB8*^{39,136,137}.

PU.1 junto con *Egr1/2* y *Nab-2*, regulan también la diferenciación terminal a línea monocítica^{39,139,140}. A su vez, este proceso está controlado epigenéticamente por *DNMT3A*, *DNMT3B*, *TET2* y *HDCA-1*, en interacción con los factores transcripcionales *IKAROS*, *PREP1*, *KLF4*, *HOXB8* y *HOXA10*, entre otros^{39,136,137}. En los estadios finales de diferenciación de esta línea, la activación de los tandems *MAFB/PU.1* o *IRF8/PU.1*, conduce a la diferenciación terminal a macrófago o célula dendrítica, respectivamente, siendo este proceso favorecido por la presencia de M-CSF (en lugar de G-CSF), junto con INF γ e IL1^{39,134}.

Desde el punto de vista fenotípico, la diferenciación y maduración a línea de granulocito neutrófilo a partir de un progenitor común mieloide CD34⁺ CD117⁺ HLADR⁺, se caracteriza por la pérdida secuencial de reactividad para marcadores asociados a inmadurez (p.ej. CD34, CD117 y HLADR), junto a la adquisición secuencial de antígenos característicos de línea de granulocito neutrófilo, como mieloperoxidasa citoplasmática (cyMPO), CD15 y CD65, CD64, CD11b y CD35, hasta alcanzar los estadios más maduros de cayado y granulocito neutrófilo que sale a sangre periférica (SP) con expresión intensa de CD13, CD16 y por último, CD10^{117,119}. De este modo, mediante CMF se han descrito al menos cuatro estadios de diferenciación claramente definidos y que se correlacionan con los estadios morfológicos de diferenciación a granulocito neutrófilo^{120,121}. Así, en un primer estadio de diferenciación, el precursor de línea neutrófilo muestra un fenotipo cyMPO^{+/++} CD15^{+/++} CD13⁺⁺ CD11b⁻ CD16⁻ CD10⁻ asociado a características morfológicas de mieloblasto^{117,119}. Esta célula se diferenciaría a una célula CyMPO⁺⁺ CD15⁺⁺ CD64^{-/+} CD13^{+/++} CD11b⁻ CD16⁻ CD10⁻ con SSC elevado y características morfológicas de promielocito^{117,119}. En la transición a mielocito, esta célula pierde (ligeramente) expresión de CyMPO^{+/+} y CD13^{+/-}, sigue siendo CD15⁺⁺ CD10⁻ y CD64⁺, y adquiere expresión de CD11b⁺ junto a CD16^{-/+117,119}. Posteriormente, la diferenciación a metamielocito, y cayado se asocia a una expresión intensa de CD15⁺⁺, positividad para CyMPO⁺ y CD64^{débil}, y una expresión progresivamente mayor de CD13^{+/++} CD11b^{+/++} CD16^{+/++}, siendo finalmente el neutrófilo maduro cyMPO⁺ CD15⁺⁺ CD64^{débil} CD13⁺⁺ CD11b⁺⁺ CD16⁺⁺ y CD10^{+117,119}

Por su parte, la diferenciación a línea monocítica, a partir de un progenitor común mieloide CD34⁺ CD117⁺ HLADR⁺, se caracteriza por la pérdida de reactividad para marcadores asociados a inmadurez (p.ej. CD34 y CD117) y reactividad fuerte y homogénea para HLADR, a diferencia de lo que ocurría en la diferenciación a granulocito neutrófilo^{117,119}. En paralelo, este precursor CD34⁻ CD117^{-/+}, HLADR⁺⁺ presenta positividad temprana para marcadores característicos de línea monocítica como CD64, en ausencia de marcadores de granulocito neutrófilo (p.ej. cyMPO⁻)^{117,119}. El fenotipo de esta célula CD14⁻ CD35⁻ CD36⁻ CD300e⁻ correspondería con un estadio madurativo morfológico de monoblasto^{117,119}. Al diferenciarse, esta célula daría lugar de forma secuencial al monoblasto CD64⁺⁺ CD36^{débil} CD14⁻ CD300e⁻, al promonocito CD64⁺⁺ CD14^{+/++} CD35^{+/++} CD36^{+/++} CD300e^{-/+} y finalmente, al monocito maduro CD14⁺⁺ CD35⁺⁺ CD36⁺⁺ CD300e^{+117,119}, que sale a SP desde donde migra a los distintos tejidos del organismo.

1.5.1.2.-Diferenciación a granulocito eosinófilo, granulocito basófilo y mastocito.

En la actualidad, el conocimiento existente acerca de los factores que intervienen en la diferenciación a granulocito eosinófilo, granulocito basófilo y mastocito, es algo más limitado. No obstante, se sabe que desde el precursor común mieloide y mediante los efectos sinérgicos de GM-CSF e IL-3, potenciados por la acción de la IL-5, se induce expresión de *GATA-1*, *STAT3* y *STAT5*. Estos factores de transcripción propician la diferenciación a granulocito eosinófilo^{39,136,137}. De forma similar, la combinación de G-CSF, GM-CSF e IL-3 induce expresión de los factores de transcripción *PI3K* y de *IL-3* que facilitarían la diferenciación inicial a granulocito basófilo y a mastocito^{39,136,137}.

Pese a lo expuesto anteriormente, en la actualidad sigue sin existir consenso en lo que respecta al origen exacto del precursor que se diferenciaría hacia mastocito. Así, mientras algunos autores sugieren que éste se originaría a partir de un precursor mieloide común CD34⁺ HLADR⁺ CD117⁺^{141,142}, otros autores han identificado un precursor de mastocito aún más inmaduro, anterior incluso al precursor común linfóide y mieloide, que expresaría CD117 de alta intensidad, la integrina $\alpha 4\beta 7$ (CD49d⁺/CD29⁺) y el receptor T1/ST2 (IL-33R), en ausencia de CD27¹⁴³⁻¹⁴⁶. La activación de los factores de transcripción *GATA-1*, *GATA-2* y *PU.1* a nivel de este precursor jugaría un papel determinante en el compromiso inicial de la CSH a mastocito^{39,136,137,145,146}. En un estadio posterior intervendrían de forma competitiva *MITF1* y *C/EBP α* ^{39,136,137}. Así, la activación de *MITF1* dirigiría la diferenciación terminal a mastocito, inhibiendo la expresión de *C/EBP α* ^{39,136,137,145,146}. De las múltiples citocinas que intervienen en este proceso modulando la expresión de factores de transcripción inducidos por *PI3K* e *IL3* merece destacar, además del SCF y de la IL3, la IL4, IL5, IL9, IL15 y TPO, citocinas que favorecen la diferenciación a mastocito¹⁴⁵⁻¹⁴⁷; por el contrario, el IFN γ , la IL6, TGF β y/o GM-CSF regulan de forma negativa la maduración a mastocito¹⁴⁸⁻¹⁵⁰.

Desde un punto de vista fenotípico, la diferenciación a granulocito eosinófilo y basófilo a partir de un precursor mieloide común CD34⁺ CD117⁺ HLADR⁺, se asocia a pérdida de reactividad para estos marcadores de inmadurez, en ausencia de positividad para cyMPO y CD64^{112,117,119,151-153}. Asimismo, la diferenciación a granulocito eosinófilo se asociaría a positividad para la peroxidasa de eosinófilo (cyEoP) y la proteína básica principal de eosinófilo a nivel citoplasmático (cyBMPEo), además de expresión en la

membrana celular de CD15, CD65, CD125, CCR3 y proteínas de la familia de Siglec (p.ej. Siglec 8)¹¹⁵. En la diferenciación terminal a granulocito eosinófilo, juega un papel determinante la IL5 producida fundamentalmente por los linfocitos T¹¹⁵. Por el contrario, la diferenciación a granulocito basófilo a partir de un precursor mieloide común CD34⁺ CD117⁺ HLADR⁺ se caracterizaría por la pérdida de reactividad para marcadores de inmadurez como CD34, CD117 y HLADR, en ausencia de expresión de cyMPO y CD64 junto con positividad intensa para CD123 y CD203c (exonucleasa NPP3) y en menor medida también CD22 y CD25, entre otros marcadores^{146,154}. Finalmente, el mastocito procedería de un precursor mieloide común o de un precursor incluso más inmaduro que, aunque pierde expresión de CD34 y HLADR, incrementa su positividad para CD117, según lo descrito anteriormente. El precursor del mastocito, expresa también de forma precoz receptores de citocinas y quimiocinas, que como CD116, CD123, CD126 y CXCR1, se pierden con la maduración^{155,156}, y CXCR2, CXCR4 e IL-4R, cuya expresión se mantiene estable durante todo el proceso madurativo^{156,157}. De forma similar, este precursor expresa también moléculas de adhesión como CD11a, CD18, CD49d o CD49e que se pierden con la maduración^{157,158}; en paralelo, adquiere expresión de CD11b, CD11c, CD49c¹⁵⁸, el receptor de alta afinidad para la IgE (FcεRI)¹⁵⁹, Siglec 6 y Siglec 8¹⁶⁰. Por el contrario, no expresa marcadores de activación asociados a linfocitos como CD2 o CD25, entre otras proteínas^{151-153,161,162}.

1.5.1.3.-Diferenciación eritroide.

Los progenitores eritroides más primitivos o unidades formadoras de “brotes” eritroides (BFU-E), mantienen una elevada tasa proliferativa en respuesta a citocinas, originando progenitores eritroides más maduros conocidos como unidades formadoras de colonias eritroides (CFU-E)¹⁶³⁻¹⁶⁷. Estas CFU-E tienen un potencial de proliferación mucho más limitado y dan lugar a precursores eritroides morfológicamente diferenciados, desde los proeritroblastos, eritroblastos basófilos, policromatófilos y ortocromáticos, hasta los reticulocitos y eritrocitos. La ruta de diferenciación a línea eritroide está regulada en todo su trayecto por la eritropoyetina (EPO), junto con la IL3, IL9, TPO, el ligando de la tirosina fetal 3 (FLT-3L) y SCF¹⁶⁸. Estas citocinas, y en particular la EPO, favorecen la proliferación de las BFU-E y la supervivencia de las

CFU-E¹⁶⁹. A nivel intracelular, estas citocinas y factores de crecimiento inducen la expresión de *GATA-1* silenciando *PU.1*^{11-13,170}. La activación de *GATA-1* y *FOG-1* favorece la diferenciación eritroide, al modular la expresión de otros factores de transcripción como las proteínas de la familia HOX (especialmente *HOXA5*, *HOXB5*, *HOXB6*, *HOXB7*), *LHX2*, *SCL* y *EKLF*^{7,11-13,170}.

Desde el punto de vista fenotípico, la línea eritroide procede también de un precursor mieloide común CD34⁺ CD117⁺ HLADR⁺ que progresivamente perdería la expresión de los marcadores de inmadurez CD34, HLADR y finalmente CD117^{117,119}. Sin embargo, a diferencia de lo que sucede con las líneas granulocítica y monocítica, el precursor eritroide pierde también reactividad para CD45 y marcadores asociados a línea mieloide como CD13 y CD33^{117,119}. En paralelo, esta célula adquiere reactividad fuerte para CD36 (receptor de trombospondina), CD71 (receptor de la transferrina) y CD235a (glicoforina A), entre otros marcadores^{117,119}. De este modo, aunque no existe una correspondencia exacta con los estadios de diferenciación definidos de acuerdo a las características morfológicas del precursor eritroide, desde un punto de vista fenotípico, se pueden identificar al menos cuatro estadios madurativos dentro de las células de línea eritroide de MO normal: 1) células eritroides CD34⁺ HLADR^{+/-} CD117⁺ CD71^{+/**} CD36^{+/**} CD105 (endoglina)^{+/**}; 2) células eritroides más diferenciadas CD34⁻ HLADR⁻ CD117⁺ CD71^{**} CD36^{**} CD105^{+/**}; 3) precursores eritroides de aspecto más maduro, menor tamaño y complejidad interna CD34⁻ HLADR⁻ CD117⁻ CD71^{**} CD36^{**} CD105^{+/-}, y finalmente; 4), reticulocitos y eritrocitos CD34⁻ HLADR⁻ CD117⁻ CD71^{+/-} CD36^{+/-} y CD105^{-117,119,171,172}.

1.5.1.4.-Diferenciación megacariocítica

Los progenitores megacariocíticos más tempranos, o unidades formadoras de brotes megacariocíticos (Meg-BFU), dan lugar a progenitores más tardíos conocidos como células formadoras de colonias megacariocíticas (Meg-CFC)^{173,174}. Mediante endomitosis (replicación del ADN sin división nuclear), secuencialmente se originan megacariocitos inmaduros y maduros, a partir de los cuales tiene lugar la formación de las plaquetas mediante la fragmentación (múltiple) del citoplasma de los megacariocitos. La TPO, junto con la IL3, IL6 e IL11, constituyen los elementos clave a la hora de regular la diferenciación

megacariocítica. Así, modulan la activación de *GATA-1*, que junto con *GFI-1B*, silencia *FOG* y *EKLF*, los principales factores de transcripción encargados de inducir la diferenciación eritroide a partir del precursor común eritroide-megacariocítico^{7,11-13,170}. Finalmente, *FLI-1* parece constituir el principal factor de transcripción involucrado en la maduración terminal del megacariocito a plaqueta, aunque en este proceso también intervienen otros genes moduladores como *PBX1B*, *PBX2*, *MPL* y *PF4*^{7,11-13,170}.

Desde un punto de vista fenotípico, al igual que sucede con la línea eritroide, el megacarioblasto procedería de un precursor mielóide común CD34⁺ CD117⁺ HLADR⁺ que al madurar perdería marcadores de inmadurez como CD34, CD117 y HLADR, además de CD45^{117,119}. La reactividad de esta célula para glicoproteínas plaquetarias como CD41, CD42a, CD42b, CD61 y CD36 favorecería la diferenciación terminal a megacariocito y plaqueta, adquiriendo progresivamente en este proceso, expresión de moléculas de adhesión vascular como CD31 (PECAM-1), tetraspaninas como CD9, o integrinas como $\alpha_{IIb}\beta_3$ (CD41/CD61) entre otras proteínas^{117,119,175,176}. En conjunto, se trata de moléculas esenciales para que en los últimos estadios de diferenciación a línea megacariocítica, las plaquetas actúen como elementos celulares funcionalmente activos y competentes¹⁷⁷.

1.5.2.- Diferenciación a célula dendrítica.

Bajo el término de célula dendrítica (CD) se incluyen varios elementos celulares del *sistema* inmune, especializados en la presentación antigénica a los linfocitos T, junto con el linfocito B y las células del *sistema* monocito/macrófago. Según sus características biológicas y funcionales distinguen al menos dos tipos diferentes de CDs: la CD clásica (CDc) y la CD plasmocitoide (CDp). Mientras que las CDc muestran más similitudes con las células mieloides, las CDp exhiben características fenotípicas y funcionales intermedias entre las células mieloides y los linfocitos. Así, algunos autores sugieren que ontogénicamente las CDc podrían tener un origen mielóide¹⁷⁸, mientras que las CDp tendrían un origen linfóide^{179,180}; otros autores sugieren que la CDc y la CDp podrían tener un origen común¹⁸¹⁻¹⁸⁴. De acuerdo con esta última hipótesis¹⁸⁴, todas las subpoblaciones de CDs hematopoyéticas humanas compartirían un ancestro común con capacidad de diferenciación restringida a granulocito neutrófilo, monocito y CD. Este precursor se

localizaría en la MO y en el cordón umbilical, estando por el contrario ausente en la sangre y los tejidos linfoides periféricos¹⁸⁴. Fenotípicamente, esta célula se caracterizaría por presentar un fenotipo de célula muy inmadura Lin^{neg} CD34⁺ CD38⁺⁺ CD117⁺ CD135 (FLT3)⁺ CD115⁺ (receptor del factor estimulante de colonias monocíticas)¹⁸¹. A medida que se diferencia, este precursor perdería su potencial de diversificación a distintas líneas, y daría lugar a un progenitor restringido a monocito y CDc; a partir de este último progenitor se originaría finalmente el precursor específico de célula dendrítica (PCD). Este PCD Lin^{neg} CD34⁺ CD38⁺⁺ CD135⁺ CD45RA⁺ CD10⁻ CD115⁻, CD116⁻ -receptor de GM-CSF⁻, CD123⁺⁺, representaría ≈2% de todas las células CD34⁺ de MO humana^{184,185} y habría perdido ya su potencial de diferenciación a monocito, de manera que sólo sería capaz de dar lugar a CDc, (CDp y CDc). El precursor de la CDc saldría de la MO, transitaría por la sangre periférica y cuando se asienta en un micromedioambiente adecuado, como el de los órganos linfoides secundarios (OLS), se diferenciaría en las dos subpoblaciones de CDc de ratón (CD8⁺ y CD8⁻)¹⁸⁵. Debido a su corta vida media^{186,187} estas dos subpoblaciones de CDc necesitarían una reposición continua por parte del precursor de MO^{188,189}. La expresión secuencial de factores de transcripción como *PU.1*, *GFI1*, *IKAROS*, *IKAROS DN*, *STAT3* y *Batf3* facilitarían la diferenciación de la CSH a CDc. En este punto, la expresión específica de factores de transcripción como *IRF8*, *ID2* Y *BALF3* llevarían a la CPc a diferenciarse a una CDc CD8⁺; por el contrario, la expresión de otros factores de transcripción como *IRF2*, *IRF4*, *RELB*, Y *RUNX3* propiciaría la diferenciación de la CDc a una CDc CD8⁻¹⁸⁵. Durante este proceso de diferenciación, algunas citocinas como GM-CSF e IL4 favorecerían la diferenciación de la CSH a DCc^{190,191}, mientras que la presencia de M-CSF y CXCL4 favorecerían la diferenciación de la CSH a una célula de línea monocito/macrófago de tipo 1 o de tipo 2, respectivamente^{192,193}.

A diferencia del proceso de maduración de las CDc que se completaría fuera de la MO, la diferenciación de las CDp se realiza enteramente en este tejido¹⁹⁴. Así, el precursor de CDp más inmaduro es una célula que se caracteriza por ser CD34⁺ CD117⁺ HLADR⁺⁺ CD4⁺ CD123⁺⁺⁺ CD36⁺ CD64^{+débil} y CD33^{+débil} CD13^{+débil}. En este proceso, la activación de factores de transcripción como *IKAROS*, *PU.1*, *IRF8*, *IRF4*, *E2-2*, *STAT5*, *XPB1*, y en menor medida también *GFI1*, inducirían la diferenciación del precursor mieloide común indiferenciado¹⁸⁵ a CDp; por el contrario, otros factores de transcripción como *ID2*, podrían controlar/inhibir la diferenciación de la CSH a CDp¹⁸⁵. Todo este proceso de diferenciación está a su vez

modulado por diferentes mediadores, entre los que destacan de forma particular GM-CSF y la IL3. Merece destacar que el precursor de CDp se ha relacionado ontogénicamente con el precursor linfoide T/NK¹⁹⁵

1.5.3.- Diferenciación a líneas celulares linfoides.

Las células linfoides incluidos los linfocitos B y T, y las células NK, tienen su origen en la CSH¹⁹⁶, en los nichos hematopoyéticos de la MO.

Los primeros estadios de diferenciación linfoide están representados por los precursores linfoides tempranos (ELP, del inglés “early lymphoid progenitors”) caracterizados por iniciar la transcripción de la recombinasa RAG1, enzima clave en la recombinación de los segmentos VDJ de los genes de las inmunoglobulinas (Ig) y del TCR (receptor de la célula T); a partir de este precursor se generan los progenitores linfoides comunes (PLCs)^{197,198}. En su mayoría, estos últimos progenitores, se diferencian en MO a precursores de linfocitos B^{199,200} y precursores de linfocitos T/NK capaces de colonizar el timo^{200,201}; además, a estos últimos precursores T/NK se les relaciona ontogénicamente con el precursor de la CDp¹⁹⁵. A nivel fenotípico, el PLC expresa CD34 junto con CD10 y la enzima nuclear deoxinucleotidil-transferasa terminal (TdT)²⁰², CD127 (IL7R α), CD38 y CD45RA, marcadores cuya expresión es especialmente intensa entre los precursores B. A este nivel, la diferenciación a precursores T/NK se caracteriza por la coexpresión de CD34, CD45RA y CD7, en ausencia de CD10 y CD127²⁰³ y suele diferenciarse ya del precursor de CDp en que este último suele mostrar positividad intensa para CD123²⁰⁴. Mientras el precursor B madura en MO a un linfocito B inmunocompetente, el precursor T/NK migra de forma temprana al timo, donde tiene lugar la diferenciación T. Respecto a la célula NK, aunque su proceso de diferenciación sigue siendo en gran medida desconocido, se cree que puede ocurrir a nivel extramedular.

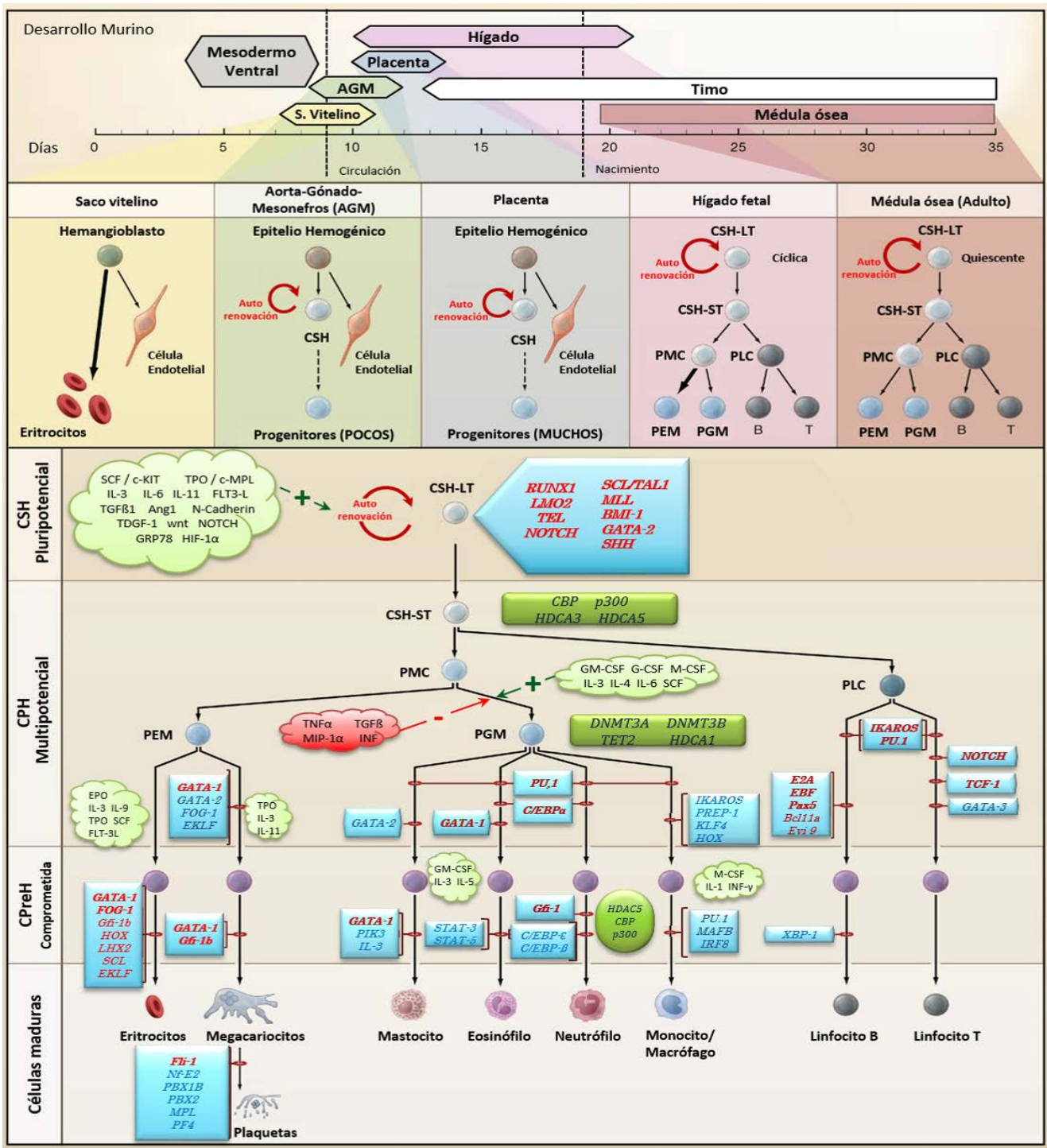


Figura 6. Principales genes, citocinas y factores epigenéticos involucrados en la proliferación, diferenciación y maduración hematopoyética. El panel superior representa los principales estadios de la hematopoyesis (murina) durante diferentes etapas del desarrollo. La CSH, derivada del mesodermo ventral, se asienta secuencialmente durante el desarrollo embrionario (inicialmente) en el saco vitelino, en la región denominada AGM (hematopoyesis "primitiva"), y (posteriormente) en el hígado fetal, la placenta (hematopoyesis definitiva) y finalmente la MO (hematopoyesis definitiva). La figura representa las características más relevantes de la hematopoyesis en cada uno de estos tejidos. En las etapas iniciales, el hemangioblasto es capaz de generar CSH y células endoteliales. La CSH se diferencia a CSH-LT que mantiene la capacidad de autorrenovación. Esta célula origina a su vez la CSH-ST. Esta última célula da lugar a los progenitores mieloides comunes (PMC) y los progenitores linfoides comunes (PLC), que dan lugar a los precursores mieloides y linfoides respectivamente, con capacidad de diferenciación terminal a células hematopoyéticas maduras mieloides y linfoides. Los factores de transcripción que gobiernan la hematopoyesis en los mamíferos están representados en el panel inferior de la figura. Los estadios del desarrollo en los que la diferenciación está bloqueada en ausencia de un factor de transcripción concreto (determinado en modelos murinos y de pez cebra) están

representados por un lazo rojo. En color rojo se identifican los factores de transcripción que se han relacionado con hemopatías malignas mieloides como LMA y/o síndrome mielodisplásico (SMD). Por el contrario, los factores de transcripción identificados en color azul oscuro son aquellos que no han demostrado potencial oncogénico ni en modelos humanos ni murinos. Entre los factores de transcripción requeridos para la producción, supervivencia y autorrenovación de la CSH, se incluyen principalmente *MLL*, *RUNX1*, *TEL/ETV6*, *SCL/TAL1* y *LMO2*. Estos genes están involucrados en alteraciones citogenéticas detectadas en pacientes con LMA y LLA. Además de los factores de transcripción que gobiernan la diferenciación de las células hematopoyéticas en los diferentes estadios madurativos, en la figura también se representan los principales factores epigenéticos que modulan la expresión o inhibición de dichos factores de transcripción, así como las citocinas producidas por las células del nicho hematopoyético, más relevantes en el control de la hematopoyesis normal. *Modificado de Orkin et al.*¹¹

1.6.- Proliferación celular durante la hematopoyesis.

Para mantener niveles constantes de células hematopoyéticas en sangre y los distintos tejidos periféricos, la producción de células hematopoyéticas desde los compartimientos más inmaduros hasta los estadios más avanzados de diferenciación de las distintas líneas, han de seguir un minucioso programa de diferenciación y proliferación durante la vida de cada sujeto. De este modo, las células regulan de forma estricta su proliferación intercalando la misma con fases de diferenciación celular descritas anteriormente en esta introducción²⁰⁵. El principal objetivo de la producción de nuevas células hematopoyéticas reside en poder responder a las necesidades derivadas de la pérdida diaria de células (de carácter fisiológico y/o patológico) y/o de estímulos fisiológicos que requieren un mayor número de las mismas; para ello, la reposición de nuevas células maduras y funcionalmente competentes se realiza a partir de los precursores más inmaduros del mismo linaje. Para alcanzar los números de células adecuados, estos precursores además de sufrir maduración deben multiplicarse. Por todo ello, el ciclo celular juega un papel determinante en la homeostasis del tejido hematopoyético²⁰⁶⁻²⁰⁹. A lo largo de la vida del individuo y según las necesidades propias de la edad, la tasa proliferativa de las células hematopoyéticas sufre modificaciones. Por ejemplo, en las primeras etapas de la vida, el objetivo primordial de la linfopoyesis es garantizar la formación de tejidos linfoides secundarios con una capacidad funcional y de reconocimiento antigénico (repertorio) amplia y adecuada^{210,211}, mientras que en etapas adultas, una vez se han formado los OLS y estos son funcionalmente competentes, la proliferación celular persigue únicamente mantener una tasa de renovación y recuperación tisular adecuada²¹¹⁻²¹⁵. En términos generales, los precursores hematopoyéticos más inmaduros son aquellos que presentan mayor capacidad proliferativa, disminuyendo esta de forma progresiva a medida que la célula se diferencia²¹⁶. A modo de ejemplo, en la diferenciación a

línea de granulocito neutrófilo, la gran mayoría de las células que se encuentran en las fases de síntesis de ADN, G₂ o mitosis del ciclo celular corresponden a mieloblastos, mientras que la tasa proliferativa de mielocito, cayado y del granulocito neutrófilo es prácticamente nula²¹⁶⁻²¹⁹.

2.- Hematopoyesis clonal.

Al igual que ocurre en general con todas las células del organismo, la CSH puede sufrir alteraciones funcionales asociadas por ejemplo al envejecimiento celular, o bien como consecuencia de un proceso patológico de distinta índole^{220,221}. En ambos casos, dependiendo del número de CSH afectadas y del tipo de alteración que éstas presenten, la hematopoyesis puede llegar a comprometerse de forma transitoria (reversible) y/ o permanente (irreversible)^{220,221}. A su vez, este compromiso de la hematopoyesis puede repercutir directamente sobre la cantidad y calidad de los diferentes elementos celulares maduros de las distintas líneas hematopoyéticas originadas a partir de la CSH alterada; por lo tanto, la alteración de la CSH puede conllevar o no citopenias, aplasia y/o displasia de una o más líneas celulares, entre otras anomalías²²⁰⁻²²⁵.

En general, la hematopoyesis puede verse afectada bien por alteraciones de los mecanismos que controlan la CSH y su homeostasis a nivel del nicho hematopoyético donde reside^{226,227} –p.ej. alteraciones que afectan a la comunicación intercelular, las vías de señalización intracelular–, por alteraciones en su capacidad proliferativa, de diferenciación y/o supervivencia, asociadas a lesiones genéticas y/o epigenéticas de la propia CSH, y relacionadas con la presencia de mutaciones somáticas y/o germinales (hematopoyesis clonal), o por una combinación de ambas²²⁸⁻²³³. En cualquiera de los casos, el equilibrio entre autorrenovación, proliferación y diferenciación de la CSH puede verse comprometido^{230,231,234-236}. A modo de ejemplo, el incremento de la producción y diferenciación de una determinada línea celular en detrimento de otras, como pueda ser la producción excesiva de eritrocitos, puede ocurrir como respuesta a una hemorragia importante, a variaciones significativas de la concentración de oxígeno en la atmósfera, o al consumo/administración de factores de crecimiento (p.ej. eritropoyetina)^{131,165,237-241}. En todas estas

situaciones, el incremento en la producción de hematíes es en principio reversible, al estar asociado a mecanismos de compensación que persiguen mantener cifras óptimas/ade cuadas de hemoglobina según las necesidades fisiológicas del individuo o los estímulos ambientales y/o farmacológicos administrados²⁴²⁻²⁵⁶. Por el contrario, en otras ocasiones, el incremento o disminución de la producción de células eritroides puede deberse a alteraciones genéticas de la CSH que condicionan una producción y diferenciación preferencial a esta línea celular, con pérdida de los mecanismos normales de regulación de la eritropoyesis como ocurre, por ejemplo, en la policitemia vera (PV) o algunos síndromes mielodisplásicos (SMD)²⁵⁷⁻²⁶¹. En estos casos, la afectación de la hematopoyesis suele asociarse además a alteraciones cualitativas de las células hematopoyéticas²⁶²⁻²⁶⁵. Clásicamente, estas alteraciones cualitativas se han evidenciado a nivel microscópico al visualizarse alteraciones en la morfología, tamaño y/o distintas características celulares y tisulares. No obstante, su especificidad es variable, dependiendo del tipo de alteración y del contexto en el que se observa. Así, las anemias carenciales por déficit de vitamina B12 se asocian a rasgos megaloblásticos, especialmente en la serie eritroide²⁶⁶⁻²⁷⁰, mientras que la presencia de neutrófilos hipogranulares se asocia habitualmente con hematopoyesis clonal y SMD^{235,271-276}.

En términos generales, la alteración genética de la CSH va asociada también a una afectación de su progenie dando lugar a un clon de células alteradas genéticamente^{235,271-275}. La expansión clonal de las células hematopoyéticas que comparten mutaciones (u otras alteraciones somáticas) en su genoma, puede tener un carácter temporal o permanente²⁷⁷. En este último caso se considera que la CSH y su progenie han sufrido una transformación neoplásica, lo cual implica la presencia de CSHs alteradas que aseguran la autorrenovación y persistencia de las células mutadas. Estas células (clonales) adquieren además un mayor potencial de transformación maligna debido a su persistencia y expansión, ya sea por su ventaja proliferativa y/o de supervivencia respecto a su contrapartida normal²⁷⁸⁻²⁸³. Finalmente, la expansión del clon tumoral provoca un desplazamiento progresivo de las células normales asociado a una alteración (también progresiva), generalmente irreversible de la hematopoyesis normal residual, asociándose dicho deterioro funcional de la hematopoyesis con el concepto de transformación maligna^{279,282,284-286}. En general, hoy se considera que las hemopatías malignas pasarían en su mayoría por un proceso evolutivo similar al descrito anteriormente, desde la afectación clonal de una CSH (o un precursor de la misma), a la

transformación neoplásica y la progresión maligna, con un desplazamiento progresivo de la hematopoyesis normal, reemplazada por la hematopoyesis clonal.

En la última década, el desarrollo y aplicación de técnicas de secuenciación masiva ha permitido identificar la presencia de mutaciones somáticas y/o germinales en células hematopoyéticas (incluida la CSH) de individuos aparentemente sanos, en los que mediante otras técnicas la hematopoyesis no estaba (aparentemente) comprometida^{284,287-290}. Cabe señalar no obstante, que con frecuencia se trata de alteraciones genéticas y moleculares características de hemopatías mieloides malignas; de hecho, un análisis detallado de este grupo de sujetos mostró una mayor incidencia en ellos de tumores malignos incluidas las hemopatías mieloides^{232,235}. Ante estos hallazgos, se cree que el desarrollo de una hemopatía maligna mieloides como la LMA, podría seguir una evolución en diferentes fases a lo largo del tiempo^{229,277,291-293}. En las primeras etapas, una o más CSH del individuo adquirirían mutaciones somáticas (sobre una base genética normal o con mutaciones germinales ya heredadas) que podrían predisponer al desarrollo de hemopatías; estas primeras alteraciones no tienen por qué proporcionar una ventaja proliferativa a la CSH alterada (fase pre-maligna)²⁹⁴⁻²⁹⁷. En una etapa posterior, la CSH pre-maligna y su progenie, podrían adquirir nuevas mutaciones conductoras (del inglés “*driver*”) que favorecerían su proliferación y/o mayor supervivencia respecto al resto de CSH no mutadas (transformación neoplásica)^{235,277}. Cuando esto ocurre, se produciría un acúmulo de células tumorales que progresivamente irían reemplazando la hematopoyesis normal (fase de expansión o crecimiento tumoral)^{235,277}. Finalmente, la adquisición de nuevas mutaciones favorecería la expansión clonal incluso fuera de la MO (fase de aceleración) y un incremento paulatino de formas inmaduras (CSH malignas) resistentes a quimioterapia, alcanzando así el paciente una fase terminal (maligna) de la enfermedad^{16,56}.

No obstante, la presencia de hematopoyesis clonal en MO se cree que podría pasar inadvertida en muchos casos y mantenerse silente en ausencia de progresión maligna, sobre todo cuando coexiste con una hematopoyesis normal preservada capaz de producir y mantener cifras normales de células hematopoyéticas funcionalmente competentes. Merece destacar que, el acúmulo progresivo de alteraciones genéticas y moleculares se traduce en la aparición de alteraciones morfológicas y fenotípicas que paulatinamente originan patrones típicos de hemopatías malignas como los SMD^{16,56}.

En este apartado de la introducción revisaremos el conocimiento actual sobre los procesos asociados a evolución clonal, transformación neoplásica y progresión maligna de las hemopatías mieloides, desde la hematopoyesis clonal de significado indeterminado (CHIP) a la LMA; en él haremos referencia específica, además, a la mastocitosis sistémica, como modelo de hemopatía mieloides idónea para el estudio de este grupo de enfermedades.

2.1.-Hematopoyesis clonal de potencial indeterminado (CHIP) y otras hemopatías mieloides pre-malignas.

Estudios recientes en los que se han empleado técnicas sensibles de secuenciación masiva han puesto de manifiesto que las células hematopoyéticas acumulan de forma secuencial una media de 1.3 mutaciones somáticas puntuales por célula y década de vida; en la mayoría de los casos, estas mutaciones no presentan trascendencia clínica^{298,299}. Así, mientras que la presencia de estas alteraciones es excepcional en individuos sanos menores de 40 años, su prevalencia por encima de los 65 años se sitúa en alrededor del 10% de la población, alcanzando el 18% de los mayores de 90 años^{229,235}. Estos hallazgos se cree que contribuyen a explicar la mayor prevalencia de hemopatías mieloides (p.ej. síndrome mielodisplásico/neoplasia mieloproliferativa –SMD/NMP– y LMA) y linfoides (p.ej. linfocitosis B monoclonales –abreviado del inglés como MBL– o gammapatías monoclonales de significado incierto –GMSI–) en individuos de edad avanzada^{235,300-302}. En este sentido, cabe señalar que los sujetos que presentan CHIP no cumplen criterios diagnósticos para ninguna hemopatía maligna, y no muestran un deterioro funcional de la hematopoyesis, aunque sus células hematopoyéticas presentan alteraciones citogenéticas y/o mutaciones puntuales características de las enfermedades antes referidas –p.ej. nulisomía del cromosoma Y en varones³⁰³, trisomía 8³⁰⁴, del(20)³⁰⁵⁻³⁰⁷ o mutaciones de *TET2*, *SF3B*, *RUNX1*, *TP53*, *ASXL1* o *DNMT3A*, entre otras³⁰⁸–. No obstante, aunque la prevalencia de estas alteraciones en sujetos de edad avanzada sea tan elevada, la tasa de progresión a SMD o LMA se estima sería inferior al 1% de casos al año^{229,230,292,309}, lo cual sugiere que estas alteraciones genéticas, por sí mismas, no serían suficientes para el desarrollo de dichas enfermedades^{224,229,230,235,309,310}.

Recientemente, algunos autores han acuñado el término de CHEP (hematopoyesis clonal de potencial clínico evidente, abreviado del inglés como “CHEP”) para referirse, dentro de los sujetos con CHIP a un subgrupo de individuos con mayor potencial de evolución clínica. Así, con esta denominación, se pretende diferenciar a aquellos sujetos que presentan hematopoyesis clonal asociada a mutaciones genéticas con un bajo potencial de evolución clínica–p.ej. *TET2*, *DNMT3A* y *AXSL1*, entre otras– (CHIP), de individuos portadores de lesiones genéticas que por el contrario, se asocian con progresión y manifestaciones clínicas –*BCR-ABL1p210* y *JAK2 V617F*, entre otras– (CHEP)²⁷⁷ (Tabla 2). Desde un punto de vista práctico, para identificar aquellos sujetos que presentan CHIP y CHEP, se definen una serie de parámetros entre los que se incluyen: i) ausencia de evidencia morfológica de una neoplasia hematológica; ii) ausencia de criterios clínicos y biológicos de hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), GMSI y MBL, y; iii) presencia de una mutación somática asociada a alguna hemopatía maligna (p.ej. mutación de los genes *TET2*, *DNMT3A*, *AXSL1*, *JAK2*, *TEP53*, *SRSF2*, entre otros) con una carga alélica $\geq 2\%$ ^{229,311}. Como hemos referido anteriormente, el tipo concreto de lesión genética detectada en estos sujetos ayudaría a distinguir entre sujetos con CHIP y con CHEP (Tabla 1).

Tabla 1. CHIP vs CHEP. Alteraciones genéticas y moleculares detectadas en individuos sanos y asociadas a bajo vs. moderado potencial de progresión a hemopatía.

Subtipo diagnóstico	Alteración genética	Hemopatía asociada
CHIP	Mutación de <i>TET2</i>	Neoplasia mieloide
	Mutación de <i>DNMT3A</i>	Neoplasia mieloide
	Mutación de <i>GNAS</i>	Neoplasia mieloide
	Mutación de <i>AXSL1</i>	Neoplasia mieloide
	Mutación de <i>SF3B1</i>	Neoplasia mieloide
	Mutación de <i>PPM1D</i>	Neoplasia mieloide
	Reordenamiento <i>IGH</i>	Neoplasia B
	Reordenamiento <i>TCR</i>	Neoplasia T
	–Y	Neoplasia mieloide
CHEP	<i>BCR-ABL1 p210</i>	LMC
	<i>JAK2 V617F</i>	NMP
	<i>FIP1L1-PDGFR</i> , del <i>CHIC2</i>	LEC/SHE
	<i>KIT D816V</i>	SM
	<i>RUNX1-RUNX1T1</i>	LMA
	<i>CBFB-MYH11</i>	LMA
	Mutación de <i>FLT3-ITD</i>	LMA
	Mutación de <i>KRAS</i> y <i>HRAS</i>	LMA
	<i>BCL2-IGJ(H)</i>	FL
	<i>IGH-CCND1</i>	MCL
	-7, +8, 5q-...	SMD/LMA
	t(8;21), inv(16)	LMA
	t(9;22)	LMC
	t(14;18)	LF
	t(11;14)	LCM
	t(8;14)	LB

CHIP, hematopoyesis clonal de potencial indeterminado; **CHEP**, hematopoyesis clonal de potencial clínico evidente; **LMC**, leucemia mieloide crónica; **NMP**, neoplasia mieloproliferativa; **LEC/SHE**, leucemia eosinofílica crónica/síndrome hipereosinofílico; **SM**, mastocitosis sistémica; **LMA**, leucemia mieloide aguda; **LF**, linfoma folicular; **LCM**, linfoma de células del manto; **LB**, linfoma de Burkitt. Modificado de Valent et al.^{235,277}

En paralelo, se ha identificado también otro grupo de sujetos en los que se observan citopenias mantenidas y/o rasgos displásicos sin que estos alcancen a cumplir los criterios diagnósticos para hemopatía maligna, por ejemplo, para SMD^{52,89,91-93}. Ante esta situación y la gran variabilidad de las alteraciones detectadas, recientemente se ha propuesto una clasificación para estos individuos en la que se definen tres entidades diagnósticas que se sumarían a la anteriormente mencionada hematopoyesis clonal de potencial indeterminado (CHIP) o de potencial clínico evidente (CHEP)²³⁵: i) citopenia idiopática de significado incierto (abreviado del inglés como "ICUS")^{273,310,312,313}; ii) displasia idiopática de significado incierto (abreviado del inglés como "IDUS")^{273,310,312-314}, y; iii) citopenia clonal de significado incierto (abreviado del inglés como "CCUS")^{273,310,312,313}. Estos sujetos se diferenciarían de aquellos individuos que presentan CHIP (o CHEP) por la presencia de citopenias y/o rasgos displásicos de tipo morfológico y/o fenotípico, asociados o no a marcadores genéticos/moleculares de clonalidad (Tabla 2).

Tabla 2: Características clínicas y biológicas que diferencian los SMD de entidades asociadas a hematopoyesis clonal asociada o no a citopenias y displasia.

Variable						SMD (OMS 2008)	
	ICUS NO CLONAL	IDUS	CHIP	CHEP	CCUS	SMD bajo riesgo	SMD-alto riesgo
Clonalidad	-	-	+	+	+	+	+
Mutación pasajera	-/+	-/+	+	-/+	-/+	-/+	+
Mutación conductora	-	-	-	+	-/+	-/+	+
Cariotipo anormal	-	-	-	-/+	-/+	-/+	+
Displasia MO	-	-	-	-	-	+	+
Citopenias	+	+	-	-	+	+	+
% de Blastos en MO	<5%	<5%	<5%	<5%	<5%	<10%	<19%
Riesgo pronóstico	Muy bajo	Muy bajo	Muy bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Alto

ICUS, citopenia idiopática de significado incierto; **CHIP**, hematopoyesis clonal de potencial incierto; **CHEP**, hematopoyesis clonal de potencial clínico evidente; **CCUS**, citopenia clonal de significado incierto; **SMD**, síndrome mielodisplásico. *Modificado de Steensma* ^{235,277}

En todos estos sujetos, la evaluación del riesgo de progresión a SMD u otra hemopatía requiere de un análisis citomorfológico, fenotípico y molecular detallado²²⁸. Así, hoy se reconoce que mientras que la identificación de alteraciones displásicas se asocia con un mayor riesgo de progresión, la ausencia de mutaciones somáticas mediante técnicas de secuenciación masiva tiene un alto valor predictivo negativo³¹⁵⁻

³¹⁸. En cualquier caso, en estos sujetos se recomienda adoptar una conducta expectante, y actuar sólo en aquellos casos que presenten citopenias, si las circunstancias lo requieren. En esta situación, el abordaje terapéutico tiene como objetivo primordial mejorar los síntomas de la citopenia (habitualmente la anemia) mediante el empleo por ejemplo, de factores de crecimiento, y retrasar en lo posible la evolución de la enfermedad^{235,275}.

2.2.- Neoplasias de la célula *stem* hematopoyética.

Aunque no existe una delimitación clara entre cuales serían con exactitud las neoplasias que afectan a la CSH y aquellas que involucran de forma preferencial a su progenie más diferenciada, en la actualidad se considera que la práctica totalidad (o la inmensa mayoría) de las hemopatías malignas mieloides, incluidas las leucemias agudas de línea ambigua, constituirían neoplasias de la CSH; por el contrario, la afectación de la CSH sería mucho menos frecuente entre las neoplasias linfoides.

2.2.1.- Hemopatías malignas mieloides.

En la clasificación actual de la Organización Mundial de la Salud (OMS)³¹⁹, las hemopatías malignas mieloides se dividen en siete grandes grupos diagnósticos de acuerdo con las características clínicas, morfológicas, fenotípicas y genéticas/moleculares que presentan: i) neoplasias mieloproliferativas (NMP); ii) mastocitosis; iii) neoplasias mieloides y linfoides con eosinofilia y alteración de los genes *PDGFRA*, *PDGFRB* y *FGFR1*; iv) neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas (SMD/NMP); v) síndromes mielodisplásicos; vi) neoplasias mieloides con predisposición germinal, y; vii) leucemias mieloides agudas y neoplasias relacionadas. En conjunto, en estos siete grupos quedan incluidas un total de 75 entidades distintas (Tabla 3). No obstante, aunque disponemos de criterios bien definidos para la clasificación diagnóstica de las hemopatías mieloides, con relativa frecuencia resulta difícil la distinción entre dos o más entidades, especialmente en aquellos pacientes en los que se observan rasgos intermedios (p.ej. de progresión) entre ellas.

Tabla 3. Clasificación actual de las hemopatías malignas mieloides según la OMS (2016²⁷⁶)

Neoplasias mieloproliferativas (NMP)	Leucemia mieloide crónica, <i>BCR-ABL1</i> -positiva Leucemia crónica de neutrófilos Policitemia Vera Mielofibrosis primaria (MFP) MFP prefibrótica/estadio precoz MFP en estadio fibrótico Trombocitemia esencial Leucemia crónica de eosinófilos sin otra especificación Neoplasia mieloproliferativa inclasificable
Mastocitosis	
Mastocitosis cutánea	Mastocitosis cutánea máculo papular (MCMP) Mastocitosis cutánea difusa (MCD) Mastocitoma cutáneo
Mastocitosis sistémica	Mastocitosis sistémica indolente (MSI) Mastocitosis sistémica "smoldering" (SSM) Mastocitosis sistémica con neoplasia hematológica asociada Mastocitosis sistémica agresiva (MSA) Leucemia de mastocitos (MCL)
Sarcoma de mastocitos	
Neoplasias mieloides/linfoides con eosinofilia y anomalías de <i>PDGFRA</i>, <i>PDGFRB</i>, o <i>FGFR1</i>, o con <i>PCM1-JAK2</i>	Neoplasia mieloide/linfoide con reordenamiento de <i>PDGFRA</i> Neoplasia mieloide/linfoide con reordenamiento de <i>PDGFRB</i> Neoplasia mieloide/linfoide con reordenamiento de <i>FGFR1</i> <i>Entidad provisional</i> : Neoplasia mieloide/linfoide con mutación de <i>PCM1-JAK2</i>
Neoplasias mielodisplásica/mieloproliferativa (SMD/NMP)	Leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) Leucemia mieloide crónica atípica <i>BCR-ABL1</i> -negativa Leucemia mielomonocítica juvenil MDS/MPN con sideroblastos en anillo y trombocitosis (MDS/MPN-RS-T) MDS/MPN inclasificable
Síndromes mielodisplásicos (SMD)	SMD con displasia unilineal SMD con sideroblastos en anillo SMD con sideroblastos en anillo y displasia unilineal SMD con sideroblastos en anillo y displasia multilineal SMD con displasia multilineal SMD con exceso de blastos SMD con del(5q) aislada SMD inclasificable <i>Entidad provisional</i> : Citopenia refractaria juvenil
Neoplasia mieloide con predisposición germinal (NMPG)	
NMPG sin otra enfermedad ni disfunción orgánica previa	LMA con mutación germinal de <i>CEBPA</i> Neoplasia mieloide con mutación germinal de <i>DDX41</i>
NMPG y trombocitopatía previa	Neoplasia mieloide con mutación germinal de <i>RUNX1</i> Neoplasia mieloide con mutación germinal de <i>ANKRD26</i> Neoplasia mieloide con mutación germinal de <i>ETV6</i>
NMPG y otra disfunción orgánica	Neoplasia mieloide con mutación germinal de <i>GATA2</i> Neoplasia mieloide asociada a síndromes de fallo medular (MO) Neoplasia mieloide asociada a trastornos de la telomerasa Leucemia mielomonocítica juvenil asociada a neurofibromatosis, síndrome de Noonan o enfermedades similares al síndrome de Noonan Neoplasia mieloide asociada a síndrome de Down
Leucemia mieloide aguda (LMA) y neoplasias relacionadas	
LMA con alteraciones citogenéticas recurrentes	LMA con t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> LMA con inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> LMA con <i>PML-RARA</i> LMA con t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLL3-KMT2A</i> LMA con t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> LMA con inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i> LMA (megacarioblástica) con t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKL1</i> <i>Entidad provisional</i> : LMA con <i>BCR-ABL1</i> LMA con mutación de <i>NPM1</i> LMA con mutación bialélica de <i>CEBPA</i> <i>Entidad provisional</i> : LMA con mutación de <i>RUNX1</i>
LMA asociada a cambios de mielodisplasia	

Tabla 3 (continuación). Clasificación actual de las hemopatías malignas mieloides según la OMS (2016²⁷⁶)

Neoplasia mieloide asociada a terapia	
LMA sin otra especificación	LMA con diferenciación mínima LMA sin maduración LMA con maduración Leucemia mielomonocítica aguda Leucemia monoblástica/monocítica aguda Leucemia eritroide pura Leucemia megacarioblástica aguda. Leucemia aguda de basófilos. Panmielosis aguda con mielofibrosis.
Sarcoma mieloide. Neoplasia mieloproliferativa asociada a Síndrome de Down.	Mielopoyesis anormal transitoria. Leucemia mieloide asociada a Síndrome de Down.
Leucemia aguda de linaje ambiguo	Leucemia aguda indiferenciada. Leucemia aguda de fenotipo mixto con t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> . Leucemia aguda de fenotipo mixto con t(v;11q23.3); reordenamiento de <i>MLL</i> . Leucemia aguda de fenotipo mixto linfoide/mieloide sin especificar
Neoplasia de blastos de célula dendrítica plasmocitoide	

2.2.1.1.- Síndromes mielodisplásicos (SMD).

Los SMD constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades mieloides malignas de naturaleza clonal, que tienen su origen en una CSH genéticamente alterada^{263,320,321}. En la actualidad se considera que la transformación maligna en pacientes con SMD va asociada a un acúmulo escalonado de lesiones genéticas en la CSH tumoral, cuya progenie tiene características clonales asociadas a rasgos displásicos y una función alterada, debido en parte a alteraciones madurativas^{263,322-324}. Los distintos subclones de células tumorales coexistentes desplazan progresivamente la hematopoyesis normal, sin que se conozcan con precisión los motivos y/o mecanismos implicados en su expansión preferencial. El acúmulo de lesiones genéticas secundarias, junto a un aumento de la apoptosis intramedular³²⁵⁻³²⁸, acaban por traducirse en una hematopoyesis ineficaz, asociada a la presencia de hiper celularidad medular y citopenias periféricas de grado variable. Actualmente, el diagnóstico de los SMD se fundamenta en gran medida en la presencia de displasia morfológica en >10% de las células de al menos una de las líneas celulares hematopoyéticas mayoritarias (líneas eritroide, granulocítica y megacariocítica)³²⁹, asociada habitualmente a la presencia de citopenias periféricas mantenidas y/o de alteraciones citogenéticas características de la enfermedad^{263,321}.

Aunque los SMD pueden afectar también a niños, en la mayoría de los casos se diagnostican en adultos de edad avanzada^{330,331}, con predominio en varones (ratio entre 2/1 y 5/1 según las series reportadas^{332,333}). Cerca del 90% de los SMD son de etiología desconocida (SMD “*de novo*”) y sólo en una minoría de los pacientes ($\leq 10\%$) se identifican factores patogénicos como la exposición a sustancias químicas (p.ej. agentes quimioterápicos, tabaco, benceno) y radiaciones ionizantes, entre otros^{334,335} (SMD secundarios). No obstante todo lo anterior, la existencia de displasia morfológica en los precursores hematopoyéticos de MO no constituye una alteración específica de los SMD, al asociarse también a otras enfermedades de base genética como la anemia de Fanconi, las talasemias o las porfirias congénitas, o incluso a enfermedades de otro tipo, como enfermedades autoinmunes (p.ej. lupus eritematoso sistémico), -infecciones víricas (p.ej. infecciones por el parvovirus B19 o el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)-, déficits vitamínicos (p.ej. de vitamina B12 y ácido fólico) y alteraciones de la homeostasis de metales como el cobre^{271,275,336-341}; algunos autores han sugerido incluso la posible existencia de una asociación entre displasia hematopoyética y la edad^{330,146,147}.

2.2.1.1.1.-Características morfológicas de las células tumorales en los SMD.

El fallo en la producción de células hematopoyéticas característico de los SMD se acompaña habitualmente de una MO hiper o normocelular; sólo en una minoría de los pacientes, la MO es hipoplásica^{264,329,342-347}. No obstante, se observan alteraciones morfológicas cualitativas características, en al menos una de las tres líneas celulares hematopoyéticas mayoritarias (líneas eritroide, megacariocítica y de granulocito neutrófilo). En general, estas alteraciones pueden afectar al tamaño celular, a la estructura de las membranas citoplasmática y nuclear, al aspecto del núcleo y/o al contenido (granular) citoplasmático^{263,271,272,329,337}. De forma específica, los cambios diseritropoyéticos se definen por la presencia de puentes internucleares, irregularidades en el contorno nuclear de los eritroblastos, presencia de núcleos múltiples, cariorrexis, cambios megaloblásticos, mitosis anómalas, presencia de cuerpos de *Höwell-Jolly* y/o de punteado basófilo a nivel citoplasmático, y una distribución anómala de la hemoglobina o del hierro en forma de sideroblastos en anillo^{29,46,49,58,329}. A su vez, la displasia megacariocítica incluye la

presencia de cambios en el tamaño celular, (p.ej. presencia de micromegacariocitos) y de alteraciones en la segmentación nuclear, con núcleos dispersos y/o hiposegmentados (p.ej. monolobulados o bilobulados)^{29,46,49,58,329}. Finalmente, la disgranulopoyesis se caracteriza principalmente por la presencia de alteraciones en el tamaño celular (p.ej. gigantismo), defectos en la segmentación nuclear (p.ej. hipersegmentación, hiposegmentación o *pseudo Pelger-Hüet*), y modificaciones estructurales del núcleo (p.ej. núcleo en anillo, núcleo en espejo, alteración del grado de condensación de la cromatina o “*clumping*” cromatínico, o la presencia de apéndices y bolsillos nucleares); además, pueden observarse alteraciones en la granulación citoplasmática asociadas por ejemplo, a granulación gigante (p. ej. anomalías tipo *pseudo-Chediak-Higashi*), hipogranularidad (incluso agranularidad) y presencia de bastones de Auer o cuerpos de *Döhle*, entre otras anomalías^{29,46,49,58,329}.

2.2.1.1.2.-Características genéticas y moleculares de las células tumorales en los SMD.

Actualmente se cree que las alteraciones morfológicas observadas en las células tumorales de pacientes con SMD estarían directamente relacionadas con la presencia de alteraciones genéticas y moleculares en las mismas. En este sentido, desde hace tiempo se sabe que alrededor de la mitad de los SMD presentan un cariotipo alterado, siendo la frecuencia de alteraciones cariotípicas superior en los SMD secundarios (alrededor del 80% de los casos) respecto a los SMD “*de novo*”³⁴⁸⁻³⁵⁰. Además, en aquellos casos en los que la citogenética no es concluyente o que muestran un cariotipo normal, hoy se sabe que suelen existir alteraciones moleculares submicroscópicas que incluyen mutaciones puntuales, microdeleciones, y amplificaciones genéticas, e incluso alteraciones epigenéticas, claves tanto para el diagnóstico de la enfermedad^{222,322,351,352}, como para su clasificación pronóstica y el conocimiento de su patogenia.

De acuerdo con la importante heterogeneidad clínica y biológica de la enfermedad, hasta la fecha se han definido cerca de 700 (n=684) patrones distintos de alteración citogenética en SMD³⁴⁸. Dentro de las alteraciones citogenéticas más frecuentes merece destacar la deleción (total o parcial) de los cromosomas 5 y/o 7-p.ej. del(5q) o del(7q31), respectivamente- y la trisomía del cromosoma 8 (+8), alteraciones que están presentes en cerca de la mitad de los SMD y que representan el 70% de todas las

alteraciones citogenéticas identificadas^{222,322,348,351,352}. Además de estas anomalías, son relativamente frecuentes también la del(20q) y la nulisomía del cromosoma Y (-Y)^{32,59,62-64}. Con menor frecuencia, en los SMD también se observan alteraciones citogenéticas que afectan a los cromosomas 1 (+1; +1q), 3 -inv(3); t(3q)-, 11 -del(11q); +11-, 12 -del(12p)-, 13 -del(13q); -13-, 17 -del(17p); -17-, 18 -del(18q); -18- y 21 (-21; +21), entre otras anomalías^{32,59,62-64}. En general, todas estas alteraciones pueden aparecer de forma aislada o combinadas entre sí, asociándose con frecuencia un mayor número de alteraciones citogenéticas (en especial la presencia de cariotipos complejos) a un peor pronóstico de la enfermedad (Figura 7).

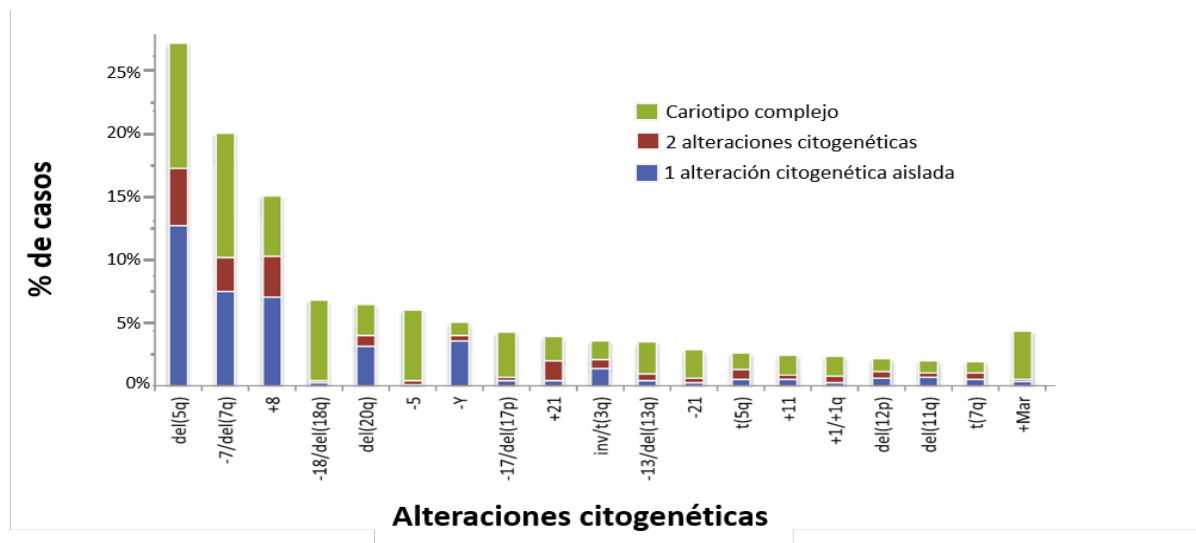


Figura 7: Alteraciones citogenéticas recurrentes en SMD. La frecuencia de las alteraciones citogenéticas recurrentes está basada en 1081 pacientes diagnosticados de SMD. *Modificada de A. Giagounidis, D. Haase et al²⁶³*

Más recientemente, la incorporación de las técnicas moleculares al estudio de los SMD ha contribuido a incrementar el número de SMD que presentan alteraciones genéticas hasta cerca del 90% de los casos. Además, estos estudios han facilitado también profundizar aún más si cabe, en el conocimiento de la heterogeneidad genética de la enfermedad, mejorar la clasificación de las alteraciones encontradas según sean anomalías primarias y secundarias (de acuerdo con los distintos modelos de evolución clonal al que se ajusten) y refinar la estratificación pronóstica de los pacientes³¹⁵⁻³¹⁸. En este sentido, con las nuevas herramientas moleculares de secuenciación masiva (NGS) –del inglés “next generation sequencing”–, se ha demostrado que $\approx 90\%$ de los SMD albergan mutaciones puntuales, incluyendo también la mayoría ($\approx 66\%$) de los SMD que presentan un cariotipo normal³⁵³. Estas mutaciones habitualmente afectan a genes implicados en procesos de diferenciación y señalización celular, la regulación del ciclo

celular, la apoptosis, el *splicing* del ARN y la traducción de ARNm a proteínas, además de cambios epigenéticos (Tabla 4).

Tabla 4. Mutaciones genéticas recurrentes más frecuentes en SMD, agrupadas de acuerdo a su impacto funcional y significado pronóstico.

Función celular afectada	Gen involucrado	Frecuencia (%)	Impacto pronóstico*
Proliferación celular	<i>NRAS</i>	4%	
	<i>JAK2</i>	3%	
	<i>CBL</i>	2%	
	<i>KRAS</i>	1%	
	<i>GNAS</i>	<1%	
	<i>PTEN</i>	<1%	
	<i>PTPN11</i>	<1%	
	<i>CDKN2A</i> <i>BRAF</i>	<1%	
Regulación epigenética	<i>TET2</i>	21%	
	<i>ASXL1</i>	14%	Adverso
	<i>DNMT3A</i>	8%	Adverso
	<i>EZH2</i>	6%	Adverso
	<i>IDH1/2</i>	2%	
	<i>UTX</i>	1%	
	<i>ATRX</i>	<1%	
Diferenciación celular	<i>RUNX1</i>	9%	Adverso
	<i>SETBP1</i>	7%	
	<i>ETV6</i>	3%	
“Splicing” del ARN	<i>SF3B1</i>	22%	
	<i>SRSF2</i>	11%	
	<i>U2AF1</i>	8%	
	<i>ZRSR2</i>	5%	
	<i>SF1</i>	1%	
	<i>SF3A1</i>	1%	
	<i>PRPF40B</i>	1%	
	<i>U2AF65</i>	<1%	
Otras funciones	<i>TP53</i>	8%	Adverso
	<i>STAG2</i> y otras cohesinas	5%-10%	
	<i>NPM1</i>	2%	

*Valor pronóstico independiente de acuerdo con la clasificación pronóstica IPSS. Cabe señalar que algunas mutaciones se asocian con subtipos diagnósticos concretos de SMD; así, las mutaciones de *SF3B1* aparecen en > 50% de pacientes con citopenia refractaria con sideroblastos en anillo (CRSA), las mutaciones de *ATRX* son más frecuentes en SMD asociados a α -talasemia, y las mutaciones de *SRSF2* son características de las neoplasias mieloproliferativas crónicas asociadas a síndrome mielodisplásico (SMD/NMP) especialmente de la LMMC. Modificado de Scheinberg et al³⁵⁴ y de Steensma et al²⁷⁵

Así, entre las mutaciones somáticas más frecuentes en SMD se incluyen: i) mutaciones que afectan al “espliceosoma” o sistema de “splicing”, encargado de la traducción de la información del ADN a ARN y que están presentes en cerca de la mitad de los SMD³⁰⁸ afectando entre otros, a los genes *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1* y *ZRSR2*; ii) mutaciones que afectan a la regulación epigenética (principalmente las mutaciones de los genes *TET2*, *ASXL1*, *DNMT3A* y *EZH2*)³⁰⁸, y en menor frecuencia; iii) mutaciones asociadas a genes relacionados

con la diferenciación celular, como *RUNX1* y *SETBP1*, entre otros, y; iv) mutaciones asociadas a genes relacionados con otras funciones celulares importantes en cáncer, como las mutaciones de los genes *TP53*, *STG2* y *NRAS*³⁰⁸.

En la actualidad se piensa que muchas de las alteraciones genéticas antes referidas podrían constituir eventos primarios en el desarrollo de los SMD, al estar presentes en la totalidad de las células tumorales^{223,228,263,308,312,348,355-362}. A su vez, los estudios moleculares han puesto también de manifiesto la gran variabilidad genética de los SMD en lo que a alteraciones primarias se refiere, ya que cada una de ellas afecta a un porcentaje relativamente pequeño de todos los pacientes^{223,228,263,308,312,348,355-362}.

Según las hipótesis más aceptadas, estas alteraciones genéticas primarias ocurrirían en la CSH, provocando en ésta un mayor grado de inestabilidad genética asociado a una mayor predisposición a sufrir y acumular mutaciones (secundarias) adicionales. Dependiendo del patrón de alteraciones acumulado, en ocasiones, este proceso llevaría a la progresión de la enfermedad; no obstante, los patrones de evolución clonal asociados a SMD reflejan también una gran variabilidad/heterogeneidad³⁵⁰ que dificulta la identificación de patrones recurrentes de evolución clonal asociados a progresión. Aun así, hoy se sabe que de acuerdo con esta hipótesis, el número de mutaciones somáticas detectadas en un mismo paciente es inversamente proporcional a la supervivencia global y al tiempo libre de transformación a LMA³²³, y se han identificado al menos 25 mutaciones puntuales en SMD que se reconoce estarían asociadas con un pronóstico adverso. Así, diferentes estudios han puesto de manifiesto que las alteraciones de los genes *TET2* (21%-90), *ASXL1* (14%-63), *RUNX1* (9%-38), *TP53* (8%-33) y *EZH2* (7%-28), constituyen las alteraciones moleculares más prevalentes en SMD^{222,308,323}. De ellas, la mutación de *TP53* se ha relacionado con un peor pronóstico cuando se asocia a SMD con del(5q) aislada (síndrome 5q-) o SMD con cariotipo complejo^{363,364}; por el contrario, la afectación del gen *SF3B1* es típica de pacientes con citopenia refractaria con sideroblastos en anillo, asociándose a un pronóstico más favorable^{365,366}. Por otra parte, las mutaciones de *TET2* y *ETV6* se han asociado con alteraciones del cromosoma 7, las anomalías de *RUNX1* con del(5q), las alteraciones de *ASXL1* con del(20q) y las mutaciones de *JAK2*, *CBL* y *NRAS/KRAS/BRAF* con la presencia de trisomía 8²²² (Figura 8).

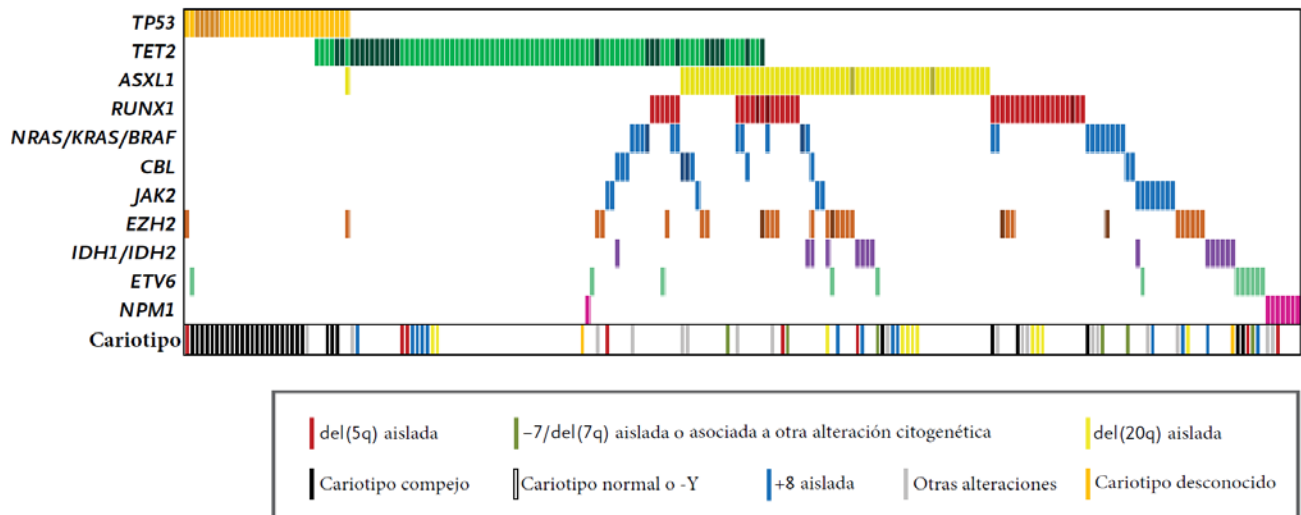


Figura 8. Asociación existente entre mutaciones genéticas concretas y alteraciones cromosómicas características de los SMD basada en una serie de 223 SMD con al menos una alteración (Béjar et al²²²) Cada barra representa un individuo y los distintos colores reflejan cariotipos asociados a las diferentes mutaciones genéticas identificadas. Las barras en negro representan casos con más de 3 alteraciones citogenéticas. El cariotipo global de cada paciente está representado en la fila inferior. Los casos identificados con color blanco corresponden a cariotipos normales mediante técnicas de citogenética convencional.

2.2.1.1.3.-Características fenotípicas de las células tumorales en los SMD.

Desde hace tiempo se conoce que las alteraciones morfológicas y genéticas de las células tumorales de pacientes con SMD, con relativa frecuencia muestran además un amplio abanico de aberraciones fenotípicas³⁶⁷⁻³⁶⁹. La estrecha asociación existente entre dichas aberraciones fenotípicas y los SMD, ha llevado a que los estudios fenotípicos por CMF hayan adquirido una relevancia creciente en el diagnóstico de la enfermedad^{319,370-372}.

Al igual que ocurre con las alteraciones morfológicas y citogenéticas/moleculares, se han descrito un gran número de alteraciones fenotípicas asociadas a SMD. Dichas aberraciones afectan tanto a los compartimentos de células hematopoyéticas más representados (Tabla 5) como a poblaciones celulares minoritarias de SP y/o MO que con frecuencia pasan desapercibidas en los análisis citomorfológicos convencionales^{132,372,373}. Esta diversidad de alteraciones fenotípicas, unida a la escasa estandarización metodológica en lo que a su detección (e interpretación de los resultados) se refiere, han contribuido sin duda a retrasar la incorporación del inmunofenotipo a la rutina diagnóstica de los SMD. Ante esta situación, en los últimos años se ha realizado un importante esfuerzo en la estandarización metodológica, en especial en lo que se refiere a los protocolos de marcaje celular, los clones de anticuerpos y los conjugados de

fluorocromos empleados, las condiciones de los equipos de medida, e incluso los paneles de combinaciones de anticuerpos utilizados^{121,122,374,375} y las aproximaciones empleadas para el análisis e interpretación de los datos fenotípicos¹²¹. Todo ello ha llevado al reconocimiento de la utilidad de los estudios inmunofenotípicos por CMF en el diagnóstico y estratificación pronóstica de los SMD, aunque queda por definir con mayor precisión cómo debe incorporarse esta información en las clasificaciones ya establecidas^{27,83-85}. En paralelo se han establecido *sistemas* (simples) de puntuación que aunque han demostrado una elevada especificidad, tienen una sensibilidad diagnóstica relativamente limitada entre los SMD de bajo riesgo³⁷⁶⁻³⁷⁸

En términos generales, la identificación de aberraciones fenotípicas asociadas a SMD requiere de un conocimiento del fenotipo de la CSH normal y de su progenie de MO (sección 1.5 de esta introducción). Sólo de esta forma podemos identificar aquellas desviaciones de la normalidad que son características de los SMD, y, por lo tanto, con impacto diagnóstico. En general, las aberraciones fenotípicas presentes en SMD incluyen: i) bloqueos madurativos (p.ej. alteraciones del porcentaje de células en distintos estadios madurativos asociados a un incremento de formas inmaduras, dentro de una o más líneas celulares hematopoyéticas, incluidos los precursores CD34+); ii) asincronismos madurativos asociados a expresión temprana de marcadores característicos de estadios avanzados de diferenciación o viceversa; iii) niveles alterados de expresión (hiper o hipo expresión) de un antígeno (p.ej. células de línea de granulocito neutrófilo CD10+ con expresión intensa de CD64 o monocitos HLADR-, entre otros) y; iv) patrones de expresión de marcadores asociados a una o más líneas de células hematopoyéticas, en otra línea donde habitualmente no se expresan dichos marcadores (p.ej. células mieloides que expresan marcadores asociados a línea linfoide como la expresión aberrante de CD56, CD7 o CD19 en precursores de granulocito neutrófilo y/o monocito)^{371,372,379-381} (Tabla 5). Al igual que ocurre con las alteraciones genéticas/moleculares de los SMD y la morfología de las células tumorales, se han descrito también algunas asociaciones entre alteraciones inmunofenotípicas concretas y los patrones citogenéticos específicos de la enfermedad^{376,382,383,384}. Así, a modo de ejemplo, se ha referido que los pacientes con SMD y alteraciones citogenéticas de pronóstico intermedio o adverso como del(7q)/-7, presentan un mayor número de alteraciones inmunofenotípicas, mientras que los pacientes con alteraciones citogenéticas favorables,

como la +8, del(20q) o nulisomía Y habitualmente muestran un menor número de aberraciones inmunofenotípicas en MO^{376,382,383,384}.

Tabla 5. Alteraciones fenotípicas características de los SMD.

Precusores mieloides CD34+	Precusores de granulocito neutrófilo	Precusores monocíticos	Precusores eritroides	Precusores linfoides B
DISTRIBUCIÓN CELULAR ALTERADA				
↑ o ↓ ratio mieloides / linfoide	↑ o ↓	↑ o ↓	↑	↑ o ↓
PATRONES MADURATIVOS ALTERADOS				
↓SSC	↓SSC	↓SSC	↓SSC	↓SSC
↑ o ↓ CD45	CD45 anormal	↓CD45	↑ CD45	
↓ o CD13 ⁺ homogéneo	↑ células inmaduras	↑ células inmaduras	↓CD71	
↓ o CD33 ⁺ homogéneo	↓ o CD33 homogéneo	↓ o CD33 heterogéneo	Patrón CD71/CD235a alterado	
CD34 ⁺ homogéneo	Patrón CD11b/CD13 alterado	Patrón CD11b/HLA-DR alterado		↓ o CD34 ⁺ homogéneo
CD117 ⁺ homogéneo	Patrón CD16/CD13 alterado	↓HLADR		CD117 ⁺
EXPRESIÓN ASINCRÓNICA DE MARCADORES				
CD11b ⁺	CD34 ⁺	CD34 ⁺	H-ferritina anormal	
CD15 ⁻	CD15 ⁻ /+débil	CD15 ⁺ homogéneo	M-ferritina anormal	
HLA-DR ⁺ homogéneo	HLA-DR ⁺	↓ o CD13 ⁻	↑ o ↓CD105	
CD36 ⁺ homogéneo	CD36 ⁺	↓ o CD36 ⁻	↓ o CD36 ⁻ /heterogéneo	
TdT ⁺	CD10 ⁺ /CD16 ⁻	↓ o CD14 ⁻	↓ o CD71 ⁻ /heterogéneo	
CD41/CD42b/CD61 ⁺	CD64 ⁺ homogéneo	↓ o CD64 ⁻		
↓CD38	↓CD66c	↓ o CD11c ⁻		
CD4 ⁺ homogéneo		↓ o CD300e ⁻		
EXPRESIÓN DE MARCADORES DE MARCADORES ASOCIADOS A LÍNEA LINFOIDE				
CD2 ⁺	CD2 ⁺	CD2 ⁺		
CD5 ⁺	CD5 ⁺	CD5 ⁺		
CD7 ⁺ (>15% de las células CD34 ⁺)	CD7 ⁺	CD7 ⁺		
CD19 ⁺	CD19 ⁺	CD19 ⁺		
CD56 ⁺	CD56 ⁺	CD56 ⁺		

SSC: side scatter o dispersion lateral de luz (complejidad interna de la célula). Modificado de Westers et al 2012¹⁵³ y Porwit 2014 et al³⁷¹

Además, no sólo desde un punto de vista diagnóstico, sino que también desde un punto de vista pronóstico, la CMF también ha mostrado ser una técnica útil para la evaluación y estratificación pronóstica de los SMD, especialmente en la última década³⁸⁵⁻³⁸⁸. En este sentido, desde hace más de una década se ha tratado de establecer la posible relación existente entre el número de alteraciones fenotípicas detectadas y el pronóstico de los SMD, mediante la elaboración de diferentes sistemas de puntuación inmunofenotípica^{84,93,98,99,102}. En general los diferentes sistemas de puntuación muestran que los pacientes con SMD de alto riesgo presentan un número de alteraciones inmunofenotípicas significativamente mayor que los pacientes con SMD de bajo riesgo³⁸⁷⁻³⁸⁹ independientemente de la clasificación pronóstica (p.ej. el índice pronóstico internacional –abreviado del inglés como “IPSS”–, el índice pronóstico basado en la

clasificación de la OMS –abreviado del inglés como “WPSS”¹³² o el IPSS revisado -IPSS-R^{389,390}). Sin embargo, estos *sistemas* de puntuación se basan con frecuencia en la evaluación de múltiples alteraciones fenotípicas distintas, por lo cual requieren de la aplicación de paneles amplios de anticuerpos, lo que puede limitar su eficiencia y aplicabilidad en la rutina diagnóstica^{132,384,388,389,391}. En este sentido, cabe señalar que estudios recientes han podido identificar alteraciones inmunofenotípicas con valor pronóstico independiente a la hora de predecir la supervivencia de los pacientes con SMD³⁹⁰, reduciendo así el número de marcadores fenotípicos requeridos para la estratificación pronóstica de los pacientes y facilitando la aplicabilidad de los estudios inmunofenotípicos para la estratificación pronóstica de los SMD. Entre otros parámetros con valor pronóstico independiente merece destacar: 1) el porcentaje de precursores linfoides B (hematogonias)¹³²; 2) la pérdida de intensidad de expresión de CD45 en precursores mieloides¹³², 3) la disminución anormal de granularidad en los precursores de granulocito neutrófilo^{132,370,377}; 4) la existencia de una expresión alterada de CD36 en los precursores eritroides¹³²; 5) la disminución de la positividad para CD13 en las células monocíticas de MO, junto con la sobreexpresión de CD117 en progenitores mieloides y la disminución de su granularidad³⁹⁰. Por otra parte, la presencia de alteraciones fenotípicas en pacientes con SMD de bajo riesgo y alteraciones displásicas leves se ha asociado también con una mayor probabilidad de progresión de la enfermedad y un peor pronóstico^{132,379-381,385,387}. En este sentido, además de predecir la evolución clínica de los pacientes, los *sistemas* de puntuación inmunofenotípica han demostrado ser de utilidad en el seguimiento de los SMD^{385,388}, asociándose en general un mayor número de alteraciones fenotípicas en los precursores de las líneas de granulocito neutrófilo y de monocito con un mayor grado de displasia morfológica, mayor dependencia transfusional, un riesgo incrementado de progresión a LMA y una peor respuesta al tratamiento con G-SCF³⁹², azacitidina³⁹³ y TPH^{243,244}.

2.2.1.1.4.-Diagnóstico de los SMD.

A pesar de lo descrito anteriormente, las características clínicas y la (cito)morfología siguen constituyendo los parámetros con mayor peso en el diagnóstico de los SMD^{271,276}. Por el contrario, las características genéticas/moleculares e inmunofenotípicas de la célula patológica, aunque se considera que son muy relevantes, siguen ocupando un papel secundario (pero cada vez más importante) en el

diagnóstico, y son claves, sobre todo la citogenética, en la clasificación pronóstica de los SMD^{276,316,317,337,347,371,390}. Así, en la actualidad, para el diagnóstico de los SMD se requieren criterios mínimos, agrupados en criterios esenciales, decisivos y co-criterios (Tabla 6). Mientras que los criterios esenciales y decisivos asientan fundamentalmente en la presencia de citopenias periféricas, los criterios decisivos incluyen además alteraciones cuantitativas y cualitativas de la morfología y/o alteraciones genéticas (Tabla 6). En este contexto, un fenotipo alterado constituye un co-criterio diagnóstico (Tabla 6).

Tabla 6. Criterios propuestos por la SEHH³³⁷, la OMS 2008³¹⁹ y la OMS2016²⁷⁶ para el diagnóstico de los SMD

CRITERIOS MÍNIMOS PARA DIAGNÓSTICO DE SMD	
CRITERIOS ESENCIALES	Citopenia mantenida para ≥ 1 línea celular –eritroide (Hb < 11dL), de granulocito neutrófilo (< $1,5 \times 10^9/L$) y megacariocítica (plaquetas < $100 \times 10^9/L$)– en ausencia de enfermedades hematológicas y no hematológicas causantes de citopenia/displasia.
CRITERIOS DECISIVOS	1) Displasia en $\geq 10\%$ de las células de ≥ 1 línea mieloide de MO. 2) 5-19% de blastos en MO. 3) Anomalías cromosómicas típicas de SMD (+8, -7, 5q-, 20q-, otras) detectadas por citogenética convencional o FISH.
CO-CRITERIOS (aplicables a casos con criterios esenciales+ criterios decisivos y clínica compatible: p.ej. anemia macrocítica con requerimiento transfusional)	1) Fenotipo atípico en MO que indica población monoclonal. 2) Datos moleculares de clonalidad: HUMARA, perfil génico, mutaciones puntuales (RAS). 3) Disminución de la capacidad de formación de colonias en MO y SP.
CITOPENIA IDIOPÁTICA DE SIGNIFICADO INDETERMINADO (ICUS)	Citopenia persistente (>6 meses) que afecta a ≥ 1 línea mieloide, en ausencia de criterios diagnósticos de SMD y de otras causas de citopenia.
CRITERIOS DE LA OMS 2016 PARA DIAGNÓSTICO DE SMD	
Número de citopenias (criterio obligatorio)	Hemoglobina <10g/dL y/o neutrófilos < $1.8 \times 10^9/L$ y/o plaquetas < $100 \times 10^9/L$. Cifras superiores a las anteriores no invalidan SMD si existen alteraciones morfológicas o citogenéticas.
Tipo y grado de displasia (criterio obligatorio)	Displasia en $\geq 10\%$ de las células de ≥ 1 línea mieloide (evaluado sobre ≥ 100 eritroblastos, ≥ 100 granulocitos y ≥ 30 megacariocitos de MO).
% de blastos en sangre y médula ósea	0-19% de blastos en MO y/o SP. ($\geq 20\%$ de blastos se considera LMA).
% de sideroblastos en anillo	Eritroblastos con $\geq 1/3$ de su núcleo rodeado por ≥ 10 gránulos de siderina (OMS).
Cariotipo de médula ósea *La presencia aislada de estas alteraciones citogenéticas en ausencia de criterios morfológicos de displasia no es suficiente para el diagnóstico de SMD.	Presencia de alteraciones cromosómicas no balanceadas como +8*; -7/del(7q), -5/del(5q), del(20q)*, -Y*, i(17q)/t(17p), -13/del(13q), del(11q), del(12p)/t(12p), del(9q), idic(X)(q13). Presencia de alteraciones cromosómicas balanceadas como: t(11;16)(q23;p13.3), t(3;21)(q26.2;q22.1), t(1;3)(p36.3;q21.2), t(2;11)(p21;q23), inv(3)(q21q26.2), t(6;9)(p23;q34).

Así, sólo en aquellos casos en los que pese a cumplir los criterios esenciales, no se cumplen los criterios decisivos, se recomienda el empleo de técnicas complementarias como el inmunofenotipo, las

técnicas moleculares (p.ej. test de HUMARA) y de cultivo celular, que puedan contribuir a confirmar el diagnóstico de clonalidad mielóide compatible con SMD²⁷⁰ –co-criterios diagnósticos–. Si tras su aplicación se demuestra la ausencia simultánea de criterios decisivos y co-criterios, asociados a citopenia(s) persistente(s) en ausencia de SMD u otra causa que la(s) justifique(n), se establecería el diagnóstico de ICUS.

2.2.1.1.5.-Clasificación (pronóstica) de los SMD.

La primera clasificación de los SMD fue propuesta por el grupo Franco-Americano-Británico (FAB) en 1982, siguiendo criterios estrictamente morfológicos y hematimétricos basados en la presencia/ausencia y el número de citopenias periféricas y el porcentaje de blastos²⁶⁵. Las clasificaciones posteriores propuestas por la OMS han resultado en la clasificación de la OMS de 2016 en la que se distinguen siete categorías de SMD según los recuentos celulares periféricos y las características morfológicas (p.ej. presencia de sideroblastos en anillo y displasia en una o más líneas celulares hematopoyéticas) de las células de las líneas eritroide, de granulocito neutrófilo y megacariocítica de MO (Tabla7)³⁹⁴⁻³⁹⁶.

En la clasificación OMS de los SMD, las variantes más indolentes de la enfermedad, como las citopenias refractarias unilineales, corresponden con pacientes que presentan niveles de blastos en MO <5%, asociados a citopenias restringidas a una o dos líneas celulares hematopoyéticas y ligeros rasgos displásicos. Entre estos pacientes con SMD más indolentes se incluye también la anemia refractaria con (>15%) sideroblastos en anillo (o SMD con sideroblastos en anillo y displasia unilineal) asociada o no a mutación del gen *SF3B1* y el SMD con del(5q) aislada sensible a tratamiento con lenalidomida. Por el contrario, los SMD más severos se caracterizan por presentar >5% blastos y mayor probabilidad de progresión a LMA –SMD con exceso de blastos–. Clínicamente, estos SMD suelen tener un curso más agresivo y peor pronóstico, presentando de forma característica afectación simultánea de las principales líneas celulares hematopoyéticas (eritropoyesis, mielopoyesis y megacariopoyesis); además, las células mieloides de estos SMD suelen presentar un mayor grado de displasia y un mayor número de alteraciones

citogenéticas, asociadas a bloqueos madurativos tempranos y acúmulo de blastos. La última revisión de la clasificación de la OMS de este mismo año hace especial hincapié en la nomenclatura, evitando la referencia a la línea hematopoyética displásica o a su consecuencia clínica (p.ej. propone sustituir los términos “citopenia” y “anemia” por el de “SMD”) a la vez que resalta la importancia de las alteraciones moleculares; además revisa los criterios diagnósticos para displasia, sideroblasto en anillo y propone una cuantificación más exacta de los blastos en lugar de un rango. En la Tabla 7 se recogen de forma resumida las principales modificaciones introducidas en 2016 sobre la clasificación OMS 2008 de los SMD.

Tabla 7. Clasificación diagnóstica de los SMD propuesta por la OMS en 2008³⁹⁴ con las modificaciones más relevantes propuestas en 2016

OMS 2008	OMS 2016	Citopenias*	% de blastos y Nº de monocitos en SP	% de blastos en MO	% de SA en MO	Displasia morfológica
CRDU AR NR TR	SMD con DU	1 ó 2	<1%**	<5%**	<15%	1 línea
ARSA	SMD con SA+ y DU (+/- mutación de <i>SF3B1</i>)	Anemia	0%**	<5%**	>15%	Eritroide
CRDM	SMD con DM	Citopenia/s	<1**	<5%**	<15%	> 2 líneas
CRDM-SA	SMD con SA SMD con SA y <i>SF3B1</i>- SMD con SA y <i>SF3B1</i>+		Bastones Auer- < 1x10 ⁹ monocitos/L		Bastones Auer- >15% ≥15% ≥5%	
AREB-1	SMD con exceso de blastos tipo 1	Citopenia/s	<5%** Bastones Auer- < 1x10 ⁹ monocitos/L	5-9% Bastones Auer-	Indistinto	Indistinto
AREB-2	SMD con exceso de blastos tipo 2	Citopenia/s	5-19% Bastones Auer-/+ < 1x10 ⁹ monocitos/L	10-19% Bastones Auer-/+	Indistinto	Indistinto
SMD con del(5q) aislada	SMD 5q- sin exceso de blastos en SP/MO sin displasia granulocítica Puede coexistir una segunda alteración citogenética de bajo riesgo Recomendado estudio de <i>TP53</i> <i>TP53</i> + ↑ riesgo. ↓ respuesta a Lenalidomida <i>TP53</i> - ↓ riesgo ↑ respuesta a Lenalidomida	Anemia	<1%**	<5%** Bastones Auer-/+	Indistinto	Megacariocitos con núcleo hipobulbado
SMD inclasificable	CRDU/CRDM con 1% de blastos en SP (En ≥2 determinaciones diferentes) SMD sin exceso de blastos o displasia- pero con citogenética SMD+	Citopenias	<1%**	<5%**		< 10% en > 1 línea mieloide + alteración citogenética compatible

ARS: anemia refractaria con sideroblastos en anillo; **AREB:** AR con exceso de blastos; **CRDU:** citopenia refractaria con displasia unilineal; **CRDM:** citopenia refractaria con displasia multilínea; **DM:** displasia multilínea; **DU:** displasia unilineal; **SA:** sideroblastos en anillo. *10% de displasia en línea megacariocítica pasará a ser del 30-40% en la nueva clasificación. **Informar el % exacto de blastos (no el rango), desaconsejándose el uso de los puntos de corte <1% y <5%. Modificado de Swerdlow et al (2008) y de Alhan et al (2016)

Aunque tanto la clasificación FAB como las distintas revisiones de la clasificación OMS de los SMD mostraban una importante asociación con el pronóstico, su utilidad predictiva es claramente insuficiente.

Por este motivo, además de la clasificación diagnóstica de los SMD, desde 1997 se han propuesto clasificaciones pronósticas complementarias para pacientes con SMD, resultando especialmente útiles el IPSS³⁹⁷ vigente prácticamente hasta el día de hoy y el IPSS-R. En el IPSS, para la clasificación pronóstica de los SMD se toma en consideración el porcentaje de blastos en MO, el número de citopenias periféricas y la presencia de 6 patrones citogenéticos diferentes definidos en base a la combinación de 4 alteraciones citogenéticas concretas que incluyen -Y, del(5q), del(20q) y anomalías del cromosoma 7, de manera aislada o en combinación con otras alteraciones citogenéticas menos frecuentes³⁹⁷. En base a estos parámetros se definen 4 subgrupos de riesgo bajo, intermedio-1, intermedio-2 y alto riesgo. Más recientemente, el IPSS-R³¹⁸ propone una revisión de la clasificación IPSS en la que se confiere mayor relevancia a las alteraciones citogenéticas, definiendo un total de 5 subgrupos pronósticos basados en 16 patrones citogenéticos distintos (Tabla 8). El IPSS-R además modifica el umbral del porcentaje de blastos, incluyendo por primera vez el grado de severidad de las citopenias. Finalmente, el IPSS-R introduce algunos parámetros nuevos en la estratificación pronóstica de los SMD como son la edad, el estado general e indicadores bioquímicos, como el nivel de LDH, ferritina y β 2-microglobulina³¹⁸ (Tabla 8).

En resumen, aunque los SMD son entidades clínico-biológicas heterogéneas, se cree que tienen un origen común en la expansión de una célula CSH clonal en la que ocurren y progresivamente se acumulan nuevas alteraciones genéticas y/o moleculares que van a condicionar el comportamiento clínico-biológico de la enfermedad y que con frecuencia tienen consecuencias también, tanto en los perfiles de expresión proteica, como en la morfología de las células patológicas y de su progenie. El acúmulo progresivo de dichas alteraciones, así como el orden de aparición de las mismas, condicionarían en gran medida las citopenias periféricas, el acúmulo de blastos y el riesgo de progresión de la enfermedad. De este modo, además de adquirir rasgos displásicos, la célula clonal y su progenie pueden adquirir una ventaja proliferativa respecto a los distintos compartimientos de células residuales de MO que no presentan las mismas alteraciones genéticas y/o moleculares (hematopoyesis residual), pudiendo incluso sustituir el patrón citopénico típico por un patrón más mieloproliferativo, o acumulativo debido a un bloqueo madurativo

temprano similar al observado por ejemplo en los SMD/NMP, las neoplasias mieloproliferativas (NMP) y LMA, entidades a las que nos referiremos en los apartados siguientes de esta introducción.

Tabla 8. Clasificación pronóstica de los SMD: análisis comparativo de las clasificaciones IPSS e IPSS-R.

FACTORES PRONÓSTICOS	IPSS (n=812)	IPSS-R (n=7012)
CARIOTIPO	Bueno: Normal, -Y, del(5q), del(20q) como anomalías únicas. Intermedio: otras anomalías únicas o dobles. Pobre: Cariotipo complejo (≥ 3 anomalías) o anomalías del cromosoma 7.	Muy bueno: -Y, del(11q) aisladas. Bueno: Normal, del(5q), del(12p) y 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.
% de blastos en MO	<5% 5-10% 11-20% 21-30%	$\leq 2\%$ >2% $\geq 5\%$ 5-10% >11-20%
Evaluación de las citopenias	Cualitativas (si/no) y número	Grado de afectación (cuantitativa) Hb g/dL: ≥ 10 ; 8-10; <8 Plaquetas $\times 10^9$ L: ≥ 100 ; 50-99; <50 Neutrófilos $\times 10^9$ L: ≥ 0.8 ; <0.8
Otros factores de riesgo*	Ninguno	Edad: ≤ 60 ; 60-69; 70-79; >80. 70 años se utiliza para ajustar el riesgo a través de la fórmula: (años-70 X [0.05-(IPSS-R X 0.005)]) Estado general y comorbilidades: ECOG 0, ECOG 1, ECOG 2 ↑ Ferritina sérica ↑ LDH ↑ $\beta 2$ -microglobulina sérica
Grupos de riesgo	Bajo: 0 Intermedio-1: 0.5-1 puntos Intermedio-2: 1.5-2 puntos Alto: >2.5 puntos	Muy bajo: 0-1.5 puntos. Bajo: >1.5-3 puntos. Intermedio: >3-4.5 puntos. Alto: >4.5-6 puntos. Muy Alto: >6 puntos.

Hb: hemoglobina; **IPSS:** índice pronóstico internacional; **IPSS-R:** índice pronóstico internacional revisado; **LDH:** lactato deshidrogenasa *Modificado de Greenberg et al*³¹⁸ y de la *Guía española para el diagnóstico y tratamiento de los SMD*³³⁷ *En la clasificación IPSS-R la edad, el estado general y las comorbilidades, el incremento de ferritina sérica, LDH y $\beta 2$ -microglobulina sérica tienen impacto en la supervivencia global pero no afectan (de forma independiente) al riesgo de transformación a LMA.

2.2.1.2.- Neoplasias Mieloproliferativas (NMP).

Las NMP son hemopatías malignas que se caracterizan por la expansión de los compartimentos periféricos de una o más líneas celulares hematopoyéticas como consecuencia de mutaciones u otras alteraciones genéticas a nivel de los precursores hematopoyéticos, que involucran la CSH y cuyos efectos se transmiten a la progenie mieloide^{321,398}. Dependiendo de las mutaciones iniciadoras y el subsiguiente patrón de evolución clonal, el curso clínico de los NMP varía de forma significativa³²¹. Así se distinguen

cuatro grupos mayoritarios de pacientes con NMP: i) leucemia mieloide crónica (LMC), ii) policitemia vera, iii) trombocitemia esencial (TE) y, iv) mielofibrosis primaria (MFP). Además se reconocen tres entidades adicionales menos frecuentes: la leucemia crónica de neutrófilos (LCN), y la leucemia crónica de eosinófilos (LCE). La mastocitosis sistémica (MS)^{276,395} a la que nos referiremos de forma más detallada más adelante en esta introducción, también se incluía como un grupo poco frecuente de NMP dentro de la clasificación OMS; sin embargo en la última revisión de 2016, debido a sus particularidades clínico y biológicas, se le considera como una entidad diferente²⁷⁶. En general, estas enfermedades presentan un curso clínico heterogéneo caracterizado por una primera fase indolente, seguida de una fase de aceleración, como consecuencia de la acumulación secuencial de distintas alteraciones genéticas que pueden desembocar en la transformación a LMA y en menor medida también, a LLA.

2.2.1.2.1.-Características genéticas y moleculares de las células tumorales de las NMP.

Al diagnóstico, la gran mayoría de los pacientes con NMP presentan una expansión anormalmente elevada de uno o más compartimientos periféricos de células hematopoyéticas, con frecuencia en ausencia de alteraciones morfológicas destacables, y asociada a la presencia de anomalías moleculares características^{276,321}. Así, dependiendo del subtipo concreto de NMP del que se trate, se puede observar reordenamiento de los genes *BCR/ABL-1* asociado a t(9;22) en la LMC, y mutación V617F de *JAK2* (Janus kinasa-2 en el locus 9p24) en la PV y en menor medida también en la TE y MFP; además, la afectación de los genes *MPL* (en el locus 1p34) y *CALR* (calreticulina; en el locus 19p13.12) es típica también de la TE y la MFP *JAK2*⁻, estando presentes, junto con *JAK2* en la gran mayoría de los pacientes ($\approx 90\%$)^{399,400,401}.

Además, los pacientes con NMP suelen presentar también con relativa frecuencia, alteraciones genéticas asociadas a SMD, y que de forma específica afectan a genes relacionados con el control epigenético, (p.ej. *ASXL1*, *TET2*, *EZH2*, *IDH1*, *IDH2*, *DNMT3A*), el “splicing” del ARN (p.ej. *SRSF2*, *U2AF1*, *SF3B1*) o la regulación de la transcripción (p.ej. *TP53*, *IKZF1*, *NF-E2*, *CUX1*)⁴⁰². Aunque el significado clínico y biológico de estas anomalías sigue siendo en gran medida desconocido, algunas de estas mutaciones se han relacionado con un pronóstico adverso; tal es el caso de las mutaciones de *ASXL1*, *SRSF2*, *EZH2*, *IDH1/2*

y *U2AF1* en la MFP^{403,404}. De forma similar se ha descrito que las mutaciones de *TP53*, *IDH2*, *SRSF2* y *SH2B3* podrían ocurrir con mayor frecuencia durante las fases de progresión de la enfermedad, especialmente durante la fase de crisis blástica^{404,405}.

2.2.1.2.2-Características fenotípicas de las células tumorales de las NMP.

En la LMC con t(9;22) y reordenamiento *BCR/ABL1*, las alteraciones fenotípicas presentes en las células tumorales (p.ej. el granulocito neutrófilo) suelen ser leves (p.ej. expresión anormalmente baja de *cyMPO*) y habitualmente en ausencia de bloqueos madurativos y de expresión de marcadores de infidelidad de línea⁴⁰⁶⁻⁴⁰⁸. De forma similar, los pacientes con TE y PV u otras NMP también suelen mostrar inicialmente cambios fenotípicos leves^{262,409}. No obstante, es característico de los pacientes con NMP en general, la presencia de asincronismos madurativos (leves) que sin ser específicos de la enfermedad, denotan su carácter neoplásico, habiendo relacionado algunos estudios la presencia de un mayor número de alteraciones fenotípicas con un comportamiento más agresivo de la enfermedad^{399,410,411}. Esto estaría de acuerdo con el incremento de las anomalías fenotípicas a medida que avanza la enfermedad, especialmente durante la crisis blástica y la transformación a leucemia aguda, donde el fenotipo juega un papel clave a la hora de definir la línea y estadio madurativo de los blastos^{398,406-408,412-415}.

2.2.1.3.- Síndromes mielodisplásicos/mieloproliferativos (SMD/NMP).

Los SMD/NMP constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades que reúnen características displásicas y mieloproliferativas. Dentro de esta categoría se incluye la leucemia mielomonocítica crónica (LMMC), la leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ), la leucemia mieloide crónica atípica *BCR/ABL1* negativa (LMCa), la anemia refractaria con sideroblastos en anillo y trombocitosis (ARSA-T) y aquellos SMD/NMP que no cumplen los criterios diagnósticos para las categorías anteriores, denominados SMD/NMP no clasificables^{276,398}. En adultos, la LMMC representa el tipo de NMP más frecuente³²¹.

2.2.1.3.1.- Características morfológicas de las células tumorales de la LMMC.

Los pacientes con SMD/NMP suelen presentar hiperplasia monocítica en todos sus estadios madurativos (monoblastos, promonocitos y monocitos maduros) junto a rasgos displásicos en una o varias líneas hematopoyéticas, asociados o no a un incremento de blastos mieloides que, en cualquier caso, y junto con los promonocitos, no debe superar el 20% de la celularidad global de la médula²⁷⁶.

2.2.1.3.2.- Características genéticas y moleculares de las células tumorales de la LMMC.

En la actualidad, la etiología de la LMMC sigue siendo desconocida, aunque esta enfermedad comparte muchos de los factores de riesgo asociados al desarrollo de los SMD^{321,398}. A su vez, la presencia de anomalías cromosómicas es relativamente baja; por el contrario, la mayoría de los pacientes presentan mutaciones genéticas que afectan a los genes *TET2*, *ASXL1*, *CBL*, *IDH*, *NRAS*, *KRAS*, *RUNX1*, *UTX*, *EZH2*, *DNMT3* y/o *JAK2*, entre otros, y cuya implicación en la patogenia y el comportamiento pronóstico de la enfermedad sigue siendo controvertido⁴¹⁶⁻⁴²³. En este sentido, merece destacar que estudios recientes ponen de manifiesto que las mutaciones somáticas de los genes *TET2*, *SRSF2* y *ASXL1* ocurrirían de forma secuencial en etapas tempranas de la enfermedad, mientras que otras alteraciones en la vía de señalización intracelular de *RAS* aparecerían posteriormente, en fases más avanzadas de la misma⁴²⁴. De acuerdo con estas observaciones, en la actualidad se cree que el desarrollo de la LMMC podría estar dirigido por las mutaciones del gen *TET2* que actuarían como mutaciones iniciadoras en los precursores mieloides inmaduros, favoreciendo su diferenciación hacia la estirpe granulomonocítica⁴²⁴.

2.2.1.3.3.- Características fenotípicas de las células tumorales de la LMMC.

Los monocitos patológicos de la LMMC muestran patrones de expresión alterada para distintos marcadores, de entre los que merece destacar: la expresión heterogénea de CD38, HLADR, CD117, CD45, CD13, CD11b, y la positividad anormalmente débil para CD35, CD64, CD14, CD33, CD300e⁴²⁵. Con relativa frecuencia, se observa reactividad para antígenos asociados a línea linfóide como CD2, CD5, CD7 y/o CD19,

siendo el rasgo fenotípico aberrante más característico, la expresión de CD56^{372,387,426}. Estas alteraciones fenotípicas también se observan con relativa frecuencia en los SMD e incluso, aunque con una frecuencia mucho menor, en individuos aparentemente sanos, sobre todo en sujetos de edad avanzada^{229,309,310,427}, además de pacientes que han recibido quimioterapia y tras la movilización de células CD34⁺ para trasplante⁴²⁸⁻⁴³¹. Por todo ello, la expresión de CD56 en monocitos debe ser interpretada con cautela y siempre en el contexto de otras posibles alteraciones fenotípicas, además del cuadro clínico del sujeto en el momento del estudio⁴²⁸⁻⁴³⁰.

En este sentido, a nivel fenotípico, el compartimento de progenitores hematopoyéticos CD34⁺ (e incluso la CSH) suele expresar también alteraciones fenotípicas asociadas a disminución de los precursores linfoides B CD34⁺⁴³² y/o un incremento destacable de los precursores monocíticos CD34⁺/CD64⁺/HLADR⁺/CD15^{+372,433}. Especialmente frecuente resulta la expresión porcentualmente incrementada del antígeno CD7 en los precursores CD34⁺ ($\geq 20\%$) de estos pacientes⁴³⁴⁻⁴³⁷.

En este ámbito, merece destacar que el inmunofenotipo juega un papel clave en la cuantificación precisa del número de blastos leucémicos y el diagnóstico diferencial entre la LMA monocítica y monoblástica y la LMMC, a través de una definición objetiva del estadio madurativo exacto de los precursores monocíticos^{321,398,438,439}.

2.2.1.4.- Leucemia mieloide aguda (LMA).

La leucemia aguda de estirpe mieloide se considera constituye también una neoplasia de la CSH asociada a la expansión de células hematopoyéticas (patológicas) inmaduras, boqueadas en fases tempranas de la diferenciación³²¹. Se trata de un grupo muy heterogéneo de enfermedades relativamente poco frecuentes, con mayor prevalencia en individuos de edad avanzada (>60 años) y una incidencia aproximada en el mundo occidental de 10.000 casos nuevos al año^{276,291,440-444}. No obstante lo anterior, la LMA representa el 90% de las leucemias agudas del adulto, siendo excepcionales en niños⁴⁴⁵.

Con alguna frecuencia la etiopatogenia de la LMA se asocia a múltiples factores ambientales, la exposición a sustancias químicas y radiaciones ionizantes, agentes infecciosos, procesos autoinmunes e iatrogénicos (p.ej. agentes alquilantes, antraciclinas y fármacos antitumorales)^{291,440}. Además, con relativa frecuencia, el debut de una LMA se asocia con la transformación de un proceso clonal preexistente, especialmente de un SMD, una NMP o un SMD/NMP^{291,293,321,446}.

2.2.1.4.1.- Características morfológicas de las células tumorales de la LMA.

Por definición, la LMA se caracteriza por la presencia de células inmaduras mieloides de naturaleza clonal ("blasto")^{276,321}. Desde el punto de vista (cito)morfológico los blastos muestran características heterogéneas en lo que se refiere a su tamaño, complejidad citoplasmática y nuclear, relación núcleo/citoplasma, granulación y marcadores citoquímicos, lo cual permite, además de sospechar su naturaleza patológica/leucémica, identificar la presencia o ausencia de cierto grado (variable) de diferenciación a una o más líneas mieloides, aspecto que ha sido clave para el diagnóstico y clasificación de la LMA⁴⁴⁷⁻⁴⁴⁹, como veremos más adelante en este apartado de la introducción.

2.2.1.4.2.- Características genéticas y moleculares de las células tumorales de la LMA

En los últimos años, con la incorporación de las técnicas de secuenciación masiva se han identificado un número importante de genes (≈ 40) que, además de las traslocaciones y otras alteraciones cromosómicas conocidas, están implicados en la etiopatogenia de la LMA y en algunos casos también en su comportamiento pronóstico y respuesta al tratamiento^{293,439,450}. Así, en la clasificación OMS de 2016, se reconocen diferentes alteraciones genéticas y/o moleculares características en la LMA²⁷⁶; En esta línea, recientemente algunos autores definen hasta tres perfiles genéticos distintos en la LMA: i) la LMA "de novo"; ii) la LMA secundaria, y; iii) la LMA con mutación de *TP53* (Figura 9). La LMA "de novo" se caracteriza por una mayor frecuencia de mutaciones del gen *NPM1*, de reordenamientos recurrentes en *MLL/11q23* y otros genes y/o de mutaciones de los factores de transcripción conocidos como "core binding factors" (CBF). A su vez, la LMA secundaria presenta con mayor frecuencia mutaciones somáticas

que afectan a los genes *SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *ASXL1*, *EZH2*, *BCOR* y *STAG2*, característicos también de los SMD, NMP y SMD/NMP^{293,451}. Por último, la LMA con mutación en *TP53* se asocia a cariotipos complejos y pronóstico adverso, siendo con frecuencia refractaria al tratamiento, con una supervivencia sensiblemente inferior (≈ 5 meses) a la de las demás LMA^{293,439} (Figura 9).

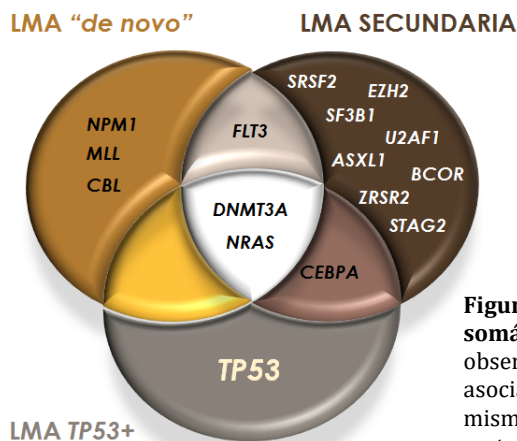


Figura 9. Perfiles genéticos de LMA definidos por el tipo de mutaciones somáticas subyacentes. Las mutaciones somáticas en *DNMT3A* y *NRAS* se observan en todos los subtipos de LMA. Por el contrario, la mutación de *TP53* se asocia a un subtipo de LMA con cariotipo complejo y pronóstico muy adverso. Así mismo, la LMA “de novo” y la LMA secundaria, a pesar de compartir algunas mutaciones somáticas con los demás grupos (como *FLT3*), generalmente muestran patrones genotípicos característicos, como se refleja en el esquema.

La importante heterogeneidad genética de la LMA se manifiesta no sólo al comparar distintos pacientes, sino incluso al comparar las células tumorales de un mismo paciente, lo cual sugiere la posible coexistencia en el mismo de varios clones de células neoplásicas distintas, que pudieran asociarse también a un comportamiento clínico y biológico diferente y a un grado de resistencia a tratamiento variable^{452,453}. En este sentido, hoy se considera que al menos en un subgrupo de pacientes con LMA, la diversidad clonal de los blastos leucémicos descrita, podría coexistir con células “preleucémicas” que presentan mutaciones somáticas en genes implicados en la regulación epigenética como *DNMT3A*, *ASXL1*, *IDH2* y *TET2*, sugiriendo que posiblemente estas mutaciones podrían surgir en estadios iniciales de la enfermedad, incluso en individuos sanos de edad avanzada, a los que podrían conferir un riesgo incrementado de desarrollar LMA^{229,292,454,455}. Así, en términos generales, la LMA presenta mutaciones de genes asociados a SMD, SMD/NMP y NMP que incluyen, por orden de frecuencia, mutaciones de los genes *NPM1* (25-35%), *DNMT3A* (18-22%), *FLT3*-ITD ($\approx 20\%$), *TET2* (7-25%), *IDH1/IDH2* (7-19%), *ASXL1* (5-17%), *NRAS* ($\approx 15\%$), *RUNX1* (5-15%), *CEBPA* (6-10%), *TP53* (8%), *KMT2APTD* (5%) y *KIT* ($<5\%$)⁴³⁹ (Figura 10). En LMA, estas mutaciones se ha visto que se asocian además con distinto impacto pronóstico (Tabla 9)⁴³⁹, incluyendo mutaciones genéticas asociadas a un pronóstico favorable⁴⁵⁶

(p.ej. las mutaciones de *NPM1*, *CEBPA*), mutaciones de pronóstico intermedio (p.ej. las mutaciones de *FLT3-ITD*) o mutaciones asociadas a pronóstico desfavorable (p.ej. mutaciones de *RUNX1* y *ASXL1*)⁴³⁹.

Tabla 9. Estratificación de riesgo pronóstico de la LMA según las alteraciones genéticas y moleculares conforme a las recomendaciones de la European Leukemia Net (ELN)*

Perfil de riesgo	Subtipos
Favorable	t(8;21) (q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16) (p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> <i>NPM1</i> mutado sin <i>FLT3-ITD</i> (cariotipo normal) Mutación bialélica de <i>CEBPA</i> (cariotipo normal)
Intermedio I†	<i>NPM1</i> mutado y <i>FLT3-ITD</i> mutado (cariotipo normal) <i>NPM1</i> germinal y <i>FLT3-ITD</i> mutado (cariotipo normal) <i>NPM1</i> germinal y <i>FLT3-ITD</i> no mutado (cariotipo normal)
Intermedio II	t(9;11) (p22;q23); <i>MLL3-KMT2A</i> Otras anomalías citogenéticas no clasificadas como favorables ni adversas‡
Adverso	inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2); <i>GATA2-MECOM (EV11)</i> t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11)(v;q23); reordenamiento de <i>KMT2A</i> -5 o del(5q); -7; alteraciones de 17p; cariotipo complejo§ Mutaciones en los genes <i>ASXL1</i> , <i>DNMT3A</i> , <i>MLL-PTD</i> y <i>RUNX1</i> t(9;22)(q34;q11); <i>BCR-ABL1</i>

*Respecto a las recomendaciones originales propuestas en 2010, recientemente se han introducido tres cambios: i) la LMA con mutación en *CEBPA* y pronóstico favorable se restringe ahora a los casos con mutaciones bialélicas; ii) la nomenclatura de la inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2) se sustituye por *GATA2-MECOM (EV11)*, y; iii) finalmente, se sustituye la nomenclatura *MLL* por *KMT2A* -lisina (K) específica metil transferasa 2A-.

† Esta categoría incluye todos los casos de LMA con cariotipo normal excepto aquellos incluidos en el subgrupo favorable; la mayoría de los casos se asocia a pronóstico desfavorable; aun así, deben informarse de manera separada por posibles diferencias en la respuesta al tratamiento

‡ El número de casos analizados para la mayoría de las anomalías es insuficiente como para extraer conclusiones sólidas respecto al pronóstico.

§ El cariotipo complejo se define como ≥3 anomalías cromosómicas en ausencia de una de las alteraciones recurrentes o inversiones definidas por la OMS - t(8;21), inv(16) o t(16;16), t(9;11), t(v;11) (v;q23), t(6;9) e inv(3)/t(3;3)-. Alrededor de 2/3 de los pacientes con LMA y cariotipo complejo tienen mutación de *TP53*, delección de *TP53* o ambas. Las alteraciones de *TP53* son muy poco frecuentes fuera del contexto de un cariotipo complejo. Modificado de Döhner et al²⁹¹ y de Bret et al⁴⁵⁷

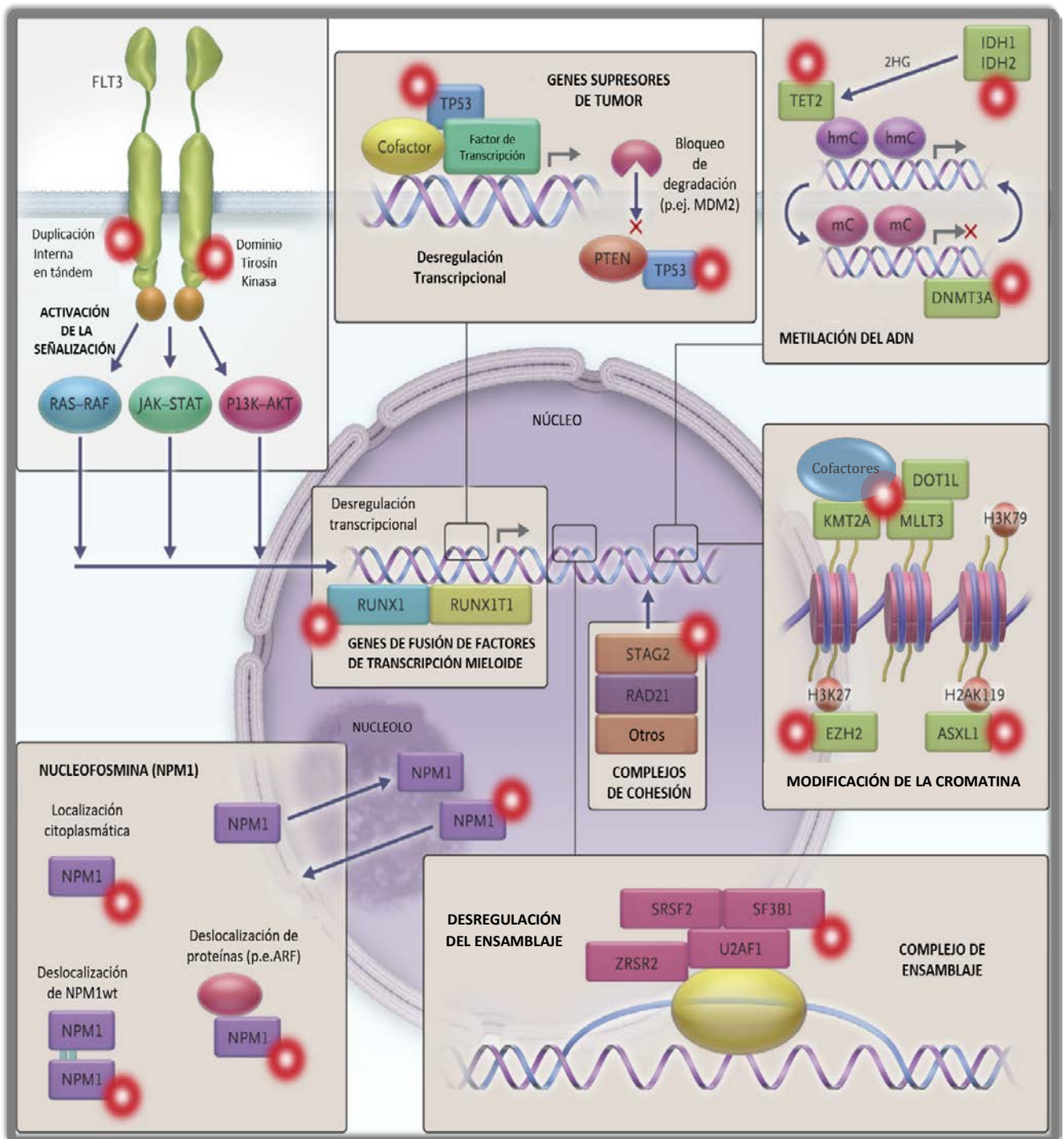


Figura 10. Categoría funcional de los genes frecuentemente mutados en LMA. Entre otras alteraciones, se incluyen: 1) mutaciones en genes de señalización como el receptor tirosín quinasa de clase III (FLT3) que confiere una ventaja proliferativa a las células afectadas mediante activación de vías de señalización como RAS-RAF, JAK-STAT y PI3K-AKT (arriba, a la izquierda); 2) mutaciones en factores de transcripción como *RUNX1* y genes de fusión de factores de transcripción debidos a reordenamientos cromosómicos como ocurre en la t(8;21) y que conducen a una desregulación de la transcripción (en el centro, a la izquierda); 3) mutaciones del gen de la nucleofosmina1 (*NPM1*), una proteína transportadora núcleo-citoplasmática multifuncional (abajo, a la izquierda); 4) mutaciones en genes de complejos de ensamblaje como *SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1* y *ZRSR2* involucrados en el procesamiento del ARN (abajo, a la derecha); 5) mutaciones en genes del complejo de la cohesina como *STAG2* y *RAD21*, implicados en los procesos de segregación cromosómica y regulación de la transcripción (centro de la imagen); 6) mutaciones en genes que intervienen en: i) la regulación epigenética como *ASXL1*, *EZH2*, *DOT1L*, *KMT2A* y *MLLT3*, ii) genes relacionados con la alteración del empaquetamiento de la cromatina (centro a la derecha) como *DNMT3A*, *TET2* e *IDH1/IDH2*, iii) genes involucrados en la metilación del ADN (arriba a la derecha) y iv), mutaciones en genes supresores de tumores como *TP53* que intervienen en los procesos de regulación de la transcripción y degradación de los transcritos defectuosos. Modificado de Döhner et al.²⁹¹.

2.2.1.4.3.-Características inmunofenotípicas de la LMA.

Históricamente, el inmunofenotipado y en especial el inmunofenotipado por CMF, ha sido de gran relevancia en el diagnóstico, clasificación y monitorización de la LMA, proporcionando información complementaria a la de la citomorfología y citogenética convencional^{321,458,459}. Esto se debe, al menos en parte, a la elevada sensibilidad y objetividad de la CMF a la hora de identificar el compromiso madurativo de los precursores leucémicos a distintas líneas mieloides, y de caracterizar su grado de diferenciación en el momento del diagnóstico, además de permitir identificar aberraciones fenotípicas asociadas a leucemia y que son útiles para la evaluación de la posible persistencia de enfermedad mínima residual tras tratamiento⁴⁵⁸⁻⁴⁶⁰.

En términos generales, el inmunofenotipo muestra una importante correlación con la morfología^{461,462}. Así, los subtipos morfológicos de LMA suelen mostrar patrones fenotípicos característicos y congruentes con su grado de diferenciación. A modo de ejemplo, la LMA indiferenciada suele mostrar características de un precursor hematopoyético fenotípicamente muy inmaduro, con ausencia de expresión de cyMPO y de otros marcadores mieloides específicos de línea⁴⁶³. Por el contrario, la LMA mínimamente diferenciada y la LMA con diferenciación presentan una proporción variable de células con rasgos de diferenciación a línea de granulocito neutrófilo, mientras que la leucemia promielocítica aguda (LPA) se caracteriza por un patrón fenotípico típico de un promielocito (CD34⁻ y CD13 heterogéneo, en ausencia de HLADR) patológico (CD15⁻)⁴⁶⁴, y la LMA mielomonocítica se presenta con frecuencia coexistencia de blastos con expresión de antígenos de línea de granulocito neutrófilo (cyMPO, SSC^{elevado}, HLA-DR^{heterogéneo}) y marcadores típicos de línea monocítica (p.ej. CD64⁺⁺, SSC^{int}, HLADR⁺⁺)⁴⁶⁵⁻⁴⁶⁷. Las leucemias con diferenciación megacariocítica y eritroide son menos frecuentes y suelen expresar otros marcadores característicos (aunque no exclusivos) de ambas líneas celulares como CD36 (receptor de la trombospondina) asociado a glicoproteínas como CD42a, CD42b, CD61, CD41 y/o CD9 (tetraspanina 29) o CD71 (receptor de la transferrina) y/o CD105 (endoglina), respectivamente^{121,468,469}.

Con frecuencia (≈85% de los casos), los blastos leucémicos muestran además fenotipos aberrantes, a veces directamente relacionados con las alteraciones genéticas subyacentes^{121,291}. Así, la expresión de CD19 en LMA se asocia a la presencia de t(8;21)^{470,471}, la reactividad para la proteína de fusión NG2 está

relacionada con reordenamientos del gen *MLL* a nivel del cromosoma 11q23⁴⁷²⁻⁴⁷⁴; la expresión intensa de MPO con positividad heterogénea para CD13 en ausencia de reactividad para CD34 y CD15 se asocia a la t(15;17) típica de la leucemia promielocítica⁴⁶⁴ y el asincronismo madurativo de CD14 y CD300e en la diferenciación monocítica es típico de mutaciones de *NPM1*⁴⁷⁵⁻⁴⁷⁷. De igual modo, la expresión aberrante de MPO en los eosinófilos y de CD2 en los blastos, se ha relacionado con la presencia de inv(16) y t(16;16)⁴⁷⁸⁻⁴⁸⁰.

2.2.1.4.4.- Clasificación de la LMA

La primera clasificación de la LMA que tuvo amplia aceptación fue la clasificación FAB de 1976⁴⁴⁹, revisada por última vez en 1985⁴⁸¹; en esta clasificación, la LMA se agrupaba en 8 subtipos diferentes (desde la LMA M0 hasta la LMA M7) según criterios estrictamente (cito)morfológicos y citoquímicos para la definición del linaje y grado de diferenciación de los blastos (Tabla 10)⁴⁴⁹.

Tabla 10 Clasificación Franco-Américo-Británica (FAB) de la LMA.

Subtipo de LMA	Denominación	Alteraciones citogenéticas asociadas	% de la LMA del adulto
M0	LMA mínimamente diferenciada		5%
M1	LMA sin maduración		15%
M2	LMA con maduración granulocítica	t(8;21)(q22;q22), t(6;9)	25%
M3	LMA promielocítica (APL)	t(15;17)	10%
M4	Leucemia mielomonocítica aguda (LMMA)	inv(16)(p13q22), del(16q)	20%
M4Eo	LMMA con eosinofilia medular	inv(16), t(16;16)	5%
M5	Leucemia monoblástica (M5a) Leucemia monocítica (M5b)	del(11q), t(9;11), t(11;19)	10%
M6	Eritroleucemia		5%
M7	LA megacarioblástica	t(1;22)	5%

*Modificado de Bennett et al*⁴⁴⁹ y de *Bennet et al*⁴⁸¹

Según la clasificación FAB, los blastos de la LMA M0 muestran morfología inmadura sin compromiso de línea definible, por lo que se denominan también como leucemias indiferenciadas. Esto hace que incluso en ocasiones, sea difícil establecer si se trata de una leucemia de línea mielóide indiferenciada, linfóide o de precursor de célula dendrítica⁴⁸², por lo que el estudio del inmunofenotipo de los blastos mediante CMF

resulta fundamental en estos casos³¹⁹. A su vez, los blastos de los subtipos de LMA M1 y M2, habitualmente muestran evidencias morfológicas e inmunofenotípicas de compromiso mieloide, incluyendo expresión de MPO en un porcentaje variable, generalmente bajo, de los blastos (<10% y ≥10% de los blastos, respectivamente).

El subtipo M3 o LPA, destaca por sus características clínico-biológicas particulares y únicas. Por un lado, la maduración de los blastos mieloides se encuentra bloqueada a nivel del estadio de promielocito, existiendo dos variantes morfológicas: la variante típica o hipergranular, definida por la complejidad morfológica de los blastos que con frecuencia presentan bastones de Auer asociada a leucopenia, y la variante atípica o microgranular que cursa con leucocitosis y un comportamiento clínico más agresivo^{319,483-486} asociado con relativa frecuencia a coagulopatía y riesgo hemorrágico, que puede llegar a poner en riesgo la vida del paciente^{486,487}. A nivel genético, la LPA se caracteriza por la presencia de la t(15;17), que tiene como consecuencia la traducción de una proteína de fusión tumoral (PML-RARA), responsable del bloqueo madurativo de los blastos y también de la respuesta al tratamiento con ácido *trans*-retinoico (ATRA), capaz de inducir la diferenciación de los blastos y la remisión completa de la enfermedad en alrededor del 95% de los casos⁴⁸⁸⁻⁴⁹¹.

Los blastos del subtipo de LMA M4 muestran mayor grado de diferenciación que la LMA M0-M1, asociado a un compromiso madurativo mixto granulomonocítico (>20% de los blastos comprometidos con línea monocítica), mientras que los blastos de las variantes de LMA M5a y M5b maduran mayoritariamente a línea monocítica (>80% de los blastos), mostrando distinto grado de diferenciación: i) en la LMA M5a o leucemia monoblástica, predominan blastos con características de precursores monocíticos inmaduros (>80% monoblastos) y, ii) en la LMA M5b o leucemia monocítica, predominan blastos monocíticos más diferenciados, con presencia de promonocitos y monocitos maduros³¹⁹.

Las otras variantes FAB de LMA (M6 y M7) presentan muy baja incidencia, y muestran blastos con diferenciación: i) a línea eritroide (LMA M6) de forma exclusiva (≥80% de los blastos) como en el subtipo M6 en el que predominan blastos de línea eritroide –*leucemia eritroide pura*– o blastos eritroides (≥50%) que coexisten con mieloblastos (≥20%) –*eritroleucemia*–; o ii) a línea megacariocítica (LMA M7), respectivamente. De forma anecdótica, en 1999 se propone un nuevo subtipo de LMA M8 con blastos con

diferenciación a línea de granulocito basófilo⁴⁹², si bien esta entidad nunca llegó a establecerse de forma definitiva.

Aunque la clasificación FAB de la LMA no incluía criterios genéticos ni moleculares para la clasificación de la enfermedad, si establecía ya algunas correlaciones evidentes entre la morfología de los blastos y sus perfiles citogenéticos. Así, a modo de ejemplo, la variante de LMA M4 con eosinofilia, se asociaba a la presencia de inversión del cromosoma 16 $-inv(16)$ ^{-477,478}, la variante de LMA M2 con o sin basofilia se asociaba a $t(8;21)$ ^{469,470}, y la leucemia promielocítica M3 a $t(15;17)$ ^{478,479,493-499}. Por otra parte, la clasificación FAB tampoco hacía distinción entre LMA *de novo* y LMA secundaria.

Debido a lo anteriormente expuesto, la OMS propone en 2001 una clasificación que incorpora la información fenotípica y genética/molecular para redefinir las distintas categorías FAB de LMA, incluyendo además la distinción entre LMA “*de novo*” y LMA secundaria a quimioterapia o a la transformación leucémica de otras neoplasias previas^{396,500}. Esta clasificación de la LMA de la OMS ha sido revisada y refinada en dos ocasiones, en 2008³¹⁹ y más recientemente en 2016²⁷⁶, con la inclusión de un número creciente de subtipos genéticos/moleculares de la enfermedad (Tabla 11). Así, la clasificación actual de la LMA permite una mejor estratificación pronóstica de los pacientes, además de un diagnóstico más preciso de la enfermedad (Tabla 11).

En esta última revisión de 2016 de la clasificación OMS de la LMA se refina la definición de algunas entidades –p.ej. la LMA con *CEBPA* mutado se define exclusivamente cuando la mutación es bialélica, la leucemia promielocítica con reordenamiento *PML-RARA* sólo incluye casos con $t(15;17)(q24.1;q21.2)$, diferenciándola de otras LPA y la LMA con *KMT2A* sustituye a la previamente denominada LMA con reordenamientos del gen *MLL*⁻²⁷⁶. Además, en la LMA con alteraciones genéticas recurrentes, se incorpora la categoría de LMA “*de novo*” con mutación de *RUNX1* asociada a pronóstico adverso⁵⁰¹⁻⁵⁰⁵. Por otra parte, en el grupo de LMA con cambios relacionados con mielodisplasia (del inglés, MRC) establecido en 2001, se adoptan modificaciones menores en los criterios diagnósticos (p.ej. se considera displasia multilínea la presencia de $\geq 50\%$ de células displásicas en ≥ 2 líneas celulares), y se excluyen de este grupo la LMA con mutación de *NPM1* y la LMA con mutación bialélica de *CEBPA*, aunque morfológicamente exista displasia en varias líneas hematopoyéticas en estos pacientes, pasando a pertenecer ambos subtipos de LMA, al

grupo de LMA con alteraciones genéticas recurrentes²⁷⁶. Por el mismo motivo, se excluyen de las LMA sin otra especificación, la LMA con mutaciones de *NPM1* y la LMA con mutación bialélica de *CEBPA*²⁷⁶. Por otra parte, en la clasificación OMS 2016 de la LMA desaparece la categoría de leucemia eritroide con blastos mieloides, debiendo realizarse en general, y en particular en estos casos, el recuento de blastos sobre el total de las células nucleadas de la MO, incluidos los eritroblastos. Con ello, muchas de las leucemias eritroides con blastos mieloides de la clasificación OMS 2008, pasan ahora a considerarse SMD con displasia eritroide, cuando el porcentaje de blastos es $\leq 20\%$; por el contrario, cuando el recuento de blastos en MO supera $\geq 20\%$ se cumplirían los criterios para LMA con MRC^{276,506,507}.

Un mayor cambio supone en la revisión de la clasificación de la OMS de 2016, la redefinición de la LMA relacionada con tratamientos previos, al incluir a este tipo de LMA como un subtipo de neoplasia mieloides asociada a (quimio)terapia (NM-t), e incluir en él también a pacientes con síndromes mielodisplásicos relacionados con (quimio)terapia (SMD-t), además de la LMA relacionada con (quimio)terapia (LMA-t). Finalmente, en la clasificación OMS 2016 se define un nuevo grupo de neoplasias mieloides asociadas a mutaciones germinales y predisposición familiar a padecer otras neoplasias (hematológicas o no)⁵⁰⁸, en el que se incluyen un subgrupo de LMA que puede acompañarse o no de otra hemopatía, caracterizado por la presencia de mutaciones germinales en genes relacionados con neoplasias hematológicas, incluido el síndrome de Down (“neoplasias mieloides con mutaciones con predisposición germinal”). Entre estos pacientes se definen tres subgrupos principales de entidades que incluyen 10 enfermedades distintas, definidas por la alteración genética heredada y la presencia o no de otra enfermedad relacionada y/o disfunción orgánica evidente: i) SMD/LMA familiar en ausencia de otra enfermedad manifiesta y sin disfunciones orgánicas evidentes, ii) neoplasias hematológicas familiares asociadas a trombopatía, y; iii) SMD/LMA asociada a disfunción orgánica (trastornos asociados a fracaso de MO como neutropenia congénita severa y anemia de Fanconi, entre otros)²⁷⁶. Esta nueva categoría pone de manifiesto la importancia de la predisposición genética a la hora de desarrollar una hemopatía maligna, en consonancia también con lo expuesto anteriormente en el presente trabajo en relación con la presencia de hematopoyesis clonal en sujetos aparentemente sanos (CHIP, CHEP) y su potencial de transformación (o evolución) a diferentes hemopatías malignas.

Tabla 11. Clasificación diagnóstica de la LMA propuesta por la OMS en 2008 con las modificaciones más relevantes propuestas en 2016.

Clasificación OMS 2008	Clasificación OMS 2016
LMA con alteraciones genéticas recurrentes	<ul style="list-style-type: none"> • LMA con t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>. • LMA con inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBEB-MYH11</i>. • LA promielocítica (LAP) con t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARA</i>. • LMA con t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i>. • LMA con t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>. • LMA con inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EV11</i>. • LMA (megacarioblástica) con t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKL1</i>. • Entidad provisional: LMA con <i>NPM1</i> mutado. • Entidad provisional: LMA con <i>CEBPA</i> mutado.
LMA con cambios relacionados con displasia (LMA-MRC)	<ul style="list-style-type: none"> • LMA secundaria a SMD. • LMA sin antecedentes de mielodisplasia. <p>Criterio de DISPLASIA MULTILINEAL: (≥50% de células displásicas en ≥2 líneas hematopoyéticas).</p> <p>LMA con del(9q) en ausencia de mutación de <i>NPM1</i>.</p> <p>LMA sin mutación de <i>NPM1</i> ni mutación bialélica de <i>CEBPA</i>.</p>
LMA secundaria a tratamientos previos	<ul style="list-style-type: none"> • LMA secundaria a tratamientos con inhibidores de la topoisomerasa II • LMA secundaria a tratamientos con agentes alquilantes <p>Considerada como una subcategoría de NMP asociada a terapia. Considerar la presencia de mutaciones germinales en pacientes con predisposición (genética) familiar.</p>
LMA sin otra especificación	<ul style="list-style-type: none"> • LMA indiferenciada. • LMA mínimamente diferenciada. • LMA con maduración. • LMA mielomonocítica. • LMA monoblástica/monocítica. • LA eritroide. <ul style="list-style-type: none"> – LA eritroide pura . <hr/> <p>– Eritroleucemia eritroide/mieloide.</p> <p>≥50% de blastos eritroides del conjunto de células hematopoyéticas nucleada en MO y, además:</p> <p>1) SMD con displasia eritroide si < 20% de mieloblastos del global de las células de MO o ≥20% de mieloblastos del total de las células no-eritroides de MO</p> <p>2) LMA-MRC si ≥20% de mieloblastos del global de las células nucleadas de MO.</p> <hr/> <ul style="list-style-type: none"> • LA megacarioblástica. • Leucemia aguda de basófilos. • Panmielosis aguda con mielofibrosis. <p>LMA sin displasia multilineal, sin mutación en <i>NPM1</i> ni mutación bialélica en <i>CEBPA</i>.</p>
Sarcoma mieloide	
Proliferación mieloide relacionada con Síndrome de Down	<ul style="list-style-type: none"> • Mielopoyesis anormal transitoria. • LMA asociada a Síndrome de Down. <p>Característicamente, ambas categorías se asocian a mutación en <i>GATA1</i> y <i>JAK-STAT</i> entre otras mutaciones comunes a otras LMA⁵⁰⁹ y pasan al subtipo de neoplasia mieloide con predisposición germinal.</p>

Tabla 11.(Continuación) Clasificación diagnóstica de la LMA propuesta por la OMS en 2008 con las modificaciones más relevantes propuestas en 2016.

Neoplasia de células dendríticas plasmocitoides		
Leucemia aguda de linaje ambiguo (del inglés, MPAL)	<ul style="list-style-type: none"> • LA indiferenciada. • LA de fenotipo mixto <ul style="list-style-type: none"> -LA de fenotipo mixto <i>BCR-ABL1</i> -LA de fenotipo mixto con reordenamiento de <i>MLL</i> -LA de fenotipo mixto sin especificar 	Aunque los resultados se consideran aun preliminares, la MPAL con t(9;22) parece responder mejor a terapia con inhibidores de tirosín kinasa (TKI) ^{510,511}

Modificado a partir de Vardiman et al³⁹⁵ y de Arber et al²⁷⁶

3.- Mastocitosis sistémica.

La mastocitosis constituye una enfermedad caracterizada por un acúmulo anormal de mastocitos patológicos en la piel, la MO y otros órganos y tejidos⁵¹²⁻⁵¹⁵. Clínicamente, la mastocitosis se caracteriza por la presencia de síntomas locales y/o sistémicos debidos fundamentalmente a la liberación de mediadores mastocitarios como la histamina y la triptasa, y al aumento del número de mastocitos en los tejidos infiltrados, sobre todo en la piel, donde dan lugar a las lesiones cutáneas típicas de la enfermedad⁵¹²⁻⁵¹⁵. La prevalencia de la enfermedad es de alrededor de 1 caso/10.000 habitantes^{514,516-518} por lo que se incluye dentro del grupo de enfermedades raras (<5 casos/10.000 habitantes), y puede afectar tanto a niños (formas pediátricas) como a adultos⁵¹²⁻⁵¹⁵. De forma característica, el mastocito patológico presenta mutaciones en el gen *KIT*, especialmente la mutación D816V de *KIT* ($\approx 94\%$ de los casos)^{519,520}. No obstante, tanto desde el punto de vista clínico como biológico, la mastocitosis constituye una enfermedad heterogénea, que incluye tanto formas localizadas (p.ej. mastocitosis cutáneas) como sistémicas (mastocitosis sistémicas), y variantes de comportamiento indolente –mastocitosis sistémica indolente (MSI)– vs. agresivo –mastocitosis sistémica agresiva (MSA) y leucemia de mastocitos (abreviado del inglés como “MCL”)–.

La clasificación reciente de la OMS distingue 9 subtipos de mastocitosis⁵¹². Éstos incluyen 3 variantes de mastocitosis cutánea (MC) –i) urticaria pigmentosa (UP) o mastocitosis cutánea maculopapular (MCMP), ii) mastocitosis cutánea difusa (MCD) y, iii) mastocitoma cutáneo–, 5 subtipos de

mastocitosis sistémicas (MS): -i) mastocitosis sistémica indolente, con o sin lesión cutánea (abreviado del inglés como “MSIs+” y “MSIs-” respectivamente); ii) mastocitosis quiescente o “smoldering”, una variante de MSI de pronóstico intermedio; iii) mastocitosis sistémica agresiva, iv) mastocitosis sistémica asociada a otra hemopatía que afecta a células diferentes del mastocito (abreviado del inglés como “MS-AHNMD” o “MS-AHN”) y; v) leucemia de mastocitos (abreviado del inglés como “MCL”) en la que clínicamente se diferencian 2 variedades (MCL aguda de carácter agresivo y mal pronóstico y MCL crónica, de curso más indolente y mejor pronóstico)- y el sarcoma de mastocitos. En esta nueva clasificación de la OMS de 2016, la mastocitosis sistémica extracutánea⁵²¹ deja de considerarse como un subtipo de mastocitosis debido a su extraordinariamente baja prevalencia⁵¹². Además, dependiendo las características morfológicas, fenotípicas y moleculares del mastocito patológico, en la clasificación de la OMS de 2016, cada uno de estos subtipos de mastocitosis pueden subdividirse en variantes de mastocitosis típica y de mastocitosis bien diferenciada^{41,42}.

3.1.- Diagnóstico de mastocitosis sistémica.

El diagnóstico de MS se establece mediante la demostración de la presencia de infiltrados densos multifocales de mastocitos (agregados de ≥ 15 mastocitos) en MO u otros tejidos (criterio diagnóstico mayor), asociados habitualmente a atipias morfológicas, inmunofenotípicas y/o genéticas (criterios diagnósticos menores); con relativa frecuencia, la enfermedad se acompaña también de niveles basales de triptasa sérica aumentados ($\geq 20\text{ng/mL}$) de forma persistente, lo cual se valora como criterio menor acompañante, excepto en aquellos casos de MS en los que se asocia una neoplasia mieloide (Tabla 12)^{512,513,515,522,523}. Para el diagnóstico definitivo de MS se requiere de la coexistencia del criterio mayor y de al menos uno de los cuatro criterios menores o, en ausencia de agregados mastocitarios, de al menos 3 criterios menores (Tabla 12)^{512,515}.

Tabla 12. Criterios OMS 2016 para el diagnóstico de mastocitosis sistémica.

CRITERIO MAYOR	
1.	Presencia de infiltrados densos multifocales de mastocitos (agregados de ≥ 15 mastocitos) en MO y/o en otros tejidos extracutáneos.
CRITERIOS MENORES	
1.	Morfología atípica en $> 25\%$ de los mastocitos de los agregados multifocales o, en ausencia de agregados, morfología atípica o inmadura en más del 25% de los mastocitos de MO.
2.	Presencia de mutación en el codón 816 del gen <i>KIT</i> .
3.	Expresión aberrante de los marcadores CD25 y/o CD2 en mastocitos de MO.
4.	Niveles basales de triptasa sérica aumentados ($>20\text{ng/mL}$) de forma persistente ¹ .

¹Este criterio no sería valorable en presencia de neoplasia mieloide asociada. (*adaptado de Horny et al.*⁵²⁴)

3.2.- Variantes de mastocitosis sistémica.

3.2.1.- Mastocitosis sistémica indolente (MSI).

La MSI constituye el subtipo más frecuente de MS^{512,513,515}. Habitualmente se caracteriza por la presencia de agregados de mastocitos con morfología atípica y expresión aberrante de CD2 y/o CD25 en los mastocitos de MO y/u otros tejidos extracutáneos. Además, los mastocitos suelen presentar la mutación D816V de *KIT* en más del 90% de los pacientes^{525,526}, asociada en más de la mitad de los casos a niveles séricos basales de triptasa superiores a 20ng/mL⁵²⁶. De entre las MSI, el subtipo más frecuente es la MSI con lesión cutánea (MSIs⁺), en la que la mutación D816V de *KIT* está presente en los mastocitos de la práctica totalidad de los pacientes, asociada a afectación de otras líneas hematopoyéticas en aproximadamente un tercio de los casos^{526,527}. En la MSIs⁺ típica no se observan hallazgos B o C, ni rasgos que sugieran la presencia de otra hemopatía asociada (Tabla 13)⁵¹².

Además de las formas típicas de MSIs⁺, en la última década se ha identificado un nuevo subtipo de MSI sin lesión cutánea (MSIs⁻)⁵²⁴. En este subgrupo de MSIs⁻ se incluyen sujetos que además de no presentar lesión cutánea, suelen mostrar niveles basales de triptasa sérica generalmente normales, asociados a manifestaciones clínicas relacionadas con la liberación de mediadores mastocitarios,

principalmente anafilaxia^{528,529}. La gran mayoría de estos pacientes (>90%) presenta la mutación D816V de *KIT*, casi de forma sistemática restringida al mastocito^{524,526}.

Un tercer subtipo de MSI menos habitual es la mastocitosis quiescente o “smoldering” (MSS)^{512,530,531}. Los pacientes con MSS suelen presentar un mayor grado de infiltración mastocitaria en MO, asociado a ≥ 2 características clínicas que reflejan mayor afectación orgánica (hallazgos de tipo B) (Tabla 13) en ausencia de afectación funcional del (de los) órgano(s) involucrado(s)⁵¹². Estos casos no reúnen criterios para MSA, precisamente por la ausencia de afectación funcional de dichos tejidos (hallazgos de tipo C negativos) (Tabla 13); sin embargo, pueden presentar síntomas constitucionales como astenia crónica o pérdida de peso. A diferencia de las demás MSI, y al igual que ocurre en la MSA, la mutación D816V de *KIT* suele ser multilíneal, detectándose tanto en mastocitos como en otras células hematopoyéticas mieloides e incluso linfoides de MO^{512,513,515,523,532-536}; además, con relativa frecuencia, en estos casos los niveles de triptasa sérica suelen superar los 200 ng/ml⁵³⁷. Por todo lo anterior, en la última revisión de la clasificación de la mastocitosis propuesta por la OMS en 2016, la MSS se considera por primera vez como una categoría independiente y bien definida de MS⁵¹².

Tabla 13. Hallazgos de tipo B y C definidos por la OMS como relevantes a la hora de distinguir entre formas indolentes vs. agresivas de MS.

HALLAZGOS DE TIPO B

1. Infiltración de MO por >30% de mastocitos y/o niveles de triptasa sérica aumentados (>20ng/mL).
2. Presencia de síntomas de displasia/mieloproliferación en líneas celulares hematopoyéticas distintas de la línea mastocitaria (pero insuficientes para diagnóstico de otra hemopatía) asociados a recuentos sanguíneos normales.
3. Hepatomegalia sin daño funcional hepático, esplenomegalia sin hiperesplenismo o linfadenopatías detectables por palpación y/o mediante técnicas de imagen.

HALLAZGOS DE TIPO C

1. Presencia de citopenias que evidencien un mal funcionamiento medular.
2. Hepatomegalia con disfunción hepática.
3. Evidencia de afectación ósea debido a la presencia de lesiones osteolíticas o de fracturas patológicas.
4. Esplenomegalia con hiperesplenismo.
5. Malabsorción con pérdida de peso.

3.2.2.- Mastocitosis sistémica agresiva (MSA).

La MSA representa alrededor del 10% de todas las MS y se caracteriza por presentar habitualmente valores de triptasa sérica basal superiores a 200ng/mL, junto con sintomatología aguda, generalmente asociada a organomegalias y afectación ósea, además de afectación funcional de distintos órganos y tejidos (hallazgos de tipo C)^{524,526,537-540}. En casi la totalidad de las MSA, la mutación D816V de *KIT* es multilínea con afectación de toda la hematopoyesis, detectándose en ocasiones la mutación también en células *stem* mesenquimales de MO⁵⁴¹⁻⁵⁴⁴.

3.2.3.- Mastocitosis sistémica asociada a otra hemopatía (MS-AHN).

La MS-AHN constituye un subgrupo muy heterogéneo de MS, tanto desde el punto de vista clínico como biológico, al estar condicionada su definición por el subtipo de MS (p.ej. MSI vs. MSA vs. MCL) y por la hemopatía clonal coexistente^{524,526} (p.ej. LLC vs. LMMC vs. SMD)^{59,78}. En aproximadamente 85% de estos pacientes, la hemopatía clonal que coexiste con la MS es de origen mielóide, principalmente de tipo SMD/NMP y LMA⁵⁴⁵⁻⁵⁴⁹, y sólo en una minoría de los casos, es de origen linfóide^{526,549,550}. Casi la mitad de los pacientes muestran una MSI y la otra mitad una MSA, siendo raros los pacientes que presentan MCL^{512,515,545,550}. A pesar de que pueda resultar difícil, el diagnóstico de MS-AHN sobre todo en pacientes con MS indolente sin lesión cutánea o con lesiones cutáneas muy poco evidentes, la MS-AHN se considera como el segundo subtipo de MS más frecuente, después de la MSI^{512,515,549}.

Cabe señalar que en las MS-AHN en las que la AHN es de componente mielóide, la mutación de *KIT* suele ser multilínea, mientras que las MS-AHN de componente linfóide, la mutación de *KIT* suele estar restringida a mastocito^{512,520,523,532,541,545}. No obstante, existe una proporción significativa de casos en los que esta regla no se cumple de forma estricta⁵⁵¹. Así, el conocimiento del perfil genético de los pacientes con MS-AHN no siempre es fácil de definir, ya que por ejemplo, en pacientes con MS con SMD o SMD/NMP, el cariotipo puede ser normal en más de la mitad de los casos y las alteraciones citogenéticas estudiadas por FISH son (en número) relativamente limitadas, analizándose generalmente sobre la muestra total de

células hematopoyéticas de MO del paciente y no sobre los distintos compartimientos de células tumorales (SM y AHN) purificados^{545,552}.

A pesar de esta limitación, en los últimos años la aplicación de técnicas de secuenciación masiva ha permitido conocer mejor el perfil genético de los pacientes con MS-AHN, habiéndose detectado un número relativamente importante de mutaciones somáticas (además de las mutaciones de *KIT*) en la MO de estos sujetos^{532,552-555}. Así se ha podido identificar la presencia de mutaciones en los genes *TET2*, *SRSF2*, *ASXL1*, *CBL*, *RUNX1* y *RAS*^{532,552}, y en menor frecuencia también, en los genes *JAK2*, *V617F*, *AML1-ETO* y *FIP1L1-PDGRFA*^{531,551}. Aunque la mayoría de estos estudios se han realizado sobre muestras de MO total, en algunos casos se llevaron a cabo sobre muestras enriquecidas mediante técnicas de microdissección⁵⁴⁵ o sobre células cultivadas a partir de la MO de pacientes con MS-AHN⁵⁵². Precisamente, los estudios realizados sobre distintos compartimientos celulares de MO de pacientes con MS-AHN sugieren la existencia de diferentes patrones genéticos de afectación y evolución clonal en los pacientes con MS-AHN, en los que la aparición de *KIT* podría constituir un evento relativamente tardío (posterior a la aparición de alguna de las otras mutaciones típicas de la AHN)⁵⁵². Sin embargo, hasta la fecha no se ha determinado el posible impacto de los diferentes patrones genéticos encontrados, en el comportamiento clínico y el pronóstico de los pacientes con MS-AHN, comportamiento que hoy se cree que depende sobre todo de los diferentes subtipos de MS y AHN que coexisten en el mismo paciente⁵¹³.

3.2.4.- Leucemia de mastocitos (MCL).

La MCL constituye una de las variantes menos frecuentes de MS (<2% de los casos) y a la vez la más agresiva^{523,556}. En general, la MCL suele mostrar infiltración medular por mastocitos fenotípicamente inmaduros^{524,526,539} que superan el 20% de la celularidad global de la MO; habitualmente se acompaña de organomegalias con afectación funcional del tejido infiltrado⁵³⁰. Las lesiones cutáneas pueden estar presentes o no y los mastocitos, aunque fenotípicamente aberrantes (CD25+) suelen ser negativos para CD2, siendo la frecuencia de la mutación D816V de *KIT* variable^{523,556}. Debido a la gran heterogeneidad de la enfermedad, recientemente se han definido nuevos subtipos diagnósticos de MCL, distinguiéndose 6

variantes según la forma de presentación de la enfermedad: i) MCL aleucémica, (infiltración <10% de MC aberrantes en SP), ii) MCL típica con >10% de MC aberrantes en SP; iii) MCL “*de novo*”, y iv;) MCL secundaria; v) MCL crónica, y; vi) MCL aguda⁵⁵⁷. La nueva clasificación de la OMS de 2016 adopta estos criterios para la subclasificación de la MCL, haciendo especial hincapié en las dos categorías de MCL que según el comportamiento clínico y pronóstico de la enfermedad hacen que ésta se comporte como una MCL crónica vs una MCL aguda⁵¹².

3.2.5.- Variantes de mastocitosis sistémica bien diferenciada (WDSM).

Recientemente se ha descrito una nueva variante de MS conocida como MS bien diferenciada (abreviado del inglés como WDSM), caracterizada por la aparición en edades pediátricas, sobre todo en mujeres, asociada a mastocitos hipergranulados, de morfología redondeada, habitualmente en ausencia de fenotipo aberrante (CD25⁻ y CD2⁻) y de la mutación D816V de *KIT*^{512,515,558}; esto hace que con relativa frecuencia (en ausencia de niveles basales de triptasa sérica elevados) estos pacientes, aun presentando lesiones cutáneas típicas y agregados de mastocitos en MO, no alcancen a cumplir los criterios diagnósticos de la OMS para MS⁵²⁶. Por este motivo, se ha propuesto que además del criterio mayor (basado en la presencia de agregados compactos de mastocitos en MO), se empleen dos nuevos criterios diagnósticos menores complementarios para definir con mayor precisión este subgrupo de MS⁵⁵⁹: i) expresión aberrante de CD30 y/o sobreexpresión de carboxipeptidasa A y/o triptasa, detectada por CMF, y; ii) presencia de mastocitos clonales con o sin mutación de *KIT*. Actualmente, la WDSM no constituye una variante de MS reconocida como tal en la clasificación de la OMS; sin embargo, se recomienda en dicha clasificación la anotación dentro de cada variante de mastocitosis (MC, MSI, MSA, MCL) de si se trata de formas típicas, o de la variante bien diferenciada^{512,556,558,560}.

3.2.6.- Sarcoma de mastocitos y mastocitoma extracutáneo.

El sarcoma de mastocitos y el mastocitoma extracutáneo constituyen dos variantes de mastocitosis extremadamente raras y poco documentadas^{512,513,515}. Si bien ambas entidades representan tumores bien

localizados, a diferencia del mastocitoma extracutáneo, de localización característicamente pulmonar y generalmente de carácter no invasivo⁵²⁴, el sarcoma tiene características invasivas (aunque de crecimiento lento)⁵²⁴. Debido a que se trata de una variante extremadamente rara, se pone en duda la definición del mastocitoma extracutáneo como una verdadera subcategoría de mastocitosis (en los últimos 20 años tan sólo se ha documentado un caso⁵¹²).

3.3.- Evolución clínica y pronóstico de la mastocitosis sistémica.

En términos generales, la clasificación diagnóstica de la OMS de la mastocitosis tiene ya de por sí un importante impacto pronóstico^{512,517,561}. Así, las formas localizadas (p.ej. MC) y las MSI se asocian en general a muy buen pronóstico^{512,513,515,522,556}, mientras que las MSA, la MS-AHN y la MCL se consideran formas avanzadas de la enfermedad, asociadas a mal pronóstico y requieren de tratamiento citostático^{512,556}; dentro de estas últimas, la MCL aguda constituye una entidad especialmente agresiva con una mediana de supervivencia global inferior a 12 meses^{512,556}. Asimismo, cabe señalar que dentro de las MS-AHN, el pronóstico de la enfermedad estaría determinado principalmente por el subtipo diagnóstico concreto de MS y de AHN que coexisten en el mismo paciente^{549,550}, y que determinan también la estrategia terapéutica a seguir^{515,522,562}.

Asimismo, estudios recientes sugieren que la presencia de mutaciones de *KIT* diferentes de la mutación D816V^{563,564} o de mutaciones de otros genes asociados a neoplasias mieloides (entre las que merece destacar mutaciones de los genes *ASXL1*, *CBL*, *IDH1/2*, *JAK2*, *KRAS*, *MLL-PTD*, *NPM1*, *NRAS*, *TP53*, *SRSF2*, *SF3B1*, *SETBP1*, *U2AF1*, *EZH2*, *ETV6*, *RUNX1* y *TET2*) y especialmente el número de estas mutaciones (superior en MSA vs MSI)⁵⁶⁵ se asociarían también a un peor pronóstico^{552,554,565}. Así, en alrededor de 80% de las MS avanzadas, se detectan ≥ 3 mutaciones de los genes antes mencionados, y cerca de la mitad de los pacientes presentan ≥ 5 mutaciones⁵⁶⁵. En consecuencia, todo parece indicar que el número de mutaciones detectadas en pacientes con MS estaría directamente relacionado también con el pronóstico de la enfermedad⁵⁶². Por otra parte, estudios recientes en los que se emplean técnicas de secuenciación masiva han permitido conocer mejor también el perfil genético de las MS-AHN^{532,552-555}, habiéndose sugerido que

las mutaciones de los genes *ASXL1*, *SRSF2* y *RUNX1* podrían conferir un peor pronóstico de forma específica a pacientes con MS-AHN portadores de estas alteraciones⁵⁵², mientras que las mutaciones del gen *TET2* no mostrarían un impacto pronóstico significativo⁵⁵⁴. Por el momento seguimos careciendo de estudios en los que se analiza el impacto pronóstico de estas anomalías en pacientes con MSI.

Aunque se trata de subtipos diagnósticos bien definidos, y disponemos de criterios que permiten clasificar de forma inequívoca la casi totalidad de los pacientes con mastocitosis, a lo largo de la evolución de la enfermedad esta puede progresar desde formas indolentes (p.ej. MSI) a variantes más agresivas de MS como MSA, MS-AHN y MCL^{512-515,535,549,556}. Sin embargo, esto sólo ocurre en una minoría de las MSI, mostrando habitualmente la enfermedad un curso indolente. De hecho, algunos estudios muestran tasas de progresión de MSI a formas agresivas de la enfermedad de tan sólo un 3%⁵²⁷.

Desde el punto de vista pronóstico, estudios preliminares sugieren que niveles séricos de $\beta 2$ microglobulina elevados, junto con la mutación multilínea de *KIT* en las líneas hematopoyéticas de MO constituirían los factores de riesgo con mayor valor a la hora de predecir progresión en pacientes con MSI⁵²⁷. Si bien en los casos que progresaban se observaba con más frecuencia niveles de triptasa sérica >200 ng/mL y presencia de organomegalias y osteoporosis, estos parámetros no mostraron valor predictivo independiente⁵²⁷. Aunque en otros trabajos se ha asociado un pronóstico adverso de la enfermedad con la presencia de anemia, el incremento de los niveles de fosfatasa alcalina sérica (FA) y del número de mastocitos que infiltran la MO⁵⁶⁶, edad avanzada, pérdida de peso, trombocitopenia, hipoalbuminemia y exceso de blastos en la MO⁵⁴⁹, en ellos no se ha analizado de forma específica el impacto de esos parámetros sobre la progresión de formas indolentes a formas agresivas de la enfermedad. Así, de todos los factores de riesgo propuestos hasta la fecha, el grado de afectación de la hematopoyesis por la mutación D816V de *KIT*⁵²⁰ constituye el parámetro de mayor valor predictivo para la supervivencia libre de progresión de pacientes con MSI. Los pacientes con MSI que presentan mutación de *KIT* D816V restringida a mastocito tienen una supervivencia libre de progresión y una supervivencia global similar a la de la población general^{513,527,549}. Por el contrario, las MSA en las que dicha mutación no está restringida al mastocito, sino que se detecta en otras poblaciones de células mieloides además del mastocito, presentan

una supervivencia global y una supervivencia libre de progresión significativamente acortadas y, por lo tanto, un peor pronóstico^{513,520,527,549}.

Además se ha referido que dentro de la MSI, aquellos casos en los que la mutación afecta, además de al mastocito y las células mieloides, a las células linfoides y las células mesenquimales⁵⁴¹, y los pacientes que muestran niveles séricos elevados de IL6 asociados a la mutación multilínea de *KIT*, tendrían una supervivencia libre de progresión especialmente disminuida a corto y medio plazo⁵⁶⁷.

CAPÍTULO II.

Hipótesis de trabajo y
objetivos.

La hematopoyesis tiene como finalidad la producción a lo largo de la vida del individuo, de un número relativamente estable de elementos celulares maduros y funcionales de cada una de las distintas líneas de células mieloides y linfoides, a partir de un número relativamente reducido de células *stem* hematopoyéticas^{31,568-570}. La célula *stem* hematopoyética se caracteriza por ser una célula indiferenciada capaz de multiplicarse y diferenciarse mediante mecanismos de división asimétrica^{84,571-576}. Estos mecanismos aseguran por un lado, mantener un nivel constante de células *stem*, y por otra parte, producir un número adecuado de precursores y de células maduras de las diferentes líneas hematopoyéticas mieloides y linfoides^{7,31,568-570}. En este proceso intervienen múltiples vías de señalización celular, habitualmente moduladas por interacciones entre la célula *stem* hematopoyética y la matriz extracelular, los elementos celulares del microambiente medular y sus productos¹⁻⁵.

En la clasificación actual de la OMS de las neoplasias hematológicas se definen siete grandes grupos de hemopatías mieloides entre las que se incluyen las leucemias mieloides agudas, los síndromes mielodisplásicos, las neoplasias mieloproliferativas, los SMD/NMP y las mastocitosis³²¹. En común, en estas neoplasias se observa afectación en grado variable de la célula *stem* hematopoyética, requiriéndose habitualmente para su desarrollo de la coexistencia de dos o más alteraciones genéticas y/o moleculares^{229,291,293,323,324,423,446,454,577}. En este sentido, las características biológicas y el comportamiento clínico de las hemopatías malignas mieloides dependería en gran medida de las alteraciones genéticas subyacentes presentes en la célula *stem* hematopoyética de cada paciente^{321,578-587}. Ante esta hipótesis, cabe sospechar que, aunque la mayoría de las LMA surgen aparentemente “*de novo*”, en realidad podrían originarse sobre una hematopoyesis ya alterada (p.ej. genéticamente)^{291,293,453,454}; dicha alteración puede haberse manifestado como un déficit o un exceso en la producción de uno o más tipos de células hematopoyéticas, lo cual conllevaría a un comportamiento clínico característico de por ejemplo, un SMD o una NMP^{291,293,446}, respectivamente. Si, por el contrario, dicha alteración no se ve reflejada en una alteración del número de células hematopoyéticas maduras y/o en cambios morfológicos importantes, podría abocar a una hematopoyesis clonal de pronóstico indeterminado (CHIP), objetivable únicamente a nivel genético,

en ausencia de consecuencias clínicas y biológicas inmediatas^{224,229,230,235,309,310}. En cualquier caso, la progresión desde la primera alteración genética, a una hemopatía clonal –ya sea un SMD, una NMP y/o una LMA– iría asociado a un acúmulo progresivo de alteraciones genéticas y moleculares asociado a la aparición de distintos patrones de evolución clonal en las células *stem* afectadas y su progenie^{224,230,235,291,293,298,446}. Por otro lado, dichas alteraciones se traducirían además en cambios fenotípicos asociados a una tasa de proliferación y/o supervivencia celular alterada, junto a cambios madurativos que terminan por afectar la producción normal de las diferentes líneas hematopoyéticas con las correspondientes citopenias (o expansiones) periféricas de una o más líneas celulares, y las manifestaciones clínicas asociadas a las mismas (p. ej. anemia, alteraciones hemorrágicas y/o infecciones)^{343,588-590}. En este sentido, en la actualidad seguimos sin conocer si la transformación neoplásica de una célula *stem* hematopoyética normal y su evolución a LMA sigue un proceso de evolución (clonal) lineal o si por el contrario, existen múltiples vías de evolución clonal que terminan originando diferentes enfermedades, parcialmente solapadas entre sí. En este contexto, la mastocitosis sistémica (MS) constituye un modelo idóneo para el estudio de la progresión neoplásica y la transformación maligna de las hemopatías mieloides clonales. Por un lado, se trata de una enfermedad con una alteración molecular adquirida (somática) y universal: la mutación de *KIT* y en especial la mutación de D816V de *KIT*^{534,563,564,591,592}. Por otra parte, el diagnóstico de la enfermedad, con frecuencia se lleva a cabo en una etapa relativamente temprana de la misma (p.ej. inmediatamente tras el nacimiento), aunque clínicamente los pacientes terminan por mostrar un comportamiento heterogéneo que incluye desde formas indolentes (las más habituales, como la MSI) asociadas o no a la presencia de lesiones cutáneas, a formas agresivas que en un porcentaje significativo (5–10%) de los casos están asociadas a transformación (a medio y largo plazo) a SMD, SMD/NMP o LMA^{514,515,520,523,527,549}.

Ante estos antecedentes, en este trabajo doctoral nos planteamos como **objetivo general** profundizar en el conocimiento de los mecanismos y vías que intervienen en el desarrollo y progresión de las hemopatías malignas mieloides, a través del estudio de los patrones de evolución clonal subyacentes, y las alteraciones proliferativas y madurativas asociadas a los mismos. Para ello, definimos cuatro **objetivos específicos**:

- Analizar la tasa proliferativa de distintos compartimientos celulares de MO normal y de MO reactiva de pacientes con citopenias no clonales, con el fin de establecer un marco de referencia del índice proliferativo normal de los precursores CD34⁺ mieloides y de los distintos compartimientos madurativos de MO de las líneas celulares de granulocito neutrófilo, monocito y eritroide.
- Definir las posibles alteraciones existentes en la tasa proliferativa de diferentes compartimientos celulares de MO de pacientes con LMA y SMD en distintos estadios de la enfermedad, respecto a su contrapartida normal, con el fin de identificar posibles asociaciones entre el patrón de alteración encontrado, y el comportamiento clínico y biológico de la enfermedad.
- Identificar patrones de evolución clonal presentes en distintos compartimientos celulares de MO de pacientes con LMA y determinar su posible relación con la existencia de una hematopoyesis clonal residual y de alteraciones fenotípicas que pudieran contribuir al diagnóstico temprano de la enfermedad, incluso de forma previa a su transformación maligna; y,
- Analizar los patrones de alteraciones genéticas y moleculares acumuladas en los distintos compartimientos de células hematopoyéticas de MO afectados, de pacientes con mastocitosis sistémica asociada a otras hemopatías mieloides y/o linfoides, con el fin de identificar distintas vías de evolución clonal que pudieran contribuir a explicar el comportamiento clínico y biológico heterogéneo de este subtipo de mastocitosis.

CAPÍTULO III.

Material, métodos y
resultados.

En esta sección de la memoria se describen los pacientes, los materiales y los métodos empleados en este trabajo, así como los principales resultados obtenidos en relación con cada uno de los objetivos planteados, mediante la inclusión de los artículos científicos originales publicados como consecuencia del trabajo realizado. Cada uno de los artículos referidos está precedido de un breve resumen en castellano que facilita una revisión rápida de la información contenida en los mismos.

ARTÍCULO 1:

“Distribución de los diferentes compartimentos celulares de médula ósea normal versus reactiva a lo largo de las distintas fases del ciclo celular: un marco de referencia para el estudio de la hematopoyesis displásica.”

Objetivos. Pese a los importantes avances alcanzados en el conocimiento de la etiopatogenia de las hemopatías mieloides y en especial de los SMD y la LMA, la información disponible acerca de las alteraciones que ocurren en la tasa de proliferación celular de las células hematopoyéticas de estos pacientes, sigue siendo muy limitada. En este trabajo realizamos un análisis comparativo del índice de proliferación de los principales compartimentos celulares de médula ósea de individuos sanos con respecto al de los mismos compartimentos celulares de pacientes con citopenias persistentes de origen no clonal, con el fin de establecer valores de referencia que pudieran ser de utilidad en el estudio de la proliferación celular de la hematopoyesis displásica.

Materiales y métodos. En conjunto, estudiamos un total de 94 muestras de médula ósea de 47 donantes sanos sometidos a cirugía ortopédica y 47 individuos con citopenias reactivas en los que se descartó clonalidad mediante citomorfología, inmunofenotipo y técnicas de FISH y/o HUMARA. En todos los casos se combinó el estudio del índice de proliferación celular mediante el fluorocromo DRAQ5, con marcajes inmunofenotípicos específicos para la identificación de las distintas poblaciones celulares de MO

estudiadas. Para el análisis de la distribución en las diferentes fases del ciclo celular, de las distintas poblaciones de células hematopoyéticas de MO identificadas mediante las distintas combinaciones de marcadores inmunofenotípicos empleados (progenitores/precursores hematopoyéticos CD34+, precursores de línea de granulocito neutrófilo, línea monocítica, eritroide, de granulocito eosinófilo, y linfocitos) utilizamos técnicas de citometría de flujo.

Resultados. En términos globales, las células de MO normal y de MO de pacientes con citopenias no clonales, mostraron índices de proliferación similares. No obstante, existían importantes diferencias en ambos tipos de muestras, entre los distintos compartimientos celulares analizados. Así, en ambos grupos, los precursores eritroides constituyeron la población celular que mostró mayor tasa proliferativa, seguida de los precursores no linfoides CD34⁺ y los estadios iniciales (CD11b⁻) de diferenciación a línea de granulocito neutrófilo, siendo la fase proliferativa de los demás compartimientos celulares de MO analizados significativamente menor. Al comparar de forma específica la tasa proliferativa de cada compartimiento celular estudiado en MO normal y MO reactiva, las únicas diferencias encontradas se restringían a: i) las poblaciones más maduras (CD13⁺⁺/CD11b⁺) de granulocito neutrófilo y de monocito, que mostraban una mayor tasa proliferativa entre los pacientes con citopenias no clonales, y ii) los precursores CD34⁺ no linfoides, que por el contrario, mostraban una mayor tasa proliferativa en MO normal.

Conclusiones. Nuestros resultados muestran que los pacientes con citopenias no clonales presentan ligeros cambios en el índice de proliferación de algunos compartimientos celulares hematopoyéticos de médula ósea que podrían reflejar una tendencia compensatoria hacia la producción de formas maduras y funcionales de monocitos y granulocitos neutrófilos, en detrimento de una menor expansión de los progenitores hematopoyéticos CD34⁺ más inmaduros.

Original Article

Cell-Cycle Distribution of Different Cell Compartments in Normal Versus Reactive Bone Marrow: A Frame of Reference for the Study of Dysplastic Hematopoiesis

Sergio Matarraz,¹ Carlos Fernandez,¹ Manuel Albors,² Cristina Teodosio,¹
Antonio López,¹ María Jara-Acevedo,¹ Carlos Cervero,³ Gonzalo Caballero,⁴
Oliver Gutierrez,⁵ and Alberto Orfao^{1*}

¹Servicio de Citometría and Departamento de Medicina, Centro de Investigación del Cáncer, Instituto de Biología Celular y Molecular del Cáncer, CSIC-USAL, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain

²Servicio de Hematología, Hospital Juan Canalejo, La Coruña, Spain

³Servicio de Hematología, Hospital Virgen de la Luz, Cuenca, Spain

⁴Servicio de Hematología, Hospital San Jorge, Huesca, Spain

⁵Servicio de Hematología, Hospital Rio Hortega, Valladolid, Spain

Limited information is currently available about the proliferation activity and cell-cycle distribution of different bone marrow (BM) cell subsets defined according to their lineage and maturation stage in normal versus cytopenia-associated reactive BM samples. Here, we report a three-color flow cytometry approach to investigate the cell-cycle distribution of different BM cell compartments—CD34⁺ hematopoietic progenitor and precursor cells (HPC), maturing neutrophils and monocytic cells, mature lymphocytes, eosinophils, and nucleated red blood cell precursors (NRBC)—from normal ($n = 47$) versus cytopenia-associated reactive ($n = 47$) BM samples. Highly similar proliferation profiles were detected in normal versus reactive BM, with a higher proliferation index (PI) for the more immature CD34⁺ HPC, CD11b⁻ maturing neutrophils and NRBC versus other BM cell compartments. The only differences observed between normal and reactive BM were restricted to the more mature (CD13^{hi}/CD11b⁺) bands/neutrophils and to monocytic cells, which showed an increased PI ($0.9\% \pm 0.8\%$ vs. $0.6\% \pm 0.5\%$ and 6 ± 3.6 vs. 4.6 ± 4.5 , respectively) at the expense of a lower PI of CD34⁺ HPC in reactive conditions. Of note, bands/mature neutrophils and mature lymphocytes showed either residual numbers or absence of S + G₂/M-phase cells in both normal and reactive BM. Our results suggest that a slight shift of proliferation from the early precursors to the more mature granulomonocytic compartment occurs in reactive BM, which could reflect an attempt of the hematopoietic system to rapidly produce functional neutrophils and monocytes, at the expense of a lower expansion of the minor compartments of CD34⁺ HPC. © 2011 International Clinical Cytometry Society

Key terms: proliferation index; cell cycle; bone marrow; flow cytometry

How to cite this article: Matarraz S, Fernandez C, Albors M, Teodosio C, López A, Jara-Acevedo M, Cervero C, Caballero G, Gutierrez O, Orfao A. Cell-cycle distribution of different cell compartments in normal versus reactive bone marrow: A frame of reference for the study of dysplastic hematopoiesis. *Cytometry Part B* 2011; 80B: 354–361.

Grant sponsor: Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, Spain; Grant number: RTICC RD06/0020/0035; Grant sponsor: Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain; Grant number: P108/90881; Grant sponsor: Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain-Universidad de Salamanca (Programa Nacional Personal Técnico de Apoyo a la Investigación).

*Correspondence to: Alberto Orfao, Servicio General de Citometría, Centro de Investigación del Cáncer, Campus Miguel de Unamuno, 37007-Salamanca, Spain. E-mail: orfao@usal.es.

Received 4 March 2011; Revision 28 April 2011; Accepted 4 May 2011

Published online 2 June 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

DOI: 10.1002/cyto.b.20605

Cell cycle plays a crucial role in the biology of both prokaryotes and eukaryotes (1–4). In human embryonic stages and early ages after birth, cell proliferation is a key function for the development of adult tissues (5,6); later on, it is crucial in fundamental life processes such as cell differentiation and apoptosis, and other relevant biologic mechanisms related to cell development, tissue maintenance, regeneration, and repair (6–11). Within the hematopoietic system, deregulation of the cell cycle has been associated with bone marrow (BM) failure (12–14) and prognosis of several hematological malignancies such as acute myeloblastic leukemia (AML) and multiple myeloma, among others (15,16). Despite this, a careful analysis of the literature shows that limited information has been reported (17) about the proliferation activity and cell-cycle distribution of different compartments of BM cells defined according to their lineage and maturation stage in normal versus cytopenia-associated reactive BM samples.

Flow cytometry immunophenotyping provides a unique tool to assess the distribution of different lineage- and maturation-associated cell compartments in normal versus reactive BM (18,19). At the same time, the proliferation index (PI) of each cellular compartment may be determined in primary samples using supravital DNA dyes such as DRAQ5, in combination with multiple cell surface stainings (20,21). Although such approaches have been applied to the analysis of the PI of normal versus neoplastic B-cells, (17), to the best of our knowledge, no study has been reported so far in which this has been assessed for other BM cell populations in normal versus cytopenia-associated reactive BM samples.

In the present study, we used a three-color flow cytometry approach to investigate the cell-cycle distribution of different BM cell compartments—CD34⁺ hematopoietic progenitor and precursor cells (HPC), maturing neutrophils and monocytic cells, mature lymphocytes, eosinophils, and nucleated red blood cell precursors (NRBC)—in normal ($n = 47$) versus cytopenia-associated reactive ($n = 47$) BM samples, as a frame of reference for the evaluation of cell-cycle alterations in dysplastic BM samples from patients with malignant myeloid disorders—for example, myelodysplastic syndromes (MDS), AML, or myeloproliferative neoplasms.

MATERIALS AND METHODS

BM Samples

A total of 94 freshly obtained, EDTA-anticoagulated normal ($n = 47$) and reactive ($n = 47$) BM samples from an identical number of individuals (46 men and 48 women; mean age of 67 years, ranging from 47 to 79 years) were collected at the University Hospital of Salamanca (Spain). Normal BM samples were obtained from healthy volunteer donors and during routine surgical procedures from individuals undergoing orthopaedic surgery—both groups of subjects had normal blood cell counts—while reactive samples corresponded to patients with iron and/or vitamin B₁₂/folic acid deficiency associated with anemia and other toxic (e.g.,

drug-induced) or reactive (e.g., idiopathic) cytopenias, including infection-associated leukopenias. None of the reactive samples showed clonal hematopoiesis, based on the absence of cytogenetic abnormalities, as assessed by fluorescence in situ hybridization (FISH) and/or a polyclonal pattern of inactivation of chromosome X, as specifically evaluated in females by the human androgen receptor assay (HUMARA) test. All BM samples were obtained after informed consent was given by each subject according to the recommendations of the local Ethics Committee, and samples were systematically studied within the first 18 h after they were obtained.

Cell-Cycle Analysis

Analysis of the distribution of different compartments of BM cells along the G_0/G_1 , S, and G_2/M cell cycle phases was performed immediately after samples were obtained using triple-stainings for nuclear DNA and two cell surface antigens. Briefly, EDTA-anticoagulated whole BM samples—cell concentration adjusted with phosphate buffered saline (PBS; pH = 7.4) to 10⁶ cells in 100 μ l/tube—were incubated in two separate aliquots for 10 min in the dark at room temperature (RT) with saturating amounts (10 μ l of each reagent) of the following combinations of fluorescein isothiocyanate-/phycoerythrin-conjugated monoclonal antibodies purchased from Becton Dickinson Biosciences (BDB; San Jose, CA): CD45/CD34, CD11b/CD13. Once the incubation period was completed, 2 ml of FACS lysing solution (BDB) diluted 1/10 (vol/vol) in distilled water was added to each tube and another incubation performed for 5 min in the dark (RT). Afterward, cells were washed with 2 ml of PBS and the cell pellet resuspended in 0.5 ml PBS. Then, 3 μ l of DRAQ5TM (Vitro SA, Madrid, Spain) was added to each tube, and another incubation was performed for 10 min in the dark at RT. Immediately after this incubation, sample aliquots were measured in a FACSCanto IITM flow cytometer (BDB) using the FACSDiva software program (BDB). For each sample aliquot, information about $>1 \times 10^5$ cells corresponding to the whole BM cellularity was measured and stored; for each cell population, information on $>1 \times 10^3$ cells was collected for cell-cycle analysis purposes. For data analysis, the INFINICYTTM software program (Cytogenos SL, Salamanca, Spain) was used. The overall percentage of proliferating cells, including those cells within the S plus G_2/M cell-cycle phases, was identified as those cells showing a brighter staining of DRAQ5 than those included in the G_0/G_1 peak (Fig. 1A) (17,20).

For each sample, the following cell populations were identified after excluding dead cells and cell doublets in a sideward light scatter (SSC) versus DRAQ5-fluorescence area and a DRAQ5-fluorescence area versus DRAQ5-fluorescence width bivariate dot plot (Fig. 1A): total CD34⁺ HPC (CD45^{lo}/CD34⁺ events), (22) CD34⁺ myeloid HPC (SSC^{int}/CD34⁺), CD34⁺ lymphoid HPC (SSC^{lo}/CD34⁺ cells), nucleated red cell precursors (SSC^{lo/very-lo}/CD45⁻ events), monocytic cells (SSC^{int}/CD45^{int/hi}/CD11b^{hi}/CD13^{hi} cells), eosinophils (SSC^{hi}/autofluorescent cells), mature lymphocytes (CD45^{hi}/

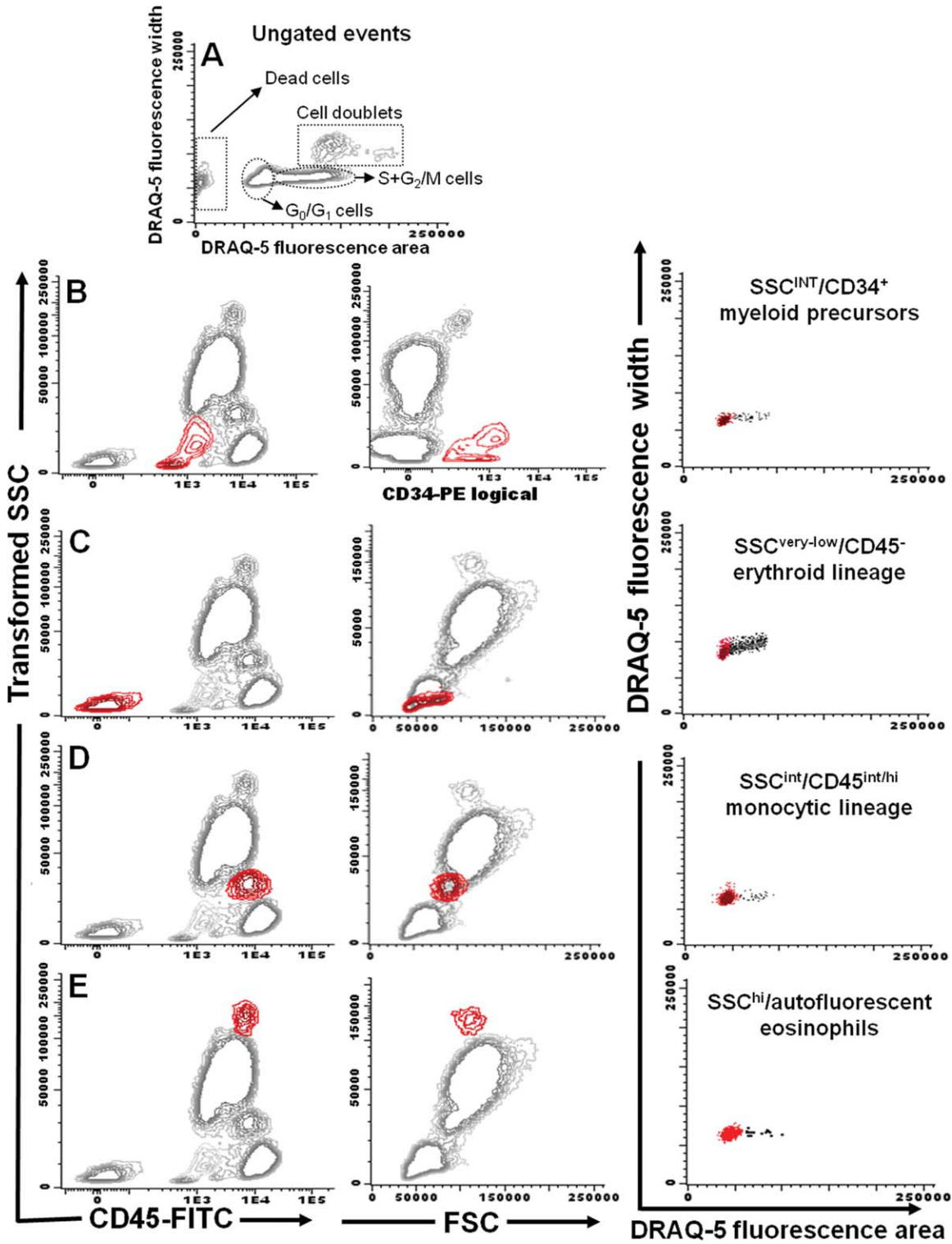


Fig. 1. Representative bivariate dot plots of a normal bone marrow (BM) sample, illustrating the gating strategy used for the immunophenotypic identification of the different populations of BM cells analyzed (excluding neutrophils and mature lymphocytes) (rows B–E) and the analysis of their cell-cycle distribution according to their DNA cell content (right column); S + G₂/M phase cells within each BM cell population are depicted in black. Panel A depicts the strategy used to discard dead cells and doublets. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

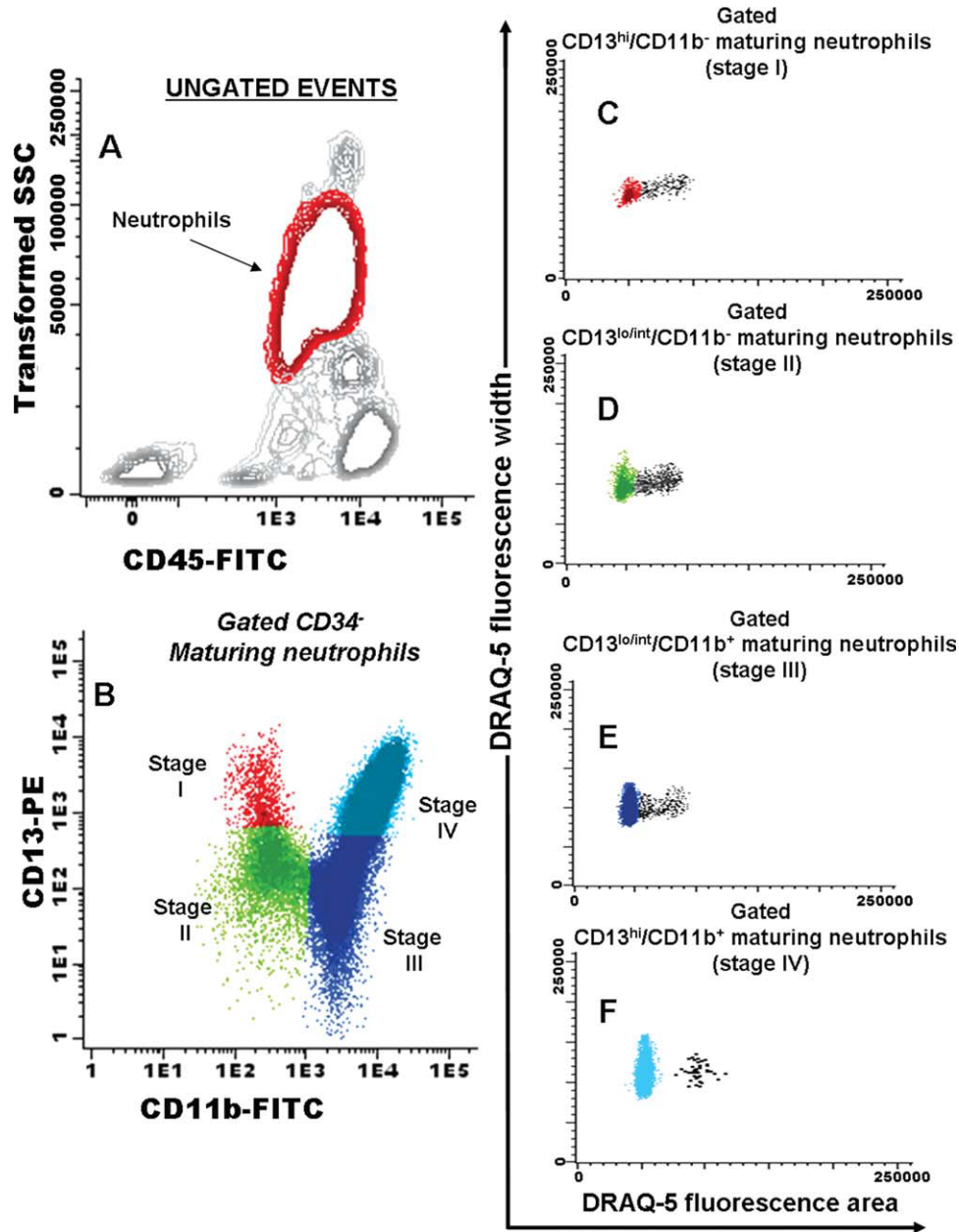


Fig. 2. Bivariate SSC versus CD45 and CD13 versus CD11b dot plot histograms of a normal bone marrow (BM) sample depicting the population of gated CD34⁻ maturing neutrophils (panel A) and their different maturation stages—stage I, CD13^{hi}/CD11b⁻; stage II, CD13^{lo/int}/CD11b⁻; stage III, CD13^{lo/int}/CD11b⁺, and; stage IV, CD13^{hi}/CD11b⁺ (panel B). In panels C–F, the analysis of the proliferation index (PI) of the different maturation-associated compartments of BM neutrophils defined in panel B is displayed (black dots correspond to S + G₂/M phase maturing neutrophils).

SSC^{lo}), and maturing neutrophils (CD45^{lo}/SSC^{int/hi}); in addition, these later cells (neutrophils) were further subdivided into four maturation-associated cells subsets: CD13^{hi}/CD11b⁻, CD13^{lo/int}/CD11b⁻, CD13^{lo/int}/CD11b⁺, and CD13^{hi}/CD11b⁺ maturing neutrophils (Fig. 2) (19). The specific immunophenotypic characteristics of mature lymphocytes were taken as a standard to define the relative position of the different compartments of BM precursors in a CD45 versus SSC bivariate dot plot. For each of the above-listed cell populations, the distribution

along the G₀/G₁, S, and G₂/M cell-cycle phases was calculated as previously described (Figs. 1B–1E and 2C–2F) (15). Mean coefficient of variation for the G₀/G₁ peak of the different cell populations was of 6.3% ± 1.5%.

Conventional Karyotyping, FISH, and HUMARA Studies

Cytogenetic analysis of BM samples was performed according to standard procedures (23) and interpreted using the International System for Cytogenetic Nomenclature criteria (24). In addition, double-staining interphase

Table 1
Distribution of Different Maturation-Associated Compartments Of Cells (Including Distinct Subsets of Maturing Neutrophil Lineage Cells) in Normal ($n = 47$) versus Reactive ($n = 47$) Bone Marrow (BM)

	Distribution of BM cell populations				P-value
	Normal BM ($N = 47$)		Reactive BM ($N = 47$)		
	% of specific cell subsets	% of total BM	% of specific cell subsets	% of total BM	
Total CD34 ⁺ HPC	—	0.9 ± 0.8 (0.06–4.5)	—	0.7 ± 0.4% (0.2–2%)	NS
CD34 ⁺ nonlymphoid precursors	93% ± 8.5% (70–100%)	0.9% ± 0.8% (0.06–4.4)	92% ± 7% (72–100%)	0.6% ± 0.4% (0.2–2%)	NS
CD34 ⁺ lymphoid precursors	6.5% ± 8% (0–30%)	0.07% ± 0.1% (0–0.7%)	7.6% ± 7% (0–27.5%)	0.07% ± 0.1% (0–0.7%)	NS
Maturing neutrophils	—	60% ± 9% (44–78%)	62% ± 11% (41–90%)	—	NS
CD13 ^{hi} /CD11b ⁺ myeloblasts	2% ± 1% (0.2–5.5%)	1% ± 0.5% (0.1–2.5%)	2% ± 1.5% (0.6–8%)	1% ± 0.5% (0.5–2%)	NS
CD13 ^{lo/int} /CD11b ⁺ promyelocytes	14% ± 6% (3–31%)	7.6% ± 4% (1–19%)	14% ± 6% (6–29%)	8.7% ± 3.5% (4–16%)	NS
CD13 ^{lo/int} /CD11b ⁺ myelocytes and metamyelocytes	35% ± 10% (12–56%)	19% ± 8% (5–37.5%)	38.5% ± 9% (18–53%)	26% ± 8.5% (11–55%)	<0.03
CD13 ^{hi} /CD11b ⁺ bands/mature neutrophils	49% ± 13% (27–81%)	33% ± 14% (13–61%)	45% ± 12% (19–65%)	28% ± 10% (12–57%)	NS
Monocytic cells	—	4% ± 2% (0.7–9%)	—	4.5% ± 2% (0–11%)	NS
Nucleated red blood cell precursors	—	15% ± 9% (1–33%)	—	15.5% ± 10% (4–41%)	NS
Eosinophils	—	3.5% ± 4.5% (0.1–20%)	—	2% ± 1% (0.1–5.5%)	NS
Mature lymphocytes	—	13% ± 5.4% (6–27.5%)	—	12% ± 5% (4–23.5%)	NS

Results expressed as mean percentage of cells ± one standard deviation and range between brackets. NS, no statistical significance.

fluorescence in situ hybridization (iFISH) studies were systematically performed on each BM sample, as previously reported, (25) with the following chromosome probes (all purchased from Vysis, Downers Grove, IL) for the detection of the most frequent recurrent abnormalities in patients with MDS: (1) LSI D5S23, D5S71 Spectrum Green (SG)/LSI EGFR Spectrum Orange (SO) probe combination for chromosome 5; (2) LSI D7S486 (7q31) SO/CEP 7 SG probes for chromosome 7; (3) CEP 8 (D8Z2) SO/CEP Y (DYZ1) SG probes for chromosomes 8 and Y, respectively; and (4) LSI D20S108 (20q12) SO probe for chromosome 20. Because the iFISH-searched chromosomal alterations are only present in between 35 and 50% of all MDS cases, investigation of the pattern of inactivation of a chromosome X (HUMARA assay) was analyzed in parallel in FACS-purified BM cell populations (FACSARIA, BDB) (purity ≥ 97%) from female individuals, including maturing neutrophils, monocytic cells, NRBC, CD34⁺ HPC, and mature lymphocytes (identified as described earlier) as described elsewhere (26). Detection of clonality through the HUMARA test is based on the pattern of inactivation of chromosome X in cells from individuals having two X chromosomes.

Statistical Methods

For all variables under study, their mean values and standard deviation, median, and range were calculated using the SPSS software (SPSS 10.0, Chicago, IL). For continuous variables, the Student's *t* test (parametric data) and either the Mann-Whitney *U* or the Kruskal-Wallis tests (nonparametric data) were used in order to investigate the statistical significance of the differences observed among two or more groups, respectively. *P* values < 0.05 were considered to be associated with statistical significance.

RESULTS

An overall similar distribution of the different compartments of cells investigated was found in normal versus reactive BM samples ($P \geq 0.05$, Table 1). Despite this, detailed analysis of maturing neutrophils showed a significant increase of more immature CD13^{lo/int}/CD11b⁺ cells (the phenotypic counterpart of myelocytes and metamyelocytes) in reactive versus normal BM ($P = 0.004$) (Table 1). In turn, a similar ($P > 0.05$) overall PI was also found in normal (7% ± 3.6%) versus reactive BM (7.4% ± 3.6%). In addition, no significant differences were found between both groups of BM samples as regards the percentage of *S* + *G*₂ - *M* phase cells among the different BM cell compartments investigated, except for the nonlymphoid CD34⁺ HPC and monocytic cells, which displayed significantly lower percentage of *S* + *G*₂ - *M* cells in reactive ($P = 0.02$) and normal ($P \leq 0.03$) BM samples, respectively. Noteworthy, NRBC precursors (PI of 28.6% ± 5% vs. 27% ± 6%; $P > 0.05$) followed by the nonlymphoid CD34⁺ HPC (17% ± 5% vs. 14% ± 5%; $P < 0.03$) displayed significantly higher ($P < 0.001$) percentages of *S* + *G*₂ - *M* cells versus all other BM cell compartments (Table 2) in

Table 2
Proliferation Index (Percentage of S + G₂/M Cells) of Different Cell Compartments in Normal (n = 47) versus Reactive (n = 47) Bone Marrow (BM)

	Proliferation index of BM cell populations (%)				P-value
	Normal BM (N = 47)		Reactive BM (N = 47)		
	% of specific cell subsets	% of all BM cells	% of specific cell subsets	% of all BM cells	
Whole BM	—	7% ± 3.5% (1–17%)	—	7.4% ± 3.5% (2.5–17.5%)	NS
CD34 ⁺ HPC	—	0.2% ± 0.3% (0.01–2%)	—	0.1% ± 0.06% (0.01–0.3%)	<0.03
Nonlymphoid CD34 ⁺ precursors	17% ± 4% (9–28%)	3% ± 1.5% (0.3–7%)	14% ± 5% (5.6–27%)	0.1% ± 0.06% (0.01–0.3%)	NS
Maturing neutrophils	5% ± 2.5% (0.5–11%)	0.1% ± 0.1% (0.01–0.6%)	6% ± 3% (2–12)	3.4% ± 1.6% (1.5–9.5)	NS
Monocytic cells	4.6% ± 4.5% (0.1–21%)	4% ± 2.5% (0.3–9%)	6% ± 3.6% (0.15–15%)	0.3% ± 0.2% (0.02–1%)	0.03
Nucleated red blood cell precursors	28.5% ± 5% (16–37%)	0.2% ± 0.5% (0.0–1.8%)	27% ± 6% (11–45%)	4% ± 3% (0.1–14%)	NS
Eosinophils	4% ± 4% (0.0–13%)	0.0 ± 0.0%	5% ± 3% (0.0–9%)	0.1% ± 0.08% (0.0–0.3%)	NS
Mature lymphocytes	0.0 ± 0.0%	0.0 ± 0.0%	0.0 ± 0.0%	0.0 ± 0.0%	—

Results expressed as mean percentage of S + G₂/M cells ± one standard deviation and range between brackets. NS, no statistical significance.

both normal and reactive BM, respectively. Conversely, intermediate PI was found for the overall population of maturing neutrophils (5% ± 2.5% vs. 6% ± 3%; $P > 0.05$), monocytic cells (4.6% ± 4.5% vs. 6% ± 3%; $P = 0.03$), and eosinophils (4% ± 4% vs. 5% ± 3%; $P > 0.05$) in normal versus reactive BM, respectively; by contrast, mature lymphocytes systematically corresponded to resting cells and showed no S + G₂ - M cells (PI = 0.0% ± 0.0%; $P > 0.05$; Table 2).

Detailed analysis of the different maturation-associated compartments of neutrophil lineage cells, defined by the pattern of expression of CD11b and CD13 (Fig. 2) (27), revealed that CD13^{hi}/CD11b⁻ (e.g., mainly corresponding to myeloblasts) and CD13^{lo/int}/CD11b⁻ (e.g., promyelocytes) precursors were those neutrophil-lineage subsets with the highest PI in both normal (22% ± 5% and 21% ± 5%, respectively; $P > 0.05$) and reactive BM (20% ± 6% and 21% ± 5%, respectively; $P > 0.05$) (Table 3). Conversely, the more mature compartments of CD13^{lo/int}/CD11b⁺ myelocytes and metamyelocytes and CD13^{hi}/CD11b⁺ bands/mature neutrophils showed significantly lower ($P < 0.001$) percentages of S + G₂ - M cells in both groups of BM samples (Table 3). Interestingly, however, the more mature bands/neutrophils (CD13^{hi}/CD11b⁺ cells) displayed a greater PI ($P = 0.03$) in reactive (0.9% ± 0.8%) versus normal (0.6% ± 0.5%) BM, in association with increased overall proportion of CD13^{lo/int}/CD11b⁺ cells (Tables 1 and 3).

DISCUSSION

Assessment of the distribution of hematopoietic cells within a specific cell subset along the G₀/G₁ versus S plus G₂/M cell-cycle phases provides relevant information to monitor growth of normal and leukemic cells (20). Previous studies have shown that the PI of tumor cells is of prognostic value in patients with acute lymphoblastic leukemia, multiple myeloma, B-cell chronic lymphoproliferative disorders, and AML (16,17,28–30). Despite this, a comparison of the PI of distinct BM cell populations in normal versus reactive BM has not been previously reported.

In the present work, we used DRAQ5 to analyze the PI of different BM hematopoietic cell compartments in a relatively large series of normal versus cytopenia-associated reactive BM, as a frame of reference for the definition of altered PI in MDS patients. To discard or include subjects in the reactive BM cohort, we assessed the methylation patterns of the androgen-receptor gene (HUMARA), which has been widely used to determine clonality of cell populations in different types of neoplastic cells (31). Overall, our results confirm and expand on previous observations, (17) which show that among the different compartments of normal BM cells, NRBC, and CD34⁺ HPC are those cell populations containing the highest number of proliferating cells, while normal mature lymphocytes are typically resting, nondividing cells (17). Interestingly, very similar results were obtained in our and other reports although a slight deviation of PI values in some normal BM cell compartments

Table 3
 Mean Proliferation Index (S + G₂/M cells) of Different Maturation-Associated Compartments of Neutrophil Lineage Cells in Normal (n = 47) versus Reactive (n = 47) Bone Marrow (BM)

	Proliferation index of maturation-associated neutrophil cell populations											
	CD13 ^{hi} /CD11b ⁻ cells			CD13 ^{lo/mt} /CD11b ⁻ cells			CD13 ^{lo/mt} /CD11b ⁺ cells			CD13 ^{hi} /CD11b ⁺ cells		
	% of specific cell subsets	% of all BM cells	% of BM neutrophils	% of specific cell subsets	% of all BM cells	% of BM neutrophils	% of specific cell subsets	% of all BM cells	% of BM neutrophils	% of specific cell subsets	% of all BM cells	% of BM neutrophils
Normal BM (N = 47)	22 ± 5 (13-35)	0.2% ± 0.1% (0.03-0.6%)	0.4 ± 0.3 (0.04-1.5)	21 ± 5 (12-31)	1.6% ± 1% (0.2-4%)	3 ± 1.6 (0.3-7)	4 ± 2 (1-8)	0.8% ± 0.5% (0.1-2%)	1.4 ± 1 (0.2-4)	0.6 ± 0.5 (0.1-2)	0.1% ± 0.1% (0.04-0.5%)	0.2 ± 0.2 (0.07-0.8)
Reactive BM (N = 47)	20 ± 6 (4-37)	0.2% ± 0.1% (0.05-0.6%)	0.4 ± 0.3 (0.07-1.4)	21 ± 5 (12-36)	1.9% ± 0.8% (0.5-4%)	3 ± 1.5 (0.8-6)	4 ± 2 (1.5-12)	1% ± 1% (0.3-6%)	1.6 ± 1 (0.3-5)	0.9 ± 0.8 (0.2-4)	0.2% ± 0.1% (0.05-0.5%)	0.4 ± 0.2 (0.1-0.9)
P-value	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.03	0.05	0.03

Results expressed as mean percentage of S + G₂/M-phase cells ± one standard deviation (SD) and range between brackets. NS, no statistical significance.

was observed with respect to those reported by Primo et al. (17), which might derive from the low number of cases analyzed in this latter study. In addition, we extend on previous observations by showing similar PI profiles in normal versus cytopenia-associated reactive BM. Noteworthy, monocytic cells and maturing neutrophils showed intermediate PI in both normal and reactive BM but with higher PI among monocytic cells from reactive versus normal BM. Moreover, despite the overall similar PI of maturing neutrophils in normal versus reactive BM, a more detailed analysis of the different maturation-associated compartments of BM neutrophils also shows a greater PI for the more mature cell compartments. Altogether, our results suggest that a slight shift of proliferation from the early precursors to the more mature granulomonocytic compartment occurs in reactive BM, which could reflect an attempt of the hematopoietic system to rapidly produce functional neutrophils and monocytes, at the expense of a lower expansion of the minor compartments of CD34⁺ HPC. Similarly, such attempt for myeloid expansion has been recently reported by our group to be frequently observed in low-risk MDS in which production of neutrophil lineage cells is essential to counteract the peripheral cytopenias (18,19).

In summary, these results show that in reactive BM, the proliferative index of most BM cell lineages remains unaltered when compared with normal BM, except for a slightly increased PI among monocytic cells and the more mature neutrophil precursors, at the expense of a lower proliferative activity of CD34⁺ HPC. Therefore, an altered PI of specific BM cell populations with respect to those values here reported might contribute (in combination with other phenotypic alterations) to a better diagnostic characterization and classification of clonal myeloid disorders (e.g., MDS) versus reactive BM. Further studies focused on the PI of BM cells from subjects with clonal hematological malignancies at different stages of the disease are necessary to determine the potential utility of cell-cycle studies in the diagnostic and prognostic evaluation of these diseases.

LITERATURE CITED

1. Nurse P. A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* 2000;100:71-78.
2. Doree M, Hunt T. From Cdc2 to Cdk1: When did the cell cycle kinase join its cyclin partner? *J Cell Sci* 2002;115:2461-2464.
3. Murray AW. Recycling the cell cycle: Cyclins revisited. *Cell* 2004;116:221-234.
4. Bloom J, Cross FR. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:149-160.
5. Budirahardja Y, Gonczy P. Coupling the cell cycle to development. *Development* 2009;136:2861-2872.
6. Stanger BZ. Organ size determination and the limits of regulation. *Cell Cycle* 2008;7:318-324.
7. von Wangenheim KH, Peterson HP. The role of cell differentiation in controlling cell multiplication and cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008;134:725-741.
8. Maddika S, Ande SR, Panigrahi S, Paranjothy T, Weglarczyk K, Zuse A, Eshraghi M, Manda KD, Wiechec E, Los M. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: Implications for cancer therapy. *Drug Resist Updat* 2007;10:13-29.
9. Dor Y, Melton DA. How important are adult stem cells for tissue maintenance? *Cell Cycle* 2004;3:1104-1106.

10. van Heemst D, den Reijer PM, Westendorp RG. Ageing or cancer: A review on the role of caretakers and gatekeepers. *Eur J Cancer* 2007;43:2144-2152.
11. Wells AD. Cyclin-dependent kinases: Molecular switches controlling anergy and potential therapeutic targets for tolerance. *Semin Immunol* 2007;19:173-179.
12. Montecucco C, Riccardi A, Traversi E, Giordano P, Mazzini G, Ascoli E. Proliferative activity of bone marrow cells in primary dysmyelopoietic (preleukemic) syndromes. *Cancer* 1983;52:1190-1195.
13. Montecucco C, Riccardi A, Traversi E, Danova M, Ucci G, Mazzini G, Giordano P. Flow cytometric DNA content in myelodysplastic syndromes. *Cytometry* 1983;4:238-243.
14. Peters SW, Clark RE, Hoy TG, Jacobs A. DNA content and cell cycle analysis of bone marrow cells in myelodysplastic syndromes (MDS). *Br J Haematol* 1986;62:239-245.
15. Vidriales MB, Orfao A, Lopez-Berges MC, Gonzalez M, Lopez-Macedo A, Ciudad J, Lopez A, Garcia MA, Hernandez J, Borrego D, et al. Prognostic value of S-phase cells in AML patients. *Br J Haematol* 1995;89:342-348.
16. San Miguel JF, Garcia-Sanz R, Gonzalez M, Moro MJ, Hernandez JM, Ortega F, Borrego D, Carnero M, Casanova F, Jimenez R, et al. A new staging system for multiple myeloma based on the number of S-phase plasma cells. *Blood* 1995;85:448-455.
17. Primo D, Flores J, Quijano S, Sanchez ML, Sarasquete ME, del Pino-Montes J, Gaarder PL, Gonzalez M, Orfao A. Impact of BCR/ABL gene expression on the proliferative rate of different subpopulations of haematopoietic cells in chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2006;135:43-51.
18. Matarras S, Lopez A, Barrena S, Fernandez C, Jensen E, Flores J, Barcena P, Rasillo A, Sayagues JM, Sanchez ML, et al. The immunophenotype of different immature, myeloid and B-cell lineage-committed CD34+ hematopoietic cells allows discrimination between normal/reactive and myelodysplastic syndrome precursors. *Leukemia* 2008;22:1175-1183.
19. Matarras S, Lopez A, Barrena S, Fernandez C, Jensen E, Flores-Montero J, Rasillo A, Sayagues JM, Sanchez ML, Barcena P, et al. Bone marrow cells from myelodysplastic syndromes show altered immunophenotypic profiles that may contribute to the diagnosis and prognostic stratification of the disease: A pilot study on A series of 56 patients. *Cytometry Part B: Clin Cytometry* 2010;78B:154-168.
20. Swerts K, Van Roy N, Benoit Y, Laureys G, Philippe J. DRAQ5: Improved flow cytometric DNA content analysis and minimal residual disease detection in childhood malignancies. *Clin Chim Acta* 2007;379:154-157.
21. Yuan CM, Douglas-Nikitin VK, Ahrens KP, Luchetta GR, Braylan RC, Yang L. DRAQ5-based DNA content analysis of hematolymphoid cell subpopulations discriminated by surface antigens and light scatter properties. *Cytometry Part B: Clin Cytometry* 2004;58B:47-52.
22. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. *J Hematother* 1996;5:213-226.
23. Alimena G, Billstrom R, Casalone R, Gallo E, Mitelman F, Pasquali F. Cytogenetic pattern in leukemic cells of patients with constitutional chromosome anomalies. *Cancer Genet Cytogenet* 1985;16:207-218.
24. Mitelman F, editor. *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Basel, Switzerland: Karger; 1995.
25. Ketterling RP, Wyatt WA, VanWier SA, Law M, Hodnefield JM, Hanson CA, Dewald GW. Primary myelodysplastic syndrome with normal cytogenetics: Utility of 'FISH panel testing' and M-FISH. *Leuk Res* 2002;26:235-240.
26. Teodosio CG-MA, Acevedo MJ, Muñoz LS, Ivan A-T, Nuñez R, Schwartzt LB, Walls AF, Escribano L, Orfao A. Mast cells from different molecular and prognostic subtypes of systemic mastocytosis display distinct immunophenotypes. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:719-726. doi:10.1016/j.jaci.2010.07.014.
27. van Lochem EG, van der Velden VH, Wind HK, te Marvelde JG, Westerdaal NA, van Dongen JJ. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: Reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry Part B: Clin Cytometry* 2004;60B:1-13.
28. Pui CH, Crist WM, Look AT. Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1990;76:1449-1463.
29. Quijano S, Lopez A, Rasillo A, Barrena S, Luz Sanchez M, Flores J, Fernandez C, Sayagues JM, Osuna CS, Fernandez N, et al. Association between the proliferative rate of neoplastic B cells, their maturation stage, and underlying cytogenetic abnormalities in B-cell chronic lymphoproliferative disorders: Analysis of a series of 432 patients. *Blood* 2008;111:5130-5141.
30. Orfao A, Ciudad J, Gonzalez M, San Miguel JF, Garcia AR, Lopez-Berges MC, Ramos F, Del Canizo MC, Rios A, Sanz M, et al. Prognostic value of S-phase white blood cell count in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1992;6:47-51.
31. Rabkin CS, Janz S, Lash A, Coleman AE, Musaba E, Liotta L, Biggar RJ, Zhuang Z. Monoclonal origin of multicentric Kaposi's sarcoma lesions. *N Engl J Med* 1997;336:988-993.

ARTÍCULO 2:

“El índice de proliferación de algunos compartimientos celulares de médula ósea de pacientes con síndrome mielodisplásico se asocia con el subtipo diagnóstico y la evolución de la enfermedad.”

Objetivos. Los SMD constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades clonales de la célula *stem* hematopoyética, caracterizados por la presencia de displasia morfológica y citopenias periféricas, a pesar de que con frecuencia se observa una celularidad medular incrementada. Estos hallazgos reflejan una hematopoyesis ineficaz asociada a un incremento de la apoptosis intramedular y a distintos bloqueos madurativos. Pese a que la capacidad de diferenciación celular está íntimamente relacionada con la capacidad de proliferación, los estudios en los que se investiga la posible existencia de alteraciones en el índice de proliferación celular de los distintos compartimientos hematopoyéticos de MO de pacientes con SMD, y su posible relevancia en el desarrollo y evolución de la enfermedad, siguen siendo relativamente limitados. En este trabajo analizamos la posible existencia de alteraciones en la tasa proliferativa de distintas poblaciones celulares hematopoyéticas de MO de pacientes con SMD y LMA, respecto a los mismos compartimientos celulares de MO normal y reactiva, empleando citometría de flujo.

Materiales y métodos. En conjunto analizamos 106 muestras de MO de pacientes con SMD y 30 pacientes con LMA, que fueron comparadas con un grupo control de 94 muestras de MO normal y reactiva (sin evidencia de clonalidad por FISH y/o HUMARA). El estudio del ciclo celular se realizó mediante citometría de flujo sobre precursores CD34⁺, precursores de línea de granulocito neutrófilo, eosinófilo, basófilo y monocito y células nucleadas de línea eritroide. En todos los casos, para cada una de estas poblaciones celulares se analizó su índice de proliferación mediante el uso combinado del fluorocromo DRAQ5 (para el análisis de su distribución a lo largo de las distintas fases del ciclo celular), y de marcadores fenotípicos concretos para la identificación específica de cada una de las poblaciones celulares hematopoyéticas anteriormente mencionadas.

Resultados. Nuestros resultados mostraron la existencia de un incremento global del índice de proliferación de las células hematopoyéticas de médula ósea de pacientes con SMD, con respecto a MO normal/reactiva. Además, el índice de proliferación celular de MO de pacientes con SMD de bajo riesgo

difería significativamente del observado entre los SMD de alto riesgo. Así, los SMD de bajo riesgo mostraron un aumento del índice proliferativo de los precursores CD34⁺ no linfoides y de los precursores de las líneas de granulocito neutrófilo y eritroide. Por el contrario, los SMD de alto riesgo y las LMA mostraron índices de proliferación progresivamente menores para estas poblaciones celulares, inferiores incluso a los observados en MO normal/reactiva. Merece destacar que el descenso de la proliferación celular por debajo de niveles normales entre los precursores CD34⁺ no linfoides y/o los precursores de línea eritroide, se asoció a características adversas de la enfermedad, una supervivencia global significativamente más corta y un mayor riesgo de transformación a leucemia aguda, tanto cuando consideramos la serie global de pacientes con SMD, como al analizar de forma separada los SMD de bajo riesgo y los SMD de alto riesgo. Finalmente, cabe señalar que, en la serie de pacientes analizados, el índice de proliferación de la línea eritroide constituía el factor pronóstico independiente con mayor valor predictivo en cuanto a la supervivencia global de los pacientes con SMD, y a su riesgo de transformación a leucemia aguda.

Conclusiones. Nuestros hallazgos sugieren que el estudio del índice de proliferación celular de la línea eritroide (y potencialmente también el de otros compartimientos celulares de médula ósea como los precursores hematopoyéticos CD34⁺) podría contribuir a una mejor estratificación pronóstica de los SMD.

The Proliferation Index of Specific Bone Marrow Cell Compartments from Myelodysplastic Syndromes Is Associated with the Diagnostic and Patient Outcome

Sergio Matarraz¹, Cristina Teodosio¹, Carlos Fernandez¹, Manuel Albors², María Jara-Acevedo¹, Antonio López¹, María Gonzalez-Gonzalez¹, María Laura Gutierrez¹, Juan Flores-Montero¹, Carlos Cervero³, Marlies Pizarro-Perea⁴, María Paz Garrastazu⁵, Gonzalo Caballero⁶, Oliver Gutierrez⁷, Guy Daniel Mendez⁸, Manuel González-Silva⁹, Paula Laranjeira¹, Alberto Orfao^{1*}

1 Centro de Investigación del Cáncer (Instituto de Biología Celular y Molecular del Cáncer, CSIC-USAL), IBSAL, Servicio de Citometría and Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain, **2** Servicio de Hematología, Hospital Juan Canalejo, La Coruña, Spain, **3** Servicio de Hematología, Hospital Virgen de la Luz, Cuenca, Spain, **4** Servicio de Hematología, Hospital Lucus Augusti, Lugo, Spain, **5** Servicio de Hematología, Hospital Punta de Europa, Algeciras, Spain, **6** Servicio de Hematología, Hospital San Jorge, Huesca, Spain, **7** Servicio de Hematología, Hospital Rio Hortega, Valladolid, Spain, **8** Servicio de Hematología, Hospital de Jerez de la Frontera, Cádiz, Spain, **9** Servicio de Hematología, Hospital La Línea, Cádiz, Spain

Abstract

Myelodysplastic syndromes (MDS) are clonal stem cell disorders which frequently show a hypercellular dysplastic bone marrow (BM) associated with inefficient hematopoiesis and peripheral cytopenias due to increased apoptosis and maturation blockades. Currently, little is known about the role of cell proliferation in compensating for the BM failure syndrome and in determining patient outcome. Here, we analyzed the proliferation index (PI) of different compartments of BM hematopoietic cells in 106 MDS patients compared to both normal/reactive BM (n = 94) and acute myeloid leukemia (AML; n = 30 cases) using multiparameter flow cytometry. Our results show abnormally increased overall BM proliferation profiles in MDS which significantly differ between early/low-risk and advanced/high-risk cases. Early/low-risk patients showed increased proliferation of non-lymphoid CD34⁺ precursors, maturing neutrophils and nucleated red blood cells (NRBC), while the PI of these compartments of BM precursors progressively fell below normal values towards AML levels in advanced/high-risk MDS. Decreased proliferation of non-lymphoid CD34⁺ and NRBC precursors was significantly associated with adverse disease features, shorter overall survival (OS) and transformation to AML, both in the whole series and when low- and high-risk MDS patients were separately considered, the PI of NRBC emerging as the most powerful independent predictor for OS and progression to AML. In conclusion, assessment of the PI of NRBC, and potentially also of other compartments of BM precursors (e.g.: myeloid CD34⁺ HPC), could significantly contribute to a better management of MDS.

Citation: Matarraz S, Teodosio C, Fernandez C, Albors M, Jara-Acevedo M, et al. (2012) The Proliferation Index of Specific Bone Marrow Cell Compartments from Myelodysplastic Syndromes Is Associated with the Diagnostic and Patient Outcome. PLoS ONE 7(8): e44321. doi:10.1371/journal.pone.0044321

Editor: Alfons Navarro, University of Barcelona, Spain

Received: May 30, 2012; **Accepted:** August 1, 2012; **Published:** August 31, 2012

Copyright: © 2012 Matarraz et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work has been partially supported by the following grants: RTICC RD06/0020/0035 - Fondo Europeo de Desarrollo Regional FEDER) - from the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, Madrid, Spain; M.J.-A. was supported by a grant from the Programa Personal Técnico de Apoyo a la Investigación. Ministerio de Ciencia e Innovación - Universidad de Salamanca, Spain. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: orfao@usal.es

Introduction

Myelodysplastic syndromes (MDS) are heterogeneous clonal stem cell disorders characterized by dysplastic hematopoiesis leading to bone marrow (BM) failure and an increased risk of transformation into acute myeloid leukemia (AML). Typically, the disease is associated with impaired maturation and defective production of myeloid cells, which translates into dysplastic features, cytopenias and a remarkable negative impact on patient survival [1]. Current prognostic stratification of MDS is mainly based on the percentage of BM blast cells, the number of cytopenias and cytogenetics [2], together with hemoglobin levels and/or other more dynamic variables (e.g.: transfusion dependency) [1,3]. However, currently used prognostic models based on these variables remain relatively limited, particularly for predicting

the outcome of low risk MDS. Consequently, the search for additional prognostic factors allowing for more precise prognostic stratification and treatment selection of these patients remains a challenge. Other parameters such as a poor performance status together with an older age, leukocytosis, increased LDH serum levels and the number and severity of comorbidities [4,5] have also been associated with a poor outcome in low-risk MDS, but their contribution to the prognostic models proposed so far still shows important limitations, as discussed elsewhere [6,7].

The proliferation index (PI) of specific compartments of BM cells is a dynamic parameter that reflects the ongoing rate of production of hematopoietic cells in MDS, which can be easily assessed at any time during the course of the disease [8]. In addition, the PI is also directly related to the maturation-associated alterations of distinct subtypes of hematopoietic cells in individual

patients [8]. In this regard, early studies already showed epigenetic repression of specific genes involved in the cell cycle and decreased numbers of S-phase cells in association with BM failure among advanced MDS and AML patients [9,10,11,12,13,14], suggesting that assessment of the PI of BM cells in MDS may be of potential relevance for prognostic stratification and monitoring of the disease [15]. Despite this, information currently available about the PI of BM cells in MDS remains very limited and controversial, preliminary data in the literature suggesting that disease progression could be associated with both proliferation arrest and enhanced expansion of clonal cells [9,14,16,17,18]. However, careful analysis of these studies shows that many of them have focused on the assessment of the proliferation rate of the overall BM cellularity, which largely depends on the relative composition of the sample in distinct cell compartments; moreover, these studies are restricted to the analysis of a few BM cell compartments in relatively small and unstratified cohorts of MDS patients, without investigating its potential impact on the outcome of the disease [9,11,19].

In this study, we analyzed for the first time the cell cycle distribution of different compartments of BM hematopoietic cells – e.g.: CD34⁺ hematopoietic progenitor and precursor cells, maturing neutrophils and monocytic cells, mature lymphocytes, eosinophils and nucleated red blood cell precursors (NRBC)- in a relatively large cohort of 230 BM samples including 106 MDS patients, 30 AML and 94 normal/reactive BM samples. Overall, our results show altered BM proliferation profiles in MDS, which significantly differ in early/low-risk *vs.* advanced/high-risk subtypes of the disease: increased proliferation of myeloid CD34⁺ precursors, maturing neutrophils and NRBC in early phases of the disease, and progressively decreased PI in advanced MDS and AML. Noteworthy, a higher PI of non-lymphoid CD34⁺ cells and NRBC were both associated with a significantly longer overall survival (OS) and decreased risk of AML transformation, even among patients within the low and intermediate-1 IPSS risk categories, the PI of NRBC emerging as the most powerful prognostic factor for both OS and progression-free survival in

MDS, independently of the haemoglobin levels and other classical prognostic variables.

Materials and Methods

Bone Marrow Samples

A total of 136 untreated patients (78 men and 58 women; mean age of 73 years, ranging from 38 to 87 years) with newly diagnosed MDS (n = 106) and AML not otherwise specified (NOS; n = 30), were included in the present study. According to the World Health Organization (WHO) criteria [20], MDS patients were classified as follows: RA, 7 patients; RA with ringed sideroblasts (-RS), 3; RCMD, 31; RCMD-RS, 7; RAEB-1, 20; RAEB-2, 30; myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms (MD/MPN), 8 cases. According to the International Prognostic Scoring System (IPSS) [2], 25% of cases were classified as low-risk MDS, 41% as intermediate-1, 18% as intermediate-2 and 16% as high-risk MDS. Distribution of AML NOS cases, according to the WHO 2008 was as follows: AML with minimal differentiation, 3 patients; AML without maturation, 4; AML with maturation, 8; AML with myelodysplasia-related changes, 6; AML with myelomonocytic/monocytic maturation, 5. The other 4 cases were classified as mixed phenotype AL (T/myeloid, NOS). For multiparameter flow cytometry immunophenotypic studies, EDTA-anticoagulated BM samples were obtained at diagnosis from all MDS and AML cases. Moreover, an additional validation cohort of 11 MDS patients was analyzed both at diagnosis and at the last follow-up BM (mean follow-up time of 11±9 months; range: 4 to 36 months). Five of these 11 patients (RCMD, 3; RAEB-1, 1; RAEB-2, 1) had the same WHO diagnostic subtype at diagnosis and follow-up, while 4 (RCMD, 2; RAEB-1, 1; RAEB-2, 1) presented with more advanced disease than at diagnosis (AML, RAEB-1, AML and AML respectively). The remaining two patients (RCMD, 1; RAEB-1, 1) were studied both at diagnosis and after treatment when they had achieved morphological and cytogenetic remission at the time of follow-up.

In parallel, 94 freshly obtained EDTA-anticoagulated normal (n = 47) and reactive (n = 47) BM samples from an identical

Table 1. Proliferation index (percentage of S+G₂M cells) of different BM cell compartments in MDS *vs.* both AML and normal/reactive BM.

BM cell compartment	Proliferation index of BM cell populations					
	Normal/reactive BM (N = 94)	P-value [†]	MDS (N = 106)	P-value [‡]	AML (N = 30)	P-value [*]
Whole BM	7% (1–17.5%)	<0.001	9% (2–27%)	0.008	7% (0.3–17%)	NS
Non-lymphoid CD34⁺ precursors	15% (6–28%)	0.05	13% (0.6–36%)	<0.001	6% (0.07–19%)	<0.001
Maturing neutrophils	5% (0.5–12%)	<0.001	7% (2–26%)	NS	7% (0.3–17%)	0.02
CD13 ^{hi} /CD11b ⁻ cells	21% (4–37%)	0.01	19% (6–51%)	NS	17.5% (2–54%)	NS
CD13 ^{lo/int} /CD11b ⁻ cells	21% (12–36%)	NS	21% (5–46%)	NS	17% (3–41%)	NS
CD13 ^{lo/int} /CD11b ⁺ cells	4 (0.8–12%)	0.002	5% (1–23%)	NS	7% (1–43%)	0.001
CD13 ^{hi} /CD11b ⁺ cells	0.5% (0.1–4%)	<0.001	2% (0.3–12%)	0.007	2% (0.2–36%)	<0.001
Monocytic cells	4.5% (0.1–21%)	NS	4% (0–16%)	NS	7% (0–10%)	NS
Nucleated red blood cell precursors	28% (11–45%)	NS	26% (2–48%)	0.01	21% (2–37%)	<0.001
Eosinophils	4% (0–13%)	0.01	7% (0–21%)	NS	5.5% (1.5–16%)	NS

Results expressed as median percentage of S+G₂/M cells and range between brackets. AML, acute myeloid leukemia; MDS, myelodysplastic syndrome; BM, bone marrow; NS, statistically not significantly different;

[†], MDS *vs.* normal/reactive BM;

[‡], MDS *vs.* AML;

^{*}, AML *vs.* normal/reactive BM.

doi:10.1371/journal.pone.0044321.t001

Table 2. Proliferation index (percentage of S+G₂M cells) of different compartments of bone marrow (BM) cells in MDS patients grouped according to the World Health Organization (WHO) classification and the International Prognostic Scoring System (IPSS).

BM cell compartment	Proliferation index of BM cell populations					
	WHO Subtype (n = 106)					
	RA (N = 10)	RCMD (N = 38)	RAEB-1 (N = 20)	RAEB-2 (N = 30)	MD/MPN (N = 8)	P-value
Whole BM	13% ^{††} (6–27%)	9% ^{††} (2–21%)	9.5% ^{††} (3–22%)	8% (3–21%)	9.5% [†] (4–14%)	0.01
Non-lymphoid CD34⁺ precursors	21% ^{††} (8–36)	17% (3–28%)	13.5% (2–30%)	7% ^{††} (0.6–24%)	18% (4–26%)	<0.001
Maturing neutrophils	8% ^{††} (6–26%)	6% (2–13%)	7% ^{††} (2–18%)	7% ^{††} (2–17%)	9% ^{††} (4–11%)	0.001
CD13 ^{hi} /CD11b ⁻ cells	21% (19–51%)	19% (7–35%)	18% ^{††} (9–35%)	15% ^{††} (6–33%)	25% (15–30%)	0.001
CD13 ^{lo/int} /CD11b ⁻ cells	27% [†] (15–46%)	23% (5–35%)	21% (10–39%)	14.5% ^{††} (6.5–30%)	22% (10–29%)	0.003
CD13 ^{lo/int} /CD11b ⁺ cells	8% ^{††} (3–12%)	5% ^{††} (0.6–14%)	4% (2–14%)	3.5% (0.6–23%)	9% ^{††} (3–11%)	0.03
CD13 ^{hi} /CD11b ⁺ cells	1% ^{††} (0.4–12%)	1% ^{††} (0.3–7%)	2% ^{††} (0.3–12%)	2.5% ^{††} (0.3–7%)	2% ^{††} (1–3%)	<0.001
Monocytic cells	5% (1.4–9%)	5.5% (0–16%)	1% ^{††} (0–11%)	2.7% [†] (0–6%)	6% (2–13%)	0.05
Nucleated red blood cell precursors	31% (24–48%)	28.5% (2–44%)	27% (12–42%)	18% ^{††} (4.5–42%)	29% (16–40%)	0.001
Eosinophils	3% (1–12%)	7% (0–21%)	5.5% (2–17%)	4% (0–14%)	4.5% (0–16%)	NS
BM cell compartment	IPSS category (n = 85)					
	Low risk (N = 21)	INT-1 (N = 35)	INT-2 (N = 15)	High risk (N = 14)	P-value	
Whole BM	9% ^{††} (5–27%)	8% (2–22.5%)	11% ^{††} (3.5–21%)	8% (3–12.5%)	0.007	
Non-lymphoid CD34⁺ precursors	22.5% ^{††} (4–36%)	13% (2–30%)	12% ^{††} (0.6–24%)	7% ^{††} (1–11%)	<0.001	
Maturing neutrophils	8% ^{††} (3–26%)	6% (2–14%)	6.5% [†] (2.5–18%)	7% ^{††} (3.5–12%)	0.005	
CD13 ^{hi} /CD11b ⁻ cells	25% (7–51%)	18% ^{††} (6–35%)	18% ^{††} (6–29%)	13% ^{††} (8–25%)	0.001	
CD13 ^{lo/int} /CD11b ⁻ cells	25% ^{††} (10–46%)	21% (5–39%)	17% ^{††} (7–27%)	15% (6.5–30%)	0.005	
CD13 ^{lo/int} /CD11b ⁺ cells	7% [†] (2–12%)	5% ^{††} (0.6–14%)	3.5% (1.5–15.5%)	4% (2–10%)	NS	
CD13 ^{hi} /CD11b ⁺ cells	1.5% ^{††} (0.3–12%)	1% ^{††} (0.3–7%)	2% ^{††} (0.3–12%)	3% ^{††} (0.3–7.5%)	<0.001	
Monocytic cells	5% (0–13%)	2% ^{††} (0–11%)	6% (1–16%)	3.5% (0–5%)	NS	
Nucleated red blood cell precursors	29% (16–48%)	28% (2–44%)	27% [†] (4.5–39%)	18% ^{††} (7–42%)	0.007	
Eosinophils	4.5% (1–12%)	6% (0–21%)	6% (0–14%)	4% (0–10%)	NS	

Results expressed as median percentage of S+G₂M cells and range between brackets. RA, refractory anemia; RCMD, refractory cytopenia with multilineage dysplasia; RAEB, RA with excess of blasts; MD/MPN, myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms; INT, intermediate risk; NS, statistically not significantly different.

[†], p<0.05 and ^{††}, p<0.03 vs. normal/reactive BM.

doi:10.1371/journal.pone.0044321.t002

number of individuals (46 men and 48 women; mean age of 67 years; range, 47 to 79 years) were collected at the University Hospital of Salamanca (Spain). Normal BM samples were obtained from healthy donors and individuals undergoing orthopedic surgery, while reactive samples corresponded to patients with carential and megaloblastic anemias and other toxic (e.g.: drug-induced) or reactive cytopenias, including infection-associated leukopenias. None of the reactive samples showed clonal hematopoiesis, based on the absence of cytogenetic abnormalities –e.g., trisomy 8, -7/7q⁻, -5/5q⁻, del(20q) or -Y- as assessed by fluorescence in situ hybridization (FISH) and/or a polyclonal pattern of inactivation of chromosome X in females, evaluated by the human androgen receptor assay (HUMARA) in FACS-purified (≥97% purity) maturing neutrophils, monocytic cells, NRBC, CD34⁺ hematopoietic progenitor and precursor cells (HPC) and mature lymphocytes.

All BM samples were systematically studied within the first 18 hours after they were drawn, after written informed consent was given by each subject according to the recommendations of the local Ethics Committee -Comisión de Bioética of Centro de

Investigación del Cáncer-IBMCC (USAL-CSIC)-, which approved the study, and to the principles expressed in the Declaration of Helsinki.

Cell Cycle Analyses

Analysis of the distribution of different compartments of BM cells along the G₀/G₁ and S plus G₂/M cell cycle phases (PI) was performed immediately after samples were obtained using triple-stainings for nuclear DNA and two cell surface markers. Briefly, whole BM samples –cell concentration adjusted with phosphate buffered saline containing 0.5% bovine serum albumin (PBS/BSA; pH = 7.4) to 10⁶ cells in 100 μL/tube- were incubated in two separate aliquots for 10 min in the dark at room temperature (RT) with saturating amounts of the following combinations of fluorescein isothiocyanate (FITC)-/phycoerythrin (PE)-conjugated monoclonal antibodies (MAB) purchased from Becton Dickinson Biosciences (BD, San Jose, CA, USA): CD45/CD34 and CD11b/CD13. In order to control for unspecific binding of antibodies mature lymphocytes and neutrophils were used as an internal reference. [21] After lysing non-NRBC, nucleated cells

Table 3. Proliferation index (percentage of S+G₂M cells) of different BM cell compartments in normal/reactive BM (n = 94) and MDS patients (n = 106) with normal/favourable (n = 83) versus intermediate/poor (n = 23) cytogenetics.

Bone marrow cell subsets	MDS		
	Normal/reactive bone marrow	Normal/favourable cytogenetics	Intermediate/poor cytogenetics
	(n = 94)	(n = 83)	(n = 23)
Whole BM	7% (1–17.5%)	9% ^{**} (2–27%)	9% ^{**} (3–22%)
Non-lymphoid CD34⁺ precursors	15% (6–28%)	14% (0.6–36%)	8% ^{***} (1–30%)
Maturing neutrophils	5% (0.5–12%)	7% ^{**} (2–26%)	6.5% ^{**} (3.5–18%)
CD13 ^{hi} /CD11b ⁻ cells	21% (4–37%)	19% [*] (6–51%)	18% ^{**} (7–50%)
CD13 ^{lo/int} /CD11b ⁻ cells	21% (12–36%)	22% (5–46%)	20% (6.5–41%)
CD13 ^{lo/int} /CD11b ⁺ cells	4% (0.8–12%)	5% ^{**} (0.6–16%)	4% (2–23%)
CD13 ^{hi} /CD11b ⁺ cells	0.5% (0.1–4%)	2% ^{**} (0.3–12%)	3% ^{***} (0.4–12%)
Monocytic cells	4.5% (0.1–21%)	3.5% (0–11%)	2.5% (0–16%)
Nucleated red blood cell precursors	28% (11–45%)	28% (2–48%)	22% ^{***} (4–39%)
Eosinophils	4% (0–13%)	6.5% ^{**} (0–21%)	5.5% (0–17%)
Mature lymphocytes	0.0±0.0%	0.0±0.0%	0.0±0.0%

Results expressed as median percentage of cells and range between brackets.

^{*}, p<0.05 and

^{**}, p<0.03 vs. normal/reactive BM; and;

^{***}, p<0.03 vs. normal/favourable karyotype. Normal/favourable cytogenetics includes cases with a normal karyotype, -Y, del(5q) or isolated del(7q); poor cytogenetics includes cases with complex (≥3 chromosomal abnormalities) karyotypes and alterations of chromosome 7, except isolated del(7q), and; intermediate cytogenetics: other karyotypic abnormalities.

doi:10.1371/journal.pone.0044321.t003

were washed and resuspended in 0.5 mL PBS/BSA. Then, 3 μl of DRAQ5TM (Vitro SA, Madrid, Spain) was added to each tube, another incubation performed for 10 min in the dark (RT) and the sample aliquots were immediately run in a FACSCanto IITM flow cytometer (BDB) using the FACSDiva software program (BD). For each sample aliquot, information about >1×10⁵ cells corresponding to the whole BM cellularity was measured and stored. For data analysis, the INFINICYTTM software program (Cytognos SL, Salamanca, Spain) was used. The overall percentage of proliferating cells, including those cells within the S plus G₂/M cell cycle phases (PI), was defined as those cells showing a brighter staining of DRAQ5 than those included in the G₀/G₁ peak, as described elsewhere [22,23].

In every sample, the following cell populations were identified after excluding dead cells and cell doublets in a sideward light scatter (SSC) versus DRAQ5-fluorescence area and a DRAQ5-fluorescence area versus DRAQ5-fluorescence width bivariate dot plot, respectively: total CD34⁺ HPC (CD45^{lo} CD34⁺ events), CD34⁺ non-lymphoid (e.g.: myeloid) HPC (SSC^{int} CD34⁺), CD34⁺ lymphoid HPC (SSC^{lo} CD34⁺ cells), nucleated red cell precursors (SSC^{lo/very-lo} CD45⁻ events), monocytic cells (SSC^{int} CD45^{int/hi} CD11b^{hi} CD13^{hi} cells), eosinophils (SSC^{hi} autofluorescent cells), mature lymphocytes (CD45^{hi} SSC^{lo}) and maturing neutrophils (CD45^{lo} SSC^{int/hi}); in addition, maturing neutrophils were further subdivided into four maturation-associated cell subsets, as previously described: [24] CD13^{hi} CD11b⁻, CD13^{lo/int} CD11b⁻, CD13^{lo/int} CD11b⁺ and CD13^{hi} CD11b⁺ neutrophil precursors. The specific immunophenotypic characteristics of mature lymphocytes were taken as a standard to define the relative position of the different compartments of BM precursors in a CD45 versus SSC bivariate dot plot. For each of the above listed cell populations, the distribution along the G₀/G₁ and S plus G₂/M cell cycle phases (proliferation index) was calculated, as described above.

Conventional Karyotyping, Fluorescence in situ Hybridization (FISH) and HUMARA Studies

Cytogenetic analysis of BM samples was performed according to standard procedures [25] and interpreted using the International System for Cytogenetic Nomenclature criteria [26]. In addition, multicolor interphase FISH (iFISH) [27] was systematically performed for the detection of the most frequent recurrent cytogenetic abnormalities in MDS, using the following chromosomal probes (all purchased from Vysis Inc, Downers Grove, IL, USA): 1) LSI D5S23, D5S71 Spectrum Green (SG)/LSI EGFR Spectrum Orange (SO) probe combination for chromosome 5; 2) LSI D7S486 (7q31) SO/CEP 7 SG probes for chromosome 7; 3) CEP 8 (D8Z2) SO/CEP Y (DYZ1) SG probes for chromosomes 8 and Y, respectively, and; 4) LSI D20S108 (20q12) SO probe for chromosome 20. Investigation of the pattern of inactivation of chromosome X was analyzed in FACS-purified (FACSARIA, BDB) (purity ≥97%) maturing neutrophils, monocytic cells, NRBC, CD34⁺ HPC and mature lymphocytes, as previously reported. [28].

Statistical Methods

For continuous variables, mean values and standard deviation (SD), median and range were calculated using the SPSS software (SPSS 10.0, Chicago, IL); for categorical variables, frequencies were used (SPSS software). Parametric vs. non-parametric data distribution was assessed by the Kolmogorov-Smirnov (K-S) test. For categorical and continuous variables, comparisons between two or more groups were made using the χ^2 , and either the Student T (for parametric data) or the Mann-Whitney U and the Kruskal-Wallis tests (for non-parametric data), respectively. Receiver operating characteristic (ROC) curves were applied for the definition of PI cut-off values for association with e.g. cytopenias and survival. Survival curves were plotted according to the method of Kaplan and Meier [29] and compared by the log-

Table 4. Relationship between the degree of proliferation of non-lymphoid CD34⁺ and nucleated red blood cells from patients with myelodysplastic syndromes (MDS) and other haematological and biochemical characteristics of the disease.

MDS patient subgroups	PI of non-lymphoid CD34 ⁺ precursors			PI of nucleated red blood cells		
	PI ≥10%	PI <10%	P-value	PI ≥24%	PI <24%	P-value
N. of cytopenias (≥2) (n = 84)	29/52 (56%)	27/32 (84%)	0.007	28/49 (57%)	28/35 (80%)	0.02
Anemia (<100 g haemoglobin/L) (n = 83)	28/52 (54%)	26/31 (84%)	0.006	26/49 (53%)	28/34 (82%)	0.006
Thrombocytopenia (<100×10⁹ platelets/L) (n = 84)	19/52 (36.5%)	22/32 (70%)	0.004	17/49 (35%)	24/35 (70%)	0.002
Leukopenia (<5×10⁹ leukocytes/L) (n = 84)	26/52 (50%)	18/32 (56%)	<i>NS</i>	26/49 (53%)	18/35 (51%)	<i>NS</i>
Increased LDH (>400 IU/L) (n = 72)	6/43 (14%)	13/29 (45%)	0.004	7/40 (18%)	12/32 (38%)	0.05
Neutropenia (<1.8×10⁹ neutrophils/L) (n = 64)	19/37 (52%)	18/27 (67%)	<i>NS</i>	17/35 (48.5%)	20/29 (70%)	<i>NS</i>
Transfusion dependency (n = 65)	16/40 (40%)	21/25 (84%)	<0.001	12/36 (33%)	25/29 (86%)	<0.001
Intermediate/poor cytogenetics (n = 98)	6/63 (10%)	16/35 (46%)	<0.001	9/60 (15%)	13/38 (34%)	0.02
Evolution to AL (n = 77)	6/48 (12%)	11/29 (38%)	0.009	5/46 (10%)	12/31 (40%)	0.004

Results expressed as number of cases from all MDS patients analyzed and percentage between brackets.

PI, proliferation index;

LDH, lactate dehydrogenase;

AL, acute leukemia;

NS, statistically not significantly different.

doi:10.1371/journal.pone.0044321.t004

rank test. Based on those variables showing a significant effect on overall survival in the univariate analysis, a multivariate Cox proportional-hazards model was constructed with those parameters showing independent predictive value; inclusion in the final model was determined by a backward stepwise approach. *P* values <0.05 were considered to be associated with statistical significance.

Results

Proliferation of Hematopoietic Cells in Normal/reactive BM

We have recently shown that similar PI are found in normal *vs.* reactive BM [8], as confirmed here (Table 1) for the overall BM cellularity and the distinct compartments of maturing hematopoietic cells, except for non-lymphoid (myeloid plus immature) CD34⁺ HPC (16±4% *vs.* 14±5%, *p* = 0.01) and monocytic cells (4.6±4.5% *vs.* 6±3.5%, *p* = 0.03). Therefore, from now on normal and reactive BM samples will be considered together (n = 94) for further evaluation of potential alterations in the PI of BM cells in MDS.

Overall Proliferation of Hematopoietic Cells in MDS *vs.* Normal/reactive and AML BM

Overall, significantly increased numbers of S+G₂ M phase cells (PI) were detected in whole BM of MDS patients *vs.* controls (median PI of 9% *vs.* 7%, *p* < 0.001). Such increased proliferation was due to increased PI of maturing neutrophils (*p* < 0.001) at the expense of the more mature CD11b⁺ granulocytes (*p* ≤ 0.002) (Table 1). By contrast, both non-lymphoid CD34⁺ HPC and the more immature CD13^{hi}/CD11b⁻ neutrophil precursors showed significantly lower PI in MDS *vs.* normal/reactive BM (*p* ≤ 0.05) (Table 1).

In turn, AML NOS cases showed an overall BM proliferation rate similar to normal/reactive BM, but significantly lower than that of MDS (PI of 7% *vs.* 9%, respectively; *p* = 0.008) (Table 1). In detail, AML showed a pronounced decrease of the PI of non-lymphoid CD34⁺ cells (*p* < 0.001) and NRBC (*p* ≤ 0.01) *vs.* both

normal/reactive BM and MDS. In turn, a marked increased proliferation was detected in AML patients among the CD13^{lo/int}/CD11b⁺ and CD13^{hi}/CD11b⁺ subsets of maturing neutrophils *vs.* normal/reactive BM (*p* ≤ 0.001), the latter subset also showing an increased PI *vs.* MDS (*p* = 0.007) (Table 1).

Proliferation of BM Cells in Different Diagnostic Subtypes of MDS

Despite the increased overall BM proliferation detected in MDS *vs.* both AML and normal/reactive BM, distinct proliferation profiles were observed for the different BM cell compartments among the diagnostic and prognostic subgroups of MDS (Table 2), except for RA and RCMD patients with *vs.* without ring sideroblasts; therefore, these two WHO subtypes of MDS were grouped together.

Overall, the highest BM PI was observed among RA and low-risk MDS patients (13% and 9% *vs.* 7%, *p* ≤ 0.006). Such increased proliferation was associated with a greater PI of non-lymphoid CD34⁺ precursors in both subgroups of early MDS patients (*p* ≤ 0.006). However, the PI of these precursors showed a trend to decline in high-risk MDS, reaching minimal proliferation values in RAEB-2, intermediate-2, high-risk IPSS MDS and AML patients (*p* ≤ 0.01 *vs.* normal BM, RA and low-risk MDS) (Table 2).

Similarly, despite a significantly enhanced proliferation of maturing BM neutrophils was found in all diagnostic categories of MDS but RCMD (*p* ≤ 0.01), as well as in AML (*p* ≤ 0.02), a more detailed analysis of the neutrophil maturation stages (Table 2), revealed again significantly different proliferation profiles in early *vs.* advanced MDS/AML, particularly among the more immature neutrophil precursors. Thus, all MDS diagnostic categories showed a significantly increased PI for the more mature CD13^{hi}/CD11b⁺ and/or CD13^{lo/int}/CD11b⁺ neutrophil subsets (*p* ≤ 0.04); by contrast, although a similarly increased (*p* ≤ 0.03) or stable PI was detected among immature CD11b⁻ neutrophil precursors from RA and low-risk IPSS MDS, decreased PI (*vs.* normal/reactive BM) were found for these cells (CD13^{hi}/CD11b⁻ myeloblasts) in RAEB-1 and both intermediate-1- and high-risk IPSS MDS (*p* ≤ 0.04) as well as (CD13^{hi}/

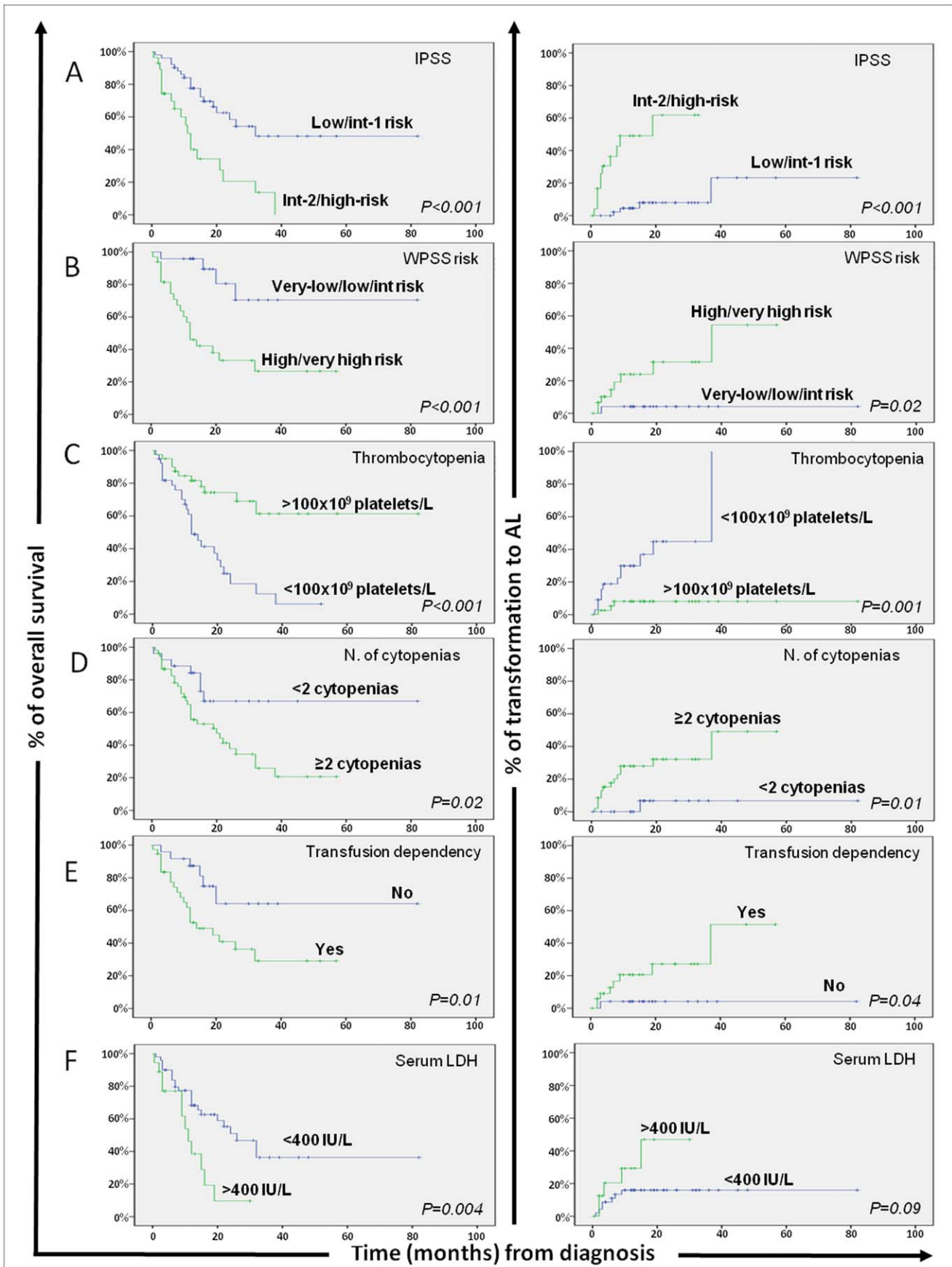


Figure 1. Impact of currently used prognostic classifications and other disease features on overall survival and risk of transformation to acute leukemia (AL) of patients with myelodysplastic syndromes (MDS; n = 106). Overall survival (left column) and progression-free survival (transformation to AL; right column) curves are plotted for patients with MDS grouped according to the International Prognostic Scoring System (IPSS; row A), the World Health Organization-based Scoring System (WPSS; row B), the number of peripheral blood platelets at diagnosis (row C), the presence of multiple cytopenias (row D), transfusion dependency (row E), and serum LDH levels (row F). doi:10.1371/journal.pone.0044321.g001

CD11b⁻ myeloblasts and CD13^{lo/int}/CD11b⁻ promyelocytes) in RAEB-2 and intermediate-2 IPSS MDS cases ($p \leq 0.02$). Of note, BM cells from MD/MPN patients showed proliferation patterns similar to those of early/low-risk MDS cases, while in AML they resembled those of advanced/high-risk MDS patients (Table 2).

In addition, altered proliferation patterns were also observed among BM NRBC from both MDS and AML patients: the PI of NRBC tended to increase in RA patients ($p > 0.05$ vs. normal/reactive BM) while it significantly declined in intermediate-2 ($p = 0.05$), RAEB-2 ($p < 0.001$), high-risk MDS ($p < 0.001$), and in AML ($p < 0.001$) (Tables 1 and 2). In turn, the cell cycle distribution of monocytic cells remained at normal/reactive levels in early MDS and AML, while abnormally lower PI were observed in RAEB-1, intermediate-1-risk and RAEB-2 patients ($p \leq 0.05$ vs. normal/reactive BM); conversely, a tendency towards increased monocytic proliferation was detected in MD/MPN ($p > 0.05$).

No significant differences were noted in the PI of other BM cell compartments analyzed (e.g.: B-cell committed CD34⁺ precursors) neither in MDS nor in AML; mature lymphocytes systematically corresponded to resting cells in all groups analyzed.

Although variable results were observed for individual cases, follow-up studies performed in a group of 11 MDS patients showed a tendency towards decreased PI of non-lymphoid CD34⁺ cells –from 5% (0–17%) to 0.9% (0–14%); $p = 0.06$ -, CD11b⁻ neutrophil precursors –from 30% (8–38%) to 16% (4–28%); $p = 0.02$ - and NRBC –from 28% (9–32%) to 19% (7–30%); $p = 0.05$ - vs. those found at diagnosis; such tendency was observed not only among cases which showed more advanced disease but also among cases which had the same WHO diagnosis after follow-up ($n = 5$, data not shown). The only exception corresponded to those two cases who achieved remission, in which the PI of the different compartments of BM cells returned to normal BM values: PI of non-lymphoid CD34⁺ cells, CD11b⁻ neutrophil precursors and NRBC of 6% (3–9%), 11.5% (8–15%) and 19% (13–25%) vs. 15% (14–16%), 32.5% (22–43%) and 27% (26–28%), respectively.

Cell Cycle Distribution of BM Cells in Different Cytogenetic Subgroups of MDS

MDS cases with normal/favourable karyotypes as well as cases with isolated del(7q) showed similar proliferation profiles consisting of an enhanced BM proliferation ($p = 0.007$) due to an increased PI of the more mature neutrophils ($p = 0.01$) in the absence of altered cell cycle profiles among non-lymphoid CD34⁺ and NRBC precursors (Table 3). Conversely, patients with intermediate/poor cytogenetics had decreased PI of non-lymphoid CD34⁺ and NRBC vs. both normal/reactive BM ($p \leq 0.002$) and MDS cases with normal/favourable cytogenetics ($p = 0.01$) (Table 3).

Relationship between the PI of BM Cell Compartments in MDS and other Features of the Disease

Upon grouping MDS patients according to the PI of BM cells (Table 4), a clear association was observed between a lower PI of non-lymphoid CD34⁺ precursors (PI: $< 10\%$ vs $\geq 10\%$) and other relevant features of the disease such as anemia ($p = 0.006$), thrombocytopenia ($p = 0.004$) and multiple (≥ 2) cytopenias ($p = 0.007$), transfusion dependency ($p < 0.001$), increased serum

LDH ($p = 0.004$), intermediate/poor cytogenetics ($p < 0.001$) and transformation to acute leukemia (AL) ($p = 0.009$). Likewise, low NRBC PI ($< 24\%$ vs $\geq 24\%$) were also associated with a greater frequency of ≥ 2 cytopenias ($p = 0.02$), anemia ($p = 0.006$), thrombocytopenia ($p = 0.002$), transfusion dependency ($p < 0.001$), increased LDH ($p = 0.05$), intermediate/poor karyotypes ($p = 0.02$) and transformation to AL ($p = 0.004$) (Table 4). Interestingly, a low PI ($< 12.5\%$ and $< 11.7\%$) of non-lymphoid CD34⁺ cells could predict with a great efficiency among MDS cases for the presence of anemia and thrombocytopenia, respectively (sensitivity of 63% and specificity of 80% in both cases; $p \leq 0.02$); likewise, a PI of NRBC $< 24.5\%$ also predicted for anemia with a high specificity (sensitivity of 49%, specificity of 80%; $p = 0.05$), while a low PI of CD13^{hi}/CD11b⁻ maturing neutrophils efficiently identified patients with neutropenia (sensitivity of 65%, specificity of 70%; $p = 0.03$).

Impact of Cell Proliferation on the Outcome of MDS

From the prognostic point of view, a significantly shorter median overall survival (OS) was observed among MDS cases which displayed lower percentages of proliferating non-lymphoid CD34⁺ precursors ($p = 0.005$) and NRBC ($p < 0.001$), thrombocytopenia ($p < 0.001$), ≥ 2 cytopenias ($p = 0.02$), increased serum LDH ($p = 0.004$), transfusion dependency ($p = 0.01$) and higher IPSS and WPSS scores ($p < 0.001$). In turn, a lower percentage of proliferating non-lymphoid CD34⁺ precursors ($p = 0.001$) and NRBC ($p < 0.001$), together with the presence of thrombocytopenia ($p = 0.001$), ≥ 2 cytopenias ($p = 0.01$), transfusion dependency ($p = 0.04$) and higher IPSS or WPSS scores ($p \leq 0.02$), were also associated with a greater risk of transformation to AL (Figure 1 and Table 5). Most interestingly, low- and intermediate-1 risk MDS patients with abnormally lower PI of non-lymphoid CD34⁺ precursors and NRBC showed a significantly lower median OS –16 vs 132 ($p = 0.03$) and 15 vs 132 months ($p = 0.001$), respectively– and a higher risk of transformation to AL –median of 37 vs 135 ($p = 0.005$) and of 37 vs 135 months ($p = 0.002$), respectively– (Figure 2). Meanwhile, intermediate-2 and high-risk MDS with low PI of NRBC displayed significantly shorter survival rates (median OS of 9 vs 22 months, respectively; $p = 0.03$) (Figure 2). Multivariate analysis of prognostic factors (Table 5) showed that the combination of the PI of NRBC –hazard ratio (HR) of 3.7; 95% CI of 2–7; $p = 0.005$) and thrombocytopenia (HR of 2.7; 95% CI of 1.3–6; $p = 0.008$), were the only two parameters showing independent predictive value for OS in MDS, while the PI of NRBC was the most informative independent predictor for transformation of MDS to AL both as categorical (HR of 12.3; 95% CI of 1.5–99.5; $p = 0.01$), and as a continuous variable ($p = 0.01$).

Discussion

Prediction of outcome in MDS by conventional prognostic stratification models remains only partially successful. This is mainly due to the heterogeneous clinical behaviour and response to treatment observed, particularly among low-risk cases. Because of this, an increasing interest exists on the identification of new prognostic factors that could provide already at diagnosis, a more

Table 5. Prognostic factors for overall survival (OS) and progression (transformation to acute leukemia)-free survival (PFS) in MDS.

Prognostic factor	Overall survival			Evolution to AL		
	Adverse category	Median OS* (range)	Univariate analysis	Median PFS (range)	Univariate analysis	Multivariate analysis
			P-value		P-value (HR)	
Anemia	<100 g haemoglobin/L	21 (13–29)	–	Not reached	–	–
Thrombocytopenia	<100 × 10 ⁹ platelets/L	12 (9–15.4)	<0.001	37 (6–68)	0.001	–
≥2 Cytopenias	Yes	20 (8–32)	0.02	37 (7–67)	0.01	–
Serum LDH	>400 IU/L	11 (7.5–14.5)	0.004	Not reached	–	–
Transfusion dependency	Yes	14 (6–22)	0.01	37 (11.5–62.5)	0.04	–
IPSS	Intermediate-2/high risk groups	11 (9–13)	<0.001	19 (3–35)	<0.001	–
WPSS	High/very-high risk groups	12 (8–16)	<0.001	37 months	0.02	–
PI of non-lymphoid CD34 ⁺ precursors	<10%	12 (7.5–16.4)	0.005	37 months	0.001	–
PI of NRBC	<24%	10.5 (6.4–14.5)	<0.001	19 (0–40)	<0.001	0.01 (12.3)

PI, proliferation index; NRBC, nucleated red blood cells; LDH, lactate dehydrogenase; AL, acute leukemia;

*OS, overall survival expressed in months; PFS, progression to acute leukemia-free survival expressed in months; HR, hazard ratio.

doi:10.1371/journal.pone.0044321.t005

dynamic assessment of the behaviour of the disease and contribute to refine the currently used classifications to improve the management of individual patients [6,7]. Although several parameters related to BM failure (e.g.: hemoglobin levels, transfusion needs, number of cytopenias) are significantly associated with the prognosis of the disease, and evidence exists about the potential involvement of cell proliferation in the pathogenesis of MDS, to the best of our knowledge, no study has been reported so far in which the proliferation profile of different compartments of BM cells is analyzed in MDS, and correlated with disease outcome.

Here, we investigated for the first time the proliferation rate of different compartments of BM hematopoietic cells in MDS *vs.* both normal/reactive BM and AML. Overall, an increased proliferation of BM cells was found in MDS *vs.* the other two groups, in line with previous observations [30,31]. Specific analysis of the PI of distinct BM cell compartments revealed that such increased proliferation was mainly due to a higher PI of CD11b⁺ maturing neutrophils which could be viewed as an attempt to compensate for the need to produce mature neutrophils, required to maintain homeostatic levels of these cells in peripheral blood (PB). However, more detailed analysis of the PI of these and other BM cell compartments within the distinct diagnostic and prognostic subtypes of MDS highlighted the existence of significantly different proliferation profiles in low- *vs.* high-risk cases. Accordingly, early/low-risk MDS patients (RA and low-risk IPSS MDS) typically showed an overall increased proliferation of BM cells at the expenses of CD34⁺ non-lymphoid (myeloid plus uncommitted) precursors, maturing neutrophils and NRBC; conversely, advanced/high-risk patients showed progressive collapse of proliferation of these cell compartments, except for the more mature CD11b⁺ neutrophil-lineage cells, similarly to what was found in AML. These observations are in line with the more severe and numerous cytopenias found among the latter group of MDS patients, as well as with the hypermethylated status of cell cycle controlling genes (e.g.: p15^{INK4b}, *CDKN2B*) reported to be associated with an enhanced hematopoiesis and neutrophil differentiation among specific subtypes of low-risk MDS (e.g.: RA with ringed sideroblasts) [32,33,34]. These differences in the proliferation rate of early/low-risk *vs.* advanced/high-risk MDS patients may be also related to overexpression of cell cycle-associated genes in precursor cells from early MDS (e.g.: cyclins B, C, D1 and D2), which would be downregulated or suppressed in advanced disease [14,31,35]. Similar to reactive BM, the higher proliferation of the more mature neutrophil lineage cells observed in MDS probably reflects an attempt to counteract neutropenia [8] by abnormally enhancing the proliferation capability of more differentiated cells [36]. In turn, the progressive collapse of cell proliferation in advanced/high-risk MDS cases could directly or indirectly be related to the accumulation of secondary genetic lesions and/or a progressively impaired BM stroma and cytokine production/response by the dysplastic hematopoietic BM precursors. In line with these observations, we have also recently found increased numbers of early CD34⁺/CyMPO⁺ neutrophil and CD34⁺/CD36⁺/CD123^{lo} erythroid precursors within the BM CD34⁺ HPC from early/low-risk MDS, while in advanced/high-risk MDS neutrophil and erythroid differentiation of CD34⁺ cells typically appeared to be blocked [37]. Of note, similar patterns of evolution were observed when analysis of cell proliferation was performed in paired diagnostic and follow-up samples from a subgroup of 11 MDS patients.

Altogether, these findings suggest that an increased proliferation of neutrophil and erythroid precursors, already detectable among CD34⁺ non-lymphoid (uncommitted plus myeloid) HPC in the

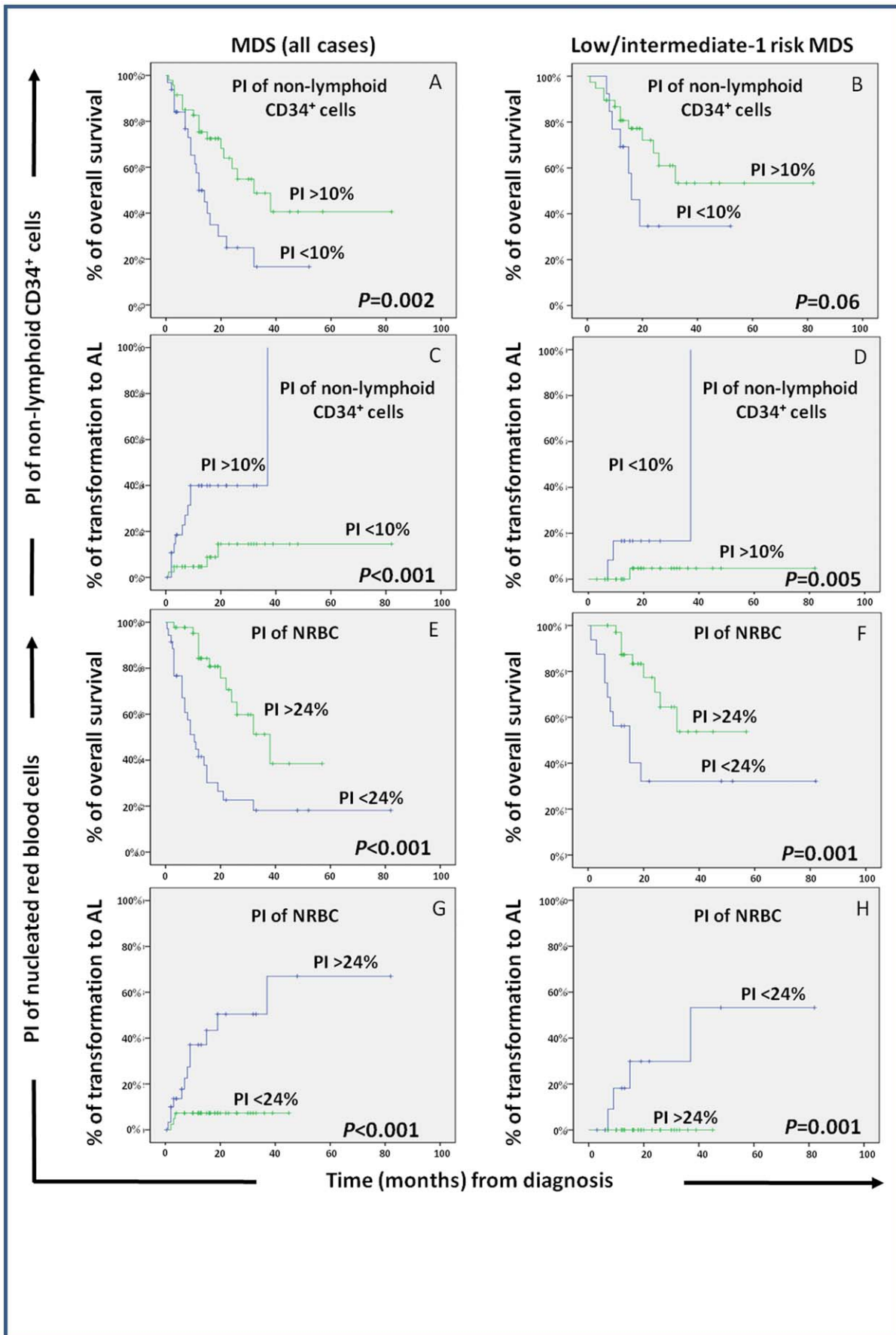


Figure 2. Impact of the proliferation index (PI) of BM non-lymphoid (e.g.: myeloid plus immature) CD34⁺ precursors and nucleated red blood cells (NRBC) on the overall survival and progression (transformation to acute leukemia; AL) free survival of patients with myelodysplastic syndromes (MDS). Overall survival and progression-free survival curves are plotted for groups of MDS patients classified according to the PI of non-lymphoid (e.g.: myeloid plus immature) CD34⁺ cells (panels A to D) and NRBC (panels E to H). In the left column all MDS patients (n = 106) are analyzed together, while in the right column only MDS patients in the low plus intermediate-1 IPSS risk categories (n = 56) are considered.

doi:10.1371/journal.pone.0044321.g002

early stages of the disease, could reflect an attempt of the BM to maintain peripheral counts of mature red cells and neutrophils, required for the subject to remain alive. Conversely, the impaired decreased proliferation of early myeloid precursors, particularly of the neutrophil and erythroid lineage, could represent an early event during progression of early/low-risk to advanced/high-risk MDS and a surrogate marker for a progressively increased risk of transformation to AL, further leading to the worsening of cytopenias observed in advanced disease. The acquired secondary genetic alterations and hypermethylation patterns observed among CD34⁺ and maturing BM cells from advanced MDS [32,36] might further lead to abnormal expression of genes associated with basic cell functions (e.g.: Ankyrin 1 and Tropomodulin in the erythroid lineage) [38], consequently contributing to a gradual defective capacity for multilineage proliferation and differentiation of BM precursors [24,37]. Overall, our findings point to a potentially altered response of advanced MDS patients to cell cycle and apoptotic mediators, specially among non-lymphoid (uncommitted plus myeloid) CD34⁺, NRBC and immature neutrophil precursors, whereas the more mature neutrophils might retain residual susceptibility to such proliferation stimuli. Noteworthy, MD/MPN patients showed a BM proliferation profile similar to that of early/low-risk cases, except for a slightly increased PI among monocytic precursors. Overexpression of cell-cycle proteins (e.g.: cyclin D1) specifically found among these patients could contribute to this unique profile [31]. Of note, our results could be viewed as apparently controversial since they show a progressively decreased cell proliferation of CD34⁺ cells in association with a higher accumulation of blast cells from low- to high-risk MDS and AML. However, they probably indicate that despite being highly proliferative, blast cells from low-risk MDS still retain their capacity to differentiate into more mature cells and therefore they do not accumulate at this stage. Conversely, high-risk MDS blast cells lose their ability to differentiate into more mature cells, such maturation blockade being associated with a numerical expansion of cells with increased survival and decreased apoptotic signalling, which most probably reflects both a decreased ability to mature and also to proliferate, as both cell functions are intimately linked during hematopoiesis.

Based on all the above it could be expected that the impaired proliferation of distinct BM cell compartments in MDS could also be associated with individual prognostic factors, as well as with patient outcome. In detail, a significant association was specifically found between a low PI of non-lymphoid CD34⁺ precursors and

NRBC and other adverse features of the disease (e.g.: higher number of cytopenias, anemia, thrombocytopenia, increased serum LDH, transfusion requirements and intermediate/poor cytogenetics) as well as with a worse disease outcome -shorter OS and progression to AL free survival (PFS)-. Interestingly, the impact of the degree of impairment of the proliferation of these two subsets of BM precursors in the outcome of MDS patients was retained when early/low-risk and advanced/high-risk MDS patients were separately considered. Even more, multivariate analysis of prognostic factors showed that a decreased PI of NRBC was the most powerful independent prognostic factor for both OS and acute leukemia PFS of MDS patients.

Altogether, these results suggest that assessment of the PI of NRBC, and potentially also of other compartments of BM precursors (e.g.: myeloid CD34⁺ HPC), could significantly contribute to a better management of MDS patients, potentially also during monitoring of the effects of new drugs and therapeutic strategies.

In summary, our results show the existence of altered proliferation profiles in the BM of MDS patients which are associated with unique but different patterns in early/low-risk *vs.* advanced/high-risk MDS. From the prognostic point of view, an abnormally low PI of non-lymphoid CD34⁺ cells and NRBC were both associated with a significantly longer OS and decreased risk of transformation to AL, even when early/low-risk and advanced/high-risk MDS patients were separately considered, the PI of NRBC emerging as an independent prognostic factor for both OS and PFS in MDS.

Acknowledgments

The authors would like to gratefully acknowledge Elena Góngora (Sanilab, Madrid, Spain), Luis Escibano (Hospital Virgen del Valle, Toledo, Spain), J. Diaz Mediavilla (Ruber International, Madrid, Spain), Rafael Franco Osorio (Hospital Punta Europa, Algeciras, Spain) for their kind contribution to this work.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AO SM. Performed the experiments: SM CT MJ-A MG-G MLG CF MA. Analyzed the data: SM AO CT CF MJ-A MG-G MLG. Contributed reagents/materials/analysis tools: AL JF-M CC MP MPG GC OG GDM MG-S PL. Wrote the paper: SM AO.

References

1. Malcovati L, Della Porta MG, Strupp C, Ambaglio I, Kuendgen A, et al. (2011) Impact of the degree of anemia on the outcome of patients with myelodysplastic syndrome and its integration into the WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS). *Haematologica* 96: 1433–1440.
2. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, et al. (1997) International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 89: 2079–2088.
3. Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, Della Porta MG, Pascutto C, et al. (2007) Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 25: 3503–3510.
4. Kantarjian H, O'Brien S, Ravandi F, Cortes J, Shan J, et al. (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.
5. Naqvi K, Garcia-Manero G, Sardesai S, Oh J, Vigil CE, et al. (2011) Association of comorbidities with overall survival in myelodysplastic syndrome: development of a prognostic model. *J Clin Oncol* 29: 2240–2246.
6. Cazzola M (2011) Risk assessment in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Haematologica* 96: 349–352.
7. Cazzola M, Malcovati L (2010) Prognostic classification and risk assessment in myelodysplastic syndromes. *Hematol Oncol Clin North Am* 24: 459–468.
8. Matarraz S, Fernandez C, Albors M, Teodosio C, Lopez A, et al. (2011) Cell-cycle distribution of different cell compartments in normal versus reactive bone marrow: a frame of reference for the study of dysplastic hematopoiesis. *Cytometry B Clin Cytom* 80: 354–361.

9. Parker JE, Mufli GJ, Rasool F, Mijovic A, Devereux S, et al. (2000) The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS. *Blood* 96: 3932–3938.
10. Darzynkiewicz Z, Bedner E, Traganos F, Murakami T (1998) Critical aspects in the analysis of apoptosis and necrosis. *Hum Cell* 11: 3–12.
11. Peters SW, Clark RE, Hoy TG, Jacobs A (1986) DNA content and cell cycle analysis of bone marrow cells in myelodysplastic syndromes (MDS). *Br J Haematol* 62: 239–245.
12. Sauntharajah Y, Triozzi P, Rini B, Singh A, Radivoyevitch T, et al. p53-Independent, Normal Stem Cell Sparing Epigenetic Differentiation Therapy for Myeloid and Other Malignancies. *Semin Oncol* 39: 97–108.
13. Rajapaksa R, Ginzton N, Rott LS, Greenberg PL (1996) Altered oncoprotein expression and apoptosis in myelodysplastic syndrome marrow cells. *Blood* 88: 4275–4287.
14. Pellagatti A, Cazzola M, Giagounidis A, Perry J, Malcovati L, et al. (2010) Deregulated gene expression pathways in myelodysplastic syndrome hematopoietic stem cells. *Leukemia* 24: 756–764.
15. Head DR, Jacobberger JW, Mosse C, Jagasia M, Dupont W, et al. Innovative analyses support a role for DNA damage and an aberrant cell cycle in myelodysplastic syndrome pathogenesis. *Bone Marrow Res* 2011: 950934.
16. Montecucco C, Riccardi A, Traversi E, Giordano P, Mazzini G, et al. (1983) Proliferative activity of bone marrow cells in primary dysmyelopoietic (preleukemic) syndromes. *Cancer* 52: 1190–1195.
17. Varma N, Varma S (2008) Proliferative indices, cytogenetics, immunophenotype and other prognostic parameters in myelodysplastic syndromes. *Indian J Pathol Microbiol* 51: 97–101.
18. Alexandrakis MG, Passam FH, Kyriakou DS, Dambaki C, Katrinakis G, et al. (2004) Expression of the proliferation-associated nuclear protein MIB-1 and its relationship with microvascular density in bone marrow biopsies of patients with myelodysplastic syndromes. *J Mol Histol* 35: 857–863.
19. Montecucco C, Riccardi A, Traversi E, Danova E, Ucci G, et al. (1983) Flow cytometric DNA content in myelodysplastic syndromes. *Cytometry* 4: 238–243.
20. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD (2002) The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 100: 2292–2302.
21. van Dongen JJ, Lhermitte L, Botcher S, Almeida J, van der Velden VH, et al. (2012) EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* [Epub ahead of print].
22. Primo D, Flores J, Quijano S, Sanchez ML, Sarasquete ME, et al. (2006) Impact of BCR/ABL gene expression on the proliferative rate of different subpopulations of haematopoietic cells in chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 135: 43–51.
23. Swerts K, Van Roy N, Benoit Y, Laureys G, Philippe J (2007) DRAQ5: improved flow cytometric DNA content analysis and minimal residual disease detection in childhood malignancies. *Clin Chim Acta* 379: 154–157.
24. Matarraz S, Lopez A, Barrera S, Fernandez C, Jensen E, et al. (2010) Bone marrow cells from myelodysplastic syndromes show altered immunophenotypic profiles that may contribute to the diagnosis and prognostic stratification of the disease: a pilot study on a series of 56 patients. *Cytometry B Clin Cytom* 78: 154–168.
25. Alimena G, Billstrom R, Casalone R, Gallo E, Mitelman F, et al. (1985) Cytogenetic pattern in leukemic cells of patients with constitutional chromosome anomalies. *Cancer Genet Cytogenet* 16: 207–218.
26. Mitelman F (1995) An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel: S. Karger, 78.
27. Ketterling RP, Wyatt WA, VanWier SA, Law M, Hodnefield JM, et al. (2002) Primary myelodysplastic syndrome with normal cytogenetics: utility of 'FISH panel testing' and M-FISH. *Leuk Res* 26: 235–240.
28. Teodosio C, Garcia-Montero AC, Jara-Acvedo M, Sanchez-Munoz L, Alvarez-Twose I, et al. (2010) Mast cells from different molecular and prognostic subtypes of systemic mastocytosis display distinct immunophenotypes. *J Allergy Clin Immunol* 125: 719–726, 726 e711–726 e714.
29. Fonatsch C, Gudat H, Lengfelder E, Wandt H, Silling-Engelhardt G, et al. (1994) Correlation of cytogenetic findings with clinical features in 18 patients with inv(3)(q21q26) or t(3;3)(q21;q26). *Leukemia* 8: 1318–1326.
30. Agool A, Schot BW, Jager PL, Vellenga E (2006) 18F-FLT PET in hematologic disorders: a novel technique to analyze the bone marrow compartment. *J Nucl Med* 47: 1592–1598.
31. Economopoulou C, Pappa V, Papageorgiou S, Kotsiati F, Economopoulou P, et al. (2010) Cell cycle and apoptosis regulatory gene expression in the bone marrow of patients with de novo myelodysplastic syndromes (MDS). *Ann Hematol* 89: 349–358.
32. Hofmann WK, Takeuchi S, Takeuchi N, Thiel E, Hoelzer D, et al. (2006) Comparative analysis of hypermethylation of cell cycle control and DNA-mismatch repair genes in low-density and CD34+ bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 30: 1347–1353.
33. Teofili L, Rutella S, Chiusolo P, La Barbera EO, Rumi C, et al. (1998) Expression of p15INK4B in normal hematopoiesis. *Exp Hematol* 26: 1133–1139.
34. Valencia A, Cervera J, Such E, Ibanez M, Gomez I, et al. (2010) Aberrant methylation of tumor suppressor genes in patients with refractory anemia with ring sideroblasts. *Leuk Res* 35: 479–483.
35. Vasikova A, Belickova M, Budinska E, Cermak J (2010) A distinct expression of various gene subsets in CD34+ cells from patients with early and advanced myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 34: 1566–1572.
36. Mossner M, Hopfer O, Nowak D, Baldus CD, Neumann U, et al. (2010) Detection of differential mitotic cell age in bone marrow CD34(+) cells from patients with myelodysplastic syndrome and acute leukemia by analysis of an epigenetic molecular clock DNA signature. *Exp Hematol* 38: 661–665.
37. Matarraz S, Lopez A, Barrera S, Fernandez C, Jensen E, et al. (2008) The immunophenotype of different immature, myeloid and B-cell lineage-committed CD34+ hematopoietic cells allows discrimination between normal/reactive and myelodysplastic syndrome precursors. *Leukemia* 22: 1175–1183.
38. Gueller S, Komor M, Nowak D, Baldus CD, de Vos S, et al. (2010) Identification of defects in the transcriptional program during lineage-specific in vitro differentiation of CD34(+) cells selected from patients with both low- and high-risk myelodysplastic syndrome. *Exp Hematol* 38: 718–732, 732 e711–716.

ARTÍCULO 3:

“La leucemia mieloide aguda (LMA) “*de novo*” y la leucemia aguda de fenotipo mixto (MPAL) del adulto con frecuencia se asocian a la presencia de una hematopoyesis residual clonal, al diagnóstico.”

Objetivos. La LMA incluye un grupo heterogéneo de enfermedades clonales de la célula *stem* hematopoyética caracterizado por una sustitución progresiva de la hematopoyesis normal por una expansión clonal de precursores mieloides bloqueados en estadios iniciales (o intermedios) de maduración. Actualmente se considera que esta expansión de células patológicas puede surgir “*de novo*” (LMA “*de novo*”), o ser secundaria a i) la transformación de una hemopatía preexistente (p.ej. un SMD o una NMP) o ii) a tratamientos quimioterápicos previos, asociándose en ambos casos, a un peor pronóstico. El objetivo del presente trabajo se centró en determinar la frecuencia con la que pacientes adultos con LMA y MPAL “*de novo*” muestran una hematopoyesis clonal residual, y la posible asociación entre este hallazgo y la presencia de fenotipos aberrantes detectables mediante citometría de flujo.

Materiales y métodos. En conjunto, en este trabajo se estudiaron 53 adultos con LMA y 6 MPAL “*de novo*”. La naturaleza clonal de cada población celular estudiada, se estableció en base a la presencia de alteraciones cromosómicas detectadas mediante hibridación in situ fluorescente (FISH), y/o la existencia de un patrón clonal de inactivación del cromosoma X (mediante el test HUMARA), tanto en los blastos leucémicos como en los distintos compartimientos de células hematopoyéticas residuales de MO (precursores CD34+ residuales, células de línea de granulocito neutrófilo, eosinófilo, basófilo y monocito, y serie eritroide nucleada) de cada paciente, una vez purificados mediante citometría de flujo (pureza $\geq 97\%$). En todos los casos, se realizó en paralelo un estudio inmunofenotípico de MO empleando combinaciones de 4 colores, con el fin de detectar la presencia de patrones inmunofenotípicos aberrantes en las poblaciones celulares hematopoyéticas de MO antes mencionadas.

Resultados. Nuestros resultados demuestran que la mayoría de los pacientes con LMA y MPAL “*de novo*” presentan evidencia genética y molecular de clonalidad en las poblaciones de células residuales de MO, incluidos los compartimientos de granulocito neutrófilo, línea monocítica y eritroide, además de la

población de blastos leucémicos. Además, los casos que presentaban una hematopoyesis residual clonal, mostraron también con mayor frecuencia alteraciones fenotípicas en dichos compartimientos celulares, asociadas a un mayor número de aberraciones por paciente, respecto a los pacientes con LMA/MPAL en los que la hematopoyesis residual no mostraba rasgos de clonalidad. Estos hallazgos son compatibles con la existencia de una hematopoyesis clonal residual de forma previa al desarrollo de la leucemia aguda, en la gran mayoría de los adultos que debutan con LMA o MPAL “*de novo*”.

Conclusiones. En resumen, nuestros resultados demuestran que en la mayoría de los adultos que debutan con LMA y MPAL “*de novo*”, la hematopoyesis residual presenta rasgos genéticos, moleculares e inmunofenotípicos sugerentes de clonalidad, lo cual podría asociarse, además, a un escenario más favorable para la expansión de los blastos leucémicos. Asimismo, en estos pacientes, la detección de alteraciones fenotípicas al diagnóstico podría poner de manifiesto la posible existencia de una hematopoyesis residual clonal, contribuyendo así a un diagnóstico precoz de la enfermedad, y potencialmente también, a un tratamiento más adecuado de la misma.

ORIGINAL ARTICLE

Newly diagnosed adult AML and MPAL patients frequently show clonal residual hematopoiesis

C Fernandez¹, MC Santos-Silva², A López¹, S Matarraz¹, M Jara-Acevedo¹, J Ciudad¹, ML Gutierrez¹, ML Sánchez¹, C Salvador-Osuna³, MJ Berrueto⁴, JÁ Díaz-Arias⁵, AM Palomo-Hernández⁶, E Colado⁷, N González⁸, D Gallardo⁹, A Asensio¹⁰, R García-Sánchez¹¹, R Saldaña¹², C Cerveró¹³, A Carboné-Bañeres¹⁴, O Gutierrez¹⁵ and A Orfao¹

Adult acute myeloid leukemia (AML) is a highly heterogeneous stem cell malignancy characterized by the clonal expansion of immature myeloid precursors. AML may emerge *de novo*, following other hematopoietic malignancies or after cytotoxic therapy for other disorders. Here, we investigated the clonal vs reactive nature of residual maturing bone marrow cells in 59 newly diagnosed adult AML and mixed phenotype acute leukemia (MPAL) patients as assessed by interphase fluorescence *in situ* hybridization analysis of AML and myelodysplastic syndrome-associated cytogenetic alterations and/or the pattern of chromosome X inactivation, in females. In addition, we investigated the potential association between the degree of molecular/genetic involvement of hematopoiesis and coexistence of altered immunophenotypes by flow cytometry. Our results indicate that residual maturing neutrophils, monocytes and nucleated red cell precursors from the great majority of newly diagnosed AML and MPAL cases show a clonal pattern of involvement of residual maturing hematopoietic cells, in association with a greater number of altered immunophenotypes. These findings are consistent with the replacement of normal/reactive hematopoiesis by clonal myelopoiesis and/or erythropoiesis in most newly diagnosed AML and MPAL cases, supporting the notion that in most adults presenting with *de novo* AML, accumulation of blast cells could occur over a pre-existing clonal hematopoiesis.

Leukemia (2013) 27, 2149–2156; doi:10.1038/leu.2013.109

Keywords: *de novo* AML; clonal hematopoiesis; immunophenotype

INTRODUCTION

The current World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms identifies four major subgroups of heterogeneous diseases —acute myeloid leukemia (AML), myelodysplastic syndromes (MDS), myeloproliferative neoplasms (MPN) and mixed myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms— with a significant degree of overlap among them.¹ Within AML, disease heterogeneity translates into six major subgroups, each of which still contains several specific diagnostic entities. Except for a small proportion of AML cases, which carry specific recurrent cytogenetic alterations, diagnostic criteria for AML requires >20% of myeloid lineage blast cells in the bone marrow (BM), with or without previous cytotoxic therapies or MDS-associated features.¹ Among AML patients, both cases occurring *de novo* and secondary to cytotoxic therapies or a prior myeloid neoplasia (for example, MDS or MPN) are included, their subclassification being of utmost clinical relevance because of their distinct prognosis.^{2–4} In addition, among cases classified as *de novo* AML, a significant percentage of patients show AML with myelodysplasia-related changes, this also represents a unique poor-prognosis WHO category of the disease, independently of

the lineage and cytogenetic alterations of myeloid blast cells.⁵ Overall, these criteria confirm the clinical relevance of the presence of MDS-associated features in AML, for unequivocal differential diagnosis among *de novo* AML, secondary AML and AML with myelodysplasia-related changes, an intermediate subgroup of AML with dysplastic BM features potentially reflecting the presence of an underlying clonal disorder of residual hematopoiesis.

At present, it is well known that neither cytomorphology nor cytogenetics alone is sensitive enough to assess the potential clonal nature of residual hematopoietic cells, in every *de novo* AML patient.^{2,3,6,7} To the best of our knowledge, no study has been reported so far in which the clonal vs reactive nature of residual mature/maturing BM cells other than blast cells, has been systematically analyzed in patients presenting with AML, as currently defined by the WHO 2008 classification. In the present study, we investigated the clonal vs reactive nature of residual maturing BM cells in newly diagnosed adult AML and mixed phenotype acute leukemia (MPAL) patients as assessed by interphase fluorescence *in situ* hybridization (iFISH) analysis of those chromosomal alterations that are frequently observed in

¹Servicio General de Citometría and Departamento de Medicina, Centro de Investigación del Cáncer (Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer and IBSAL; CSIC-USAL), Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain; ²Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil; ³Servicio de Hematología, Hospital Miguel Servet, Zaragoza, Spain; ⁴Hospital Punta de Europa, Algeciras, Spain; ⁵Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain; ⁶Hospital Xeral Calde, Lugo, Spain; ⁷Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain; ⁸Hospital Obispo Polanco, Teruel, Spain; ⁹Servicio de Hematología Institut Català d'Oncologia, Hospital Josep Trueta, Girona, Spain; ¹⁰Hospital San Jorge-Huesca, Huesca, Spain; ¹¹Hospital Virgen de la Victoria de Málaga, Málaga, Spain; ¹²Hospital de Jerez de la Frontera, Jerez de la Frontera, Spain; ¹³Servicio de Hematología, Hospital General Virgen de la Luz, Cuenca, Spain; ¹⁴Unidad de Oncopediatría, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, Spain and ¹⁵Servicio de Hematología, Hospital Río Hortega, Valladolid, Spain. Correspondence: Professor A Orfao, Servicio General de Citometría and Departamento de Medicina, Centro de Investigación del Cáncer (Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer and IBSAL; CSIC-USAL), Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain.

E-mail: orfao@usal.es

Received 5 March 2013; revised 2 April 2013; accepted 5 April 2013; accepted article preview 12 April 2013; advance online publication, 10 May 2013

AML and in MDS¹ and/or the pattern of inactivation of the X chromosome in females.⁸ In addition, the potential association between the molecular findings and both dysplastic features by cytomorphology and altered immunophenotypes by multi-parameter flow cytometry (FCM) was also investigated. Overall, our results indicate that residual maturing neutrophils, monocytes and nucleated red blood cells (NRBC) from the great majority of the newly diagnosed AML and MPAL cases (mostly including *de novo* AML) show a clonal pattern of involvement, in association with a greater number of altered immunophenotypes. These findings are consistent with the replacement of normal/reactive hematopoiesis by clonal myelopoiesis and/or erythropoiesis in most adults with newly diagnosed AML and support the notion that in the great majority of these patients, accumulation of blast cells could occur over a pre-existing clonal (dysplastic or not) hematopoiesis.

MATERIALS AND METHODS

Patients and samples

A total of 59 adult patients (23 males and 36 females; median age of 61 years) newly diagnosed with either AML ($n = 53$) or MPAL ($n = 6$) were included in this study. In all cases, diagnosis was established according to the WHO 2008 criteria¹ based on blood counts, clinical findings, morphological, immunophenotypical and cytogenetic/molecular data (Supplementary Table 1).

In every case, EDTA-anticoagulated BM samples were collected at diagnosis, after informed consent was given by each individual; the study was approved by the local Ethics Committee (Institutional Review Board) of the University Hospital of Salamanca (Salamanca, Spain).

Immunophenotypic studies

Erythrocyte-lysed, freshly obtained BM samples were analyzed by a panel of four-color combinations of monoclonal antibodies (MAb) directed against cell surface membrane markers alone or cell surface membrane markers in combination with cytoplasmic (Cy) and nuclear (n) antigens, according to previously described techniques.^{9–12} The following pairs of fluorochrome-conjugated MAb—fluorescein isothiocyanate, phycoerythrin— were used in combination with CD45-peridinin chlorophyll protein-cyanin 5.5 (PerCPCy5.5) and CD34-allophycocyanin (APC), (1) nTdT, CyMPO; (2) CD19, CyCD79a; (3) CyCD3, CD7; (4) CD2, CD56; (5) HLA-DR, CD117; (6) HLA-DR, CD123; (7) CD11b, CD13; (8) CD15, CD16; (9) CD65, 7.1/NG2; (10) CD36, CD64 and CD14-APC; (11) CD71, CD235a (or CD105); (12) CD38, CD203c; (13) CD61, CD25; (14) CD22, CD33 and; (15) CD300e (IREM-2), CD14. All MAb reagents were purchased from Becton/Dickinson Biosciences (BD, San Jose, CA, USA), except CD65, 7.1/NG2, CD11b, CD36, CD64, CD16, CD235a and CD203c, which were obtained from Immunotech (Marseille, France), CD38, which was purchased from Cytognos SL (Salamanca, Spain), and CD300e (IREM-2) that was obtained from Immunostep SL (Salamanca, Spain). Immediately after sample preparation, data acquisition was performed for $\geq 5 \times 10^4$ cells per sample aliquot using a FACSCanto II flow cytometer (BD) equipped with the FACSDiva software program (BD). For data analysis, the INFINICYT software (Cytognos SL) was used.

Cell purification

Purification of specific BM cell populations was performed using a FACSAria flow cytometer (BD) equipped with the FACSDiva software. Before sorting, cells were stained with ≥ 4 -color combinations of fluorochrome-conjugated MAb aimed at specific and simultaneous identification of the different cell populations of interest present in the sample (for example, blast cells, maturing neutrophils, monocytic cells, nucleated erythroid precursors and mature lymphocytes). The purity achieved for the FACS-sorted cell populations was systematically $> 97\%$.

iFISH studies

iFISH studies aimed at detection of t(9;22), t(8;21), inv(16), 11q23 abnormalities, -5/del(5q), -7/del(7q), del(20q), trisomy 8 and -Y, were performed on interphase nuclei from the different FACS-purified cell populations, after they were fixed in 3/1 (v/v) methanol/acetic. For this purpose, the following panel of Spectrum Orange (SO) and Spectrum Green (SG) DNA probes (Vysis Inc, Downers Grove, IL, USA) was used: LSI

BCR/ABL, LSI *AML1/ETO*, LSI *CBFB* dual-color breakapart, LSI *MLL* dual-color breakapart, LSI *EGR1/D5S23*, *D5S721*, LSI *D7S486/CEP7*, LSI *D20S108*, *CEP8* and *CEPY* (satellite III) probes. Hybridization with fluorochrome-labeled FISH probes was performed according to the recommendations of the manufacturer with slight modifications, as described elsewhere.¹³ Fluorescence signals were evaluated as previously described¹³ using a BX60 fluorescence microscope (Olympus, Hamburg, Germany) equipped with a $\times 100$ oil objective.

HUMARA assay

Assessment of clonality was performed on FACS-purified cell populations from female patients ($n = 36$) using the human androgen receptor X-chromosome inactivation (HUMARA) assay. For that purpose, genomic DNA was extracted from FACS-purified blast cells, maturing neutrophils, monocytic cells, NRBC and lymphocytes using the QIAamp mini and micro DNA extraction kits (Qiagen, Valencia, CA, USA), according to the instructions of the manufacturer. Extracted DNA (20 ng) was digested overnight at 37 °C, in the presence vs absence of the HAPII (10 U/ μ l) methylation-sensitive restriction endonuclease (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) in a final volume of 50 μ l. Afterward, restriction enzymes were inactivated by heating at 95 °C for 10 min. Both digested and non-digested DNA was then amplified by PCR using two sets of primers flanking the trimeric CAG repeat specific for exon 1 of the HUMARA gene: round-one primer pairs (forward: 5'-TGTGGGGCCTCTA CGATG- 3'; reverse: 5'-TCCAACACCTACCGA-3') were used for 28 cycles (1 min at 95 °C, 1 min at 55 °C and 45 s at 72 °C, with an initial denaturation step at 95 °C for 10 min) in a iCycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and round-two primer pairs (forward: 5'-CCGAGGAGCTTTCGAGAATC-3'; reverse-FAM5'-TACGATGGGCTTGGGAGAA-3') were used for 20 reaction cycles (1 min at 95 °C, 1 min at 58 °C and 45 s at 72 °C, with an initial denaturation at 95 °C for 10 min). Following the second round of amplification, PCR products were checked to confirm the amplification of the HUMARA target using 0.8% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide (0.5 μ g/ml). For fragment analyses, 1 μ l of the PCR product was placed in 12.25 μ l of Hi-DiTM formamide (Applied Biosystems) plus 0.5 μ l of GENESCAN 400HD (ROX) size standard (Applied Biosystem). The mixture was sequentially denatured at 95 °C for 5 min and cooled in ice. The PCR products were examined by fragment analysis in an automated ABI PRISM 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems). Data was analyzed using the GeneScan software (version 3.1; Applied Biosystems). Clonality was defined when the corrected ratio (CR) showed an excess of representation of one of the parental alleles over the other of $\geq 50\%$ (CR ≤ 0.33 or ≥ 3).^{8,14–16}

KIT mutation studies

Presence of *KIT* mutation was assessed in DNA samples from FACS-purified cell fractions, using a previously described PCR-clamping technique.^{17,18}

Statistical methods

To determine the statistical significance of differences observed between groups, the Chi-square and the Mann-Whitney U tests were used for categorical and continuous variables, respectively (SPSS software package, SPSS, Chicago, IL). *P*-values < 0.05 were considered to be associated with statistical significance.

RESULTS

Cytogenetic and molecular markers of blast cell clonality

Overall, the clonal nature of blast cells was demonstrated in all (59/59; 100%) newly diagnosed AML and MPAL patients analyzed (Table 1). In detail, a clonal pattern of inactivation of chromosome X was detected in 31/31 (heterozygous) females investigated, one or more chromosomal alterations were found in 32/48 (69%) cases analyzed by iFISH and the presence of *KIT* mutation was detected in three patients. In six female AML patients, clonality was confirmed by both the HUMARA test and iFISH, either in the absence ($n = 5$) or in the presence of the *KIT* mutation ($n = 1$). The specific chromosomal alterations detected by iFISH in leukemia blast cells included: isolated trisomy 8, 5 cases; del (5q31), 3 cases; del (7q31), 4 cases; monosomy 7, 1 case; nulismy Y, 2 cases; del (20q12), 2 cases; t(9;22), 3 cases; t(8;21), 1 case; inv (16), 2 cases; del

Table 1. Frequency of clonality found for different hematopoietic cell populations from patients with newly diagnosed AML and MPAL as detected by HUMARA, *KIT* mutation and/or iFISH

Percentage of AML and MPAL cases	Clonal by HUMARA test ^a	Positive <i>KIT</i> mutation	Cytogenetic alterations by iFISH	Total
Percentage of cases with clonal markers on blast cells	31/31 (100%)	3/3 (100%)	32/48 (69%)	59/59(100%)
Percentage of cases with clonal markers on maturing granulomonocytic and/or NRBC	25/31 (81%)	3/3 (100%)	28/48 (58%)	49/59 (83%)

Abbreviations: AML, acute myeloid leukemia; HUMARA, human androgen receptor assay; iFISH, interphase fluorescence *in situ* hybridization; MPAL, mixed phenotype acute leukemia; NRBC, nucleated red blood cells. ^aOnly heterozygous female cases were analyzed by the HUMARA test.

(7q31) in association with del (20q12), 1 case; del (7q31) plus nulismy Y, 1 case; del (5q31) associated with trisomy 8, 2 cases; del (5q31) plus del (20q12), 1 case; del (5q31) associated with both trisomy 8 and del (7q31), 3 patients and del (5q31), del (20q12) and trisomy 8, 1 patient (Table 2).

Clonal involvement of residual mature/maturing BM cells

Overall, the clonal nature of residual BM compartments of mature/maturing neutrophils and monocytic cells and/or NRBC was confirmed for at least one of these three cell compartments in most newly diagnosed AML and MPAL cases (49/59; 83%) (Figure 1, Tables 1 and 2). In the majority of cases showing clonal residual mature/maturing myeloid and/or erythroid cells (clonal cases), chromosomal alterations by iFISH and/or the *KIT* mutation (31/49; 68%) were detected in their blast cells, while cases carrying these cytogenetic/molecular alterations represented a lower fraction (4/10, 40%; $P=0.17$) among newly diagnosed AML and MPAL patients in whom the presence of residual clonal maturing neutrophils, monocytes and/or NRBC could not be demonstrated (Table 2). Of note, all the later four altered cases, were males: two showed isolated trisomy 8, one had isolated del(7q31), and one simultaneously carried del(5q31) and del(20q12) in their blast cells with apparently normal maturing myeloid and erythroid precursors (Table 2). Conversely, all cases carrying *KIT* mutation, t(8;21), t(9;22) and inv(16) displayed clonal involvement of residual neutrophils, monocytes and/or NRBC. However, differences in the frequency of clonal cases in these genetic subgroups vs other AML and MPAL cases did not reach statistical significance ($P>0.05$) due to the reduced number of the former AML cases (Table 2).

Frequency of cases with clonal residual hematopoiesis in distinct WHO 2008 subtypes of AML

Overall, no statistically significant differences were observed as regards the distribution of cases with clonal vs non-clonal residual hematopoiesis among the different diagnostic subgroups of newly diagnosed AML (Table 3). Despite this, it should be noted that all therapy-related AML patients (secondary AML; 3/3 cases) and CBF AML cases (5/5 cases), as well as the majority of *de novo* AML with myelodysplasia-related changes (AML-MRC; 24/28 cases, 86%) and MPAL (5/6 patients, 83%) patients had an underlying clonal residual hematopoiesis. Conversely, the frequency of clonal cases appeared to be slightly ($P>0.05$) lower among *de novo* AML not otherwise specified (NOS; 11/15 cases, 73%) (Table 3 and Supplementary Table 1).

Immunophenotypic profile of residual BM mature/maturing granulomonocytic and NRBC

The immunophenotypic profile of residual BM mature/maturing neutrophils, monocytic cells and NRBC could be analyzed in all but one AML case (58/59 cases). Overall, immunophenotypic alterations similar to those recurrently described for MDS^{9,10,19–22} were found in 52/58 cases (90%). When present, such alterations typically involved any combination of the three granulomonocytic/erythroid cell compartments analyzed. Accordingly, immunophenotypically altered neutrophils, monocytes and NRBC were found in 51/58 (88%), 38/52 (73%) and 27/45 (60%) patients, respectively (Table 4). The majority of cases showed altered

Table 2. Specific markers of clonality detected in blast cells from patients with newly diagnosed AML and MPAL classified according to the clonal nature of residual mature/maturing granulomonocytic cells and/or nucleated red blood cells

Molecular/genetic marker of clonality	Newly diagnosed AML and MPAL	
	Cases with non-clonal RH, n = 10	Cases with clonal RH n = 49
HUMARA ^a (n = 31)	6/31	25/31 ^b
<i>KIT</i> mutation (n = 3)	0/3	3/3 ^c
Cytogenetic alterations by iFISH (n = 32)	4/32	28/32 ^b
nuc ish 8q22(RUNX1T1x3), 21q22(RUNX1x3) (RUNX1 with RUNX1T1)	0	1
nuc ish (ABL1x3), (BCRxB2), (ABL1 con BCRxB2)	0	3
nuc ish (CBFBx2), (5'CBFB sep3'CBFBx1)	0	2
nuc ish 5q31(<i>EGR1</i> x1)	0	3
nuc ish 7q31(D72486x1)	0	4
nuc ish 8cen (D8Z2x3)	2	3
nuc ish DYZ1-	0	2
nuc ish 20q12(<i>ZNF217</i> x1)	0	2
nuc ish 5q31(<i>EGR1</i> x1), nuc ish 8cen (D8Z2x3)	0	2
nuc ish 5q31(<i>EGR1</i> x1), nuc ish 20q12(<i>ZNF217</i> x1)	1	0
nuc ish 7q31(D72486x1), nuc ish 7p11.1(D7Z1x1)	1	0
nuc ish 7q31(D72486x1), nuc ish 20q12(<i>EGR1</i> x1)	0	1
nuc ish 7q31(D72486x1), nuc ish DYZ1-	0	1
nuc ish 5q31(<i>EGR1</i> x1), nuc ish 7q31(D72486x1), nuc ish 8cen (D8Z2x3)	0	3
nuc ish 5q31(<i>EGR1</i> x1), nuc ish 20q12(<i>EGR1</i> x1), nuc ish 8cen (D8Z2x3)	0	1
Total (n = 59)	10/59 (17%)	49/59 (85%)

Abbreviations: AML, acute myeloid leukemia; HUMARA, human androgen receptor assay; iFISH, interphase fluorescence *in situ* hybridization; MPAL, mixed phenotype acute leukemia; RH, residual hematopoiesis. ^aOnly heterozygous female cases were analyzed by the HUMARA test. ^bIn five cases, clonality was simultaneously detected by iFISH and the HUMARA test. ^cIn two cases, clonality was detected by the *KIT* mutation and the HUMARA test and/or iFISH.

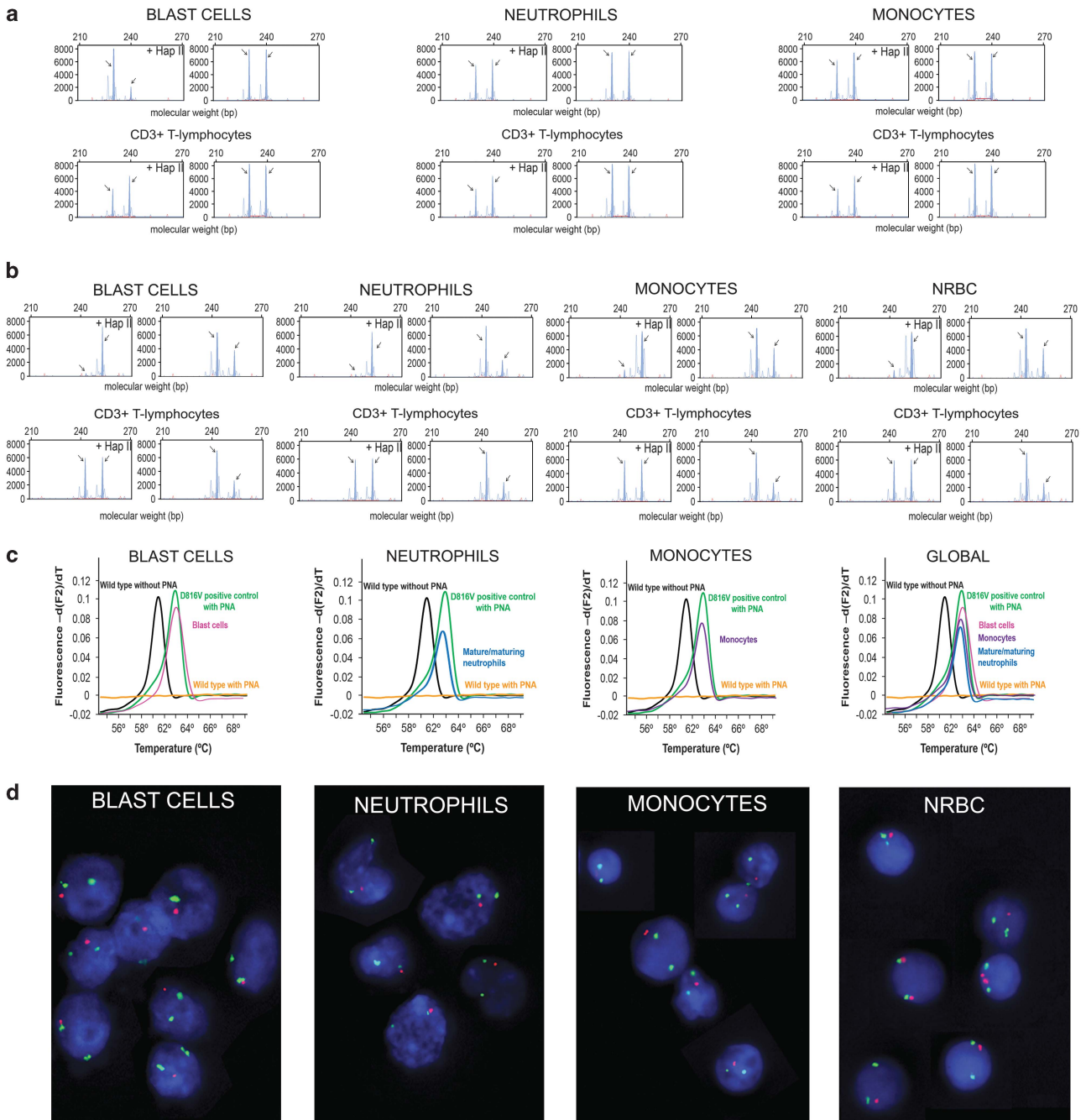


Figure 1. Assessment of clonal residual hematopoiesis based on the HUMARA test, interphase FISH and/or the *KIT* mutation assays in purified blast cells as well as purified mature/maturing neutrophils, monocytic and erythroid BM cells. The HUMARA assay results in panels **a** and **b** show two different cases analyzed with the HUMARA test. An AML with (poly)clonal residual hematopoiesis is shown in panel **a**, where the blast cell population shows one allele to be markedly reduced in intensity after HpaII digestion compared with the level of this allele found in normal/polyclonal CD3+ T-lymphocytes, mature/maturing granulomonocytic and erythroid precursors. An AML with clonal residual hematopoiesis is shown in panel **b**, where one allele is markedly reduced in intensity after HpaII digestion in each of the purified myeloid populations (for example, blast cells, neutrophils, monocytes and NRBC) analyzed vs that of CD3+ T-lymphocytes. In panel **c**, melting curves positive for the D816V *KIT* mutation in all purified BM cell populations (blast cells, neutrophils and monocytes) vs the wild-type sequence with a melting curve at 59 $^{\circ}C$ is shown. In panel **d**, iFISH patterns found with the D7S486/CEP7 dual-color probe, in a patient with AML and clonal residual hematopoiesis is shown. Please note that all populations from this patient, which are displayed in panel **d**, show the same aberrant pattern consistent with del(7q)—loss of one red signal in the presence of two green signals is interpreted as 7q- deletion—with a higher frequency of del(7q) in blast cells, neutrophils and monocytes vs erythroid nucleated precursors.

immunophenotypic profiles in two (16/58 cases; 27%) or three (29/58; 50%) cell populations, while phenotypic alterations were restricted to a single maturation-associated cell compartment in 13/58 cases (22%) (Table 4). Once the frequency of

phenotypic alterations in distinct cell populations was compared between cases with 'clonal' vs 'non-clonal' residual hematopoiesis, the former showed a significantly higher frequency of aberrant phenotypes among maturing neutrophils (98% vs 50%;

Table 3. Presence of molecular/genetic markers of clonality in different bone marrow compartments of mature/maturing neutrophils, monocytic and nucleated red blood cells from newly diagnosed AML and MPAL patients grouped according to the WHO 2008 classification

WHO 2008 subtype of AML	Cases with non-clonal RH	Cases with clonal RH	P-value
Therapy-related myeloid neoplasms (n = 3)	0 (0%)	3 (100%)	0.42
AML-MRC ^a (n = 28)	4 (14%)	24 (86%)	0.60
AML with recurrent genetic abnormalities (n = 5)	0 (0%)	5 (100%)	0.29
AML NOS (n = 15)	4 (27%)	11 (73%)	0.18
MPAL ^b (n = 6)	1 (17%)	5 (83%)	0.94
Other ^c (n = 2)	1 (50%)	1 (50%)	0.44

Abbreviations: AML, acute myeloid leukemia; AML-MRC, acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes; AML NOS, acute myeloid leukemia not otherwise specified; MPAL, mixed phenotype acute leukemia; RH, residual hematopoiesis. ^aDefined by multilineage dysplasia by morphology and/or MDS-associated cytogenetic alterations. ^bThree cases were further classified as mixed phenotype B/myeloid acute leukemia NOS and the other three as mixed phenotype T/myeloid acute leukemia NOS. ^cTwo cases of myeloid proliferation related to Down syndrome.

Table 4. Frequency of immunophenotypic alterations on different bone marrow hematopoietic cell populations from patients with newly diagnosed AML and MPAL grouped according to the clonal nature of residual mature/maturing neutrophils, monocytes and NRBC

Cell subpopulation	Cases with non-clonal RH		Cases with clonal RH	
	No. of altered cases (%)	No. of phenotypic alterations	No. of altered cases (%)	No. of phenotypic alterations
Monocytes	3/10 (30%)	1.0 ± 1.2	35/42 (83%)*	2.5 ± 1.3**
Maturing neutrophils	5/10 (50%)	2.0 ± 2.2	47/48 (98%)**	4.2 ± 1.6**
NRBC	1/8 (13%)	0.9 ± 1.2	26/37 (71%***)	1.7 ± 0.6**
Total	5/10 (50%)	3.7 ± 4.2	47/48 ^a (98%)**	6.9 ± 3.0**

Abbreviations: AML, acute myeloid leukemia; MPAL, mixed phenotype acute leukemia; NRBC, nucleated red blood cells; RH, residual hematopoiesis. **P* = 0.003, ***P* < 0.001 and ****P* = 0.01 vs non-clonal cases. ^aOne case could not be properly evaluated due to inadequate sample conditions for flow cytometry immunophenotypic assessment of residual BM cell populations.

P < 0.001), monocytic cells (83% vs 30%; *P* = 0.003) and NRBC (71% vs 13%; *P* = 0.01) (Table 4). In addition, for each of these three cell populations, cases with clonal residual hematopoiesis also showed a higher mean number of phenotypic alterations/case (6.9 ± 3.0 vs 3.7 ± 4.2, *P* < 0.001) as well as greater number of altered cell populations/case (2.4 ± 0.8 vs 1 ± 1.2, *P* < 0.03), than the other cases (Tables 4 and 5).

DISCUSSION

AML is a poor-prognosis but still highly heterogeneous disease in adults, which significantly reduces overall patient survival rates.^{23,24} For decades, it is well established that AML may emerge *de novo* (*de novo* AML) or following other hematopoietic malignancies as well as cytotoxic therapy for other disorders (secondary AML), the latter two groups being associated with a

Table 5. Frequency of immunophenotypic alterations detected by multiparameter flow cytometry on different populations of hematopoietic cells from adult patients with newly diagnosed AML and MPAL classified according to the clonal vs non-clonal nature of residual mature/maturing granulomonocytic and/or NRBC

No. of cell populations with an altered phenotype	Newly diagnosed AML and MPAL		P-value
	Cases with non-clonal RH n = 10	Cases with clonal RH n = 48 ^a	
0	5/10 (50%)	1/48 (2%)	< 0.001
1	2/10 (20%)	5/48 (10%)	0.60
≥ 2	3/10 (30%)	42/48 (88%)	0.02
Mean (± one s.d.)	1 ± 1.2	2.4 ± 0.8	0.03

Abbreviations: AML, acute myeloid leukemia; MPAL, mixed phenotype acute leukemia; RH, residual hematopoiesis. ^aOne case could not be properly evaluated due to inadequate sample conditions for flow cytometry immunophenotyping.

particularly unfavorable patient outcome.^{2-4,25} Because of this, the distinction between primary *de novo* and secondary AML represents a major goal in the classification of the disease.²⁶⁻²⁹ Differential diagnosis criteria for primary vs secondary AML have been traditionally based on the existence of another previously well-documented myeloid stem cell disorder (for example, MDS or MPN) and/or concurrence of prior administration of leukemogenic cytotoxic therapies (associated or not with specific genetic alterations).^{4,30-36} More recently, the WHO defined a new subgroup of AML cases, which have specific myelodysplasia-related cytogenetic alterations and/or exhibit morphological dysplasia in ≥ 50% of the cells from ≥ 2 myeloid lineages.¹ Such AML with MRC cases, also show a worse prognosis vs other *de novo* AML cases.^{5,23,32,37-39} Even though, within those *de novo* AML patients who do not meet the criteria for AML-MRC, still a relatively significant proportion of cases show dysplastic features that are highly suspicious of an underlying clonal hematopoiesis.⁴⁰ Despite this, to the best of our knowledge, no study has been reported so far in which the clonal vs reactive nature of residual mature/maturing BM hematopoietic cells has been systematically investigated in AML.

Here, we investigated the presence of markers of clonality in residual mature/maturing hematopoietic BM cells from a series of 59 newly diagnosed adult AML and MPAL cases. Overall, our results suggest that the great majority of newly diagnosed AML cases display an underlying clonal hematopoiesis as defined by the presence of specific cytogenetic alterations and/or a clonal pattern of inactivation of chromosome X in residual BM mature/maturing neutrophils, monocytes and/or NRBC. Interestingly, the frequency of AML cases with clonal residual hematopoiesis was invariably high among the different WHO diagnostic subtypes of the disease. Although a relatively limited number of cases were included within each specific WHO diagnostic category of AML, overall our results showed that the great majority of the *de novo* AML cases, including *de novo* AML with MRC and AML with CBF-associated recurrent genetic alterations, carry an underlying clonal hematopoiesis. Similarly, the majority of cases with AML NOS also showed blast cells coexisting with clonal residual mature/maturing hematopoietic cells in the absence of myelodysplasia-related changes, suggesting that by adding more AML NOS cases, significant differences will potentially be detected. Of note, the frequency of AML cases showing underlying clonal hematopoiesis within these specific subgroups of *de novo* AML was also similar to that of therapy-related AML and MPAL cases.

Altogether, these results suggest that except for a limited number of patients, most newly diagnosed adult AML and MPAL cases develop over a pre-existing clonal hematopoiesis. The demonstration that all AML and MPAL cases carrying recurrent genetic abnormalities in their blasts—for example, $t(8;21)$,^{41–43} $inv(16)$,^{44–46} *BCR/ABL* gene rearrangements,^{47–49} *KIT* mutation⁵⁰—shared these same alterations in their residual mature/maturing myeloid hematopoietic cell compartments, suggests that such alterations potentially occur in hematopoietic (myeloid) stem cells capable of multilineage differentiation at least among the cases here analyzed, in line with previous observations in some AML and MPAL,^{23,25,32,51–53} and also in systemic mastocytosis patients who progress to AML.⁵³ At the same time, these observations also indicate that such alterations would not be sufficient for transformation to acute leukemia, other genetic hits being potentially required in this process. In line with this hypothesis, previous studies have shown that most genetic alterations here investigated are also found in maturing myeloid cells from MDS and MPN patients.^{18,23,25,30,32,52,54–60} Of note, we investigated the presence of *KIT* mutations in all sorted bone marrow cell compartments of three patients who were suspected of having a coexisting systemic mastocytosis; for this purpose, we used a DNA-based, low-sensitive technique that allowed us to rule out contamination by other *KIT*-mutated cell populations. Usage of similar approaches in future studies for the evaluation of other AML-associated mutations (for example, *FLT3* and *NPM1*) may further contribute to increase the frequency of clonal markers in AML blasts, particularly among males with no other markers of clonality.

Despite all the above, it should be noted that the presence of an underlying clonal hematopoiesis in adults with newly diagnosed AML and MPAL, appears to be independent of the specific diagnostic subtype of the disease or the presence of myelodysplasia-related changes. However, we should be cautious in deriving such a conclusion, as the specific markers for clonality used here might have not been informative in specific cases. As an example, all female cases diagnosed with AML with MRC showed an underlying clonal hematopoiesis, whereas this was not detected in 3/14 male patients. These results may indicate that only the cytogenetic alterations present in the blast cells of the three male patients with AML with MRC might not represent a primary but a secondary cytogenetic event, restricted to the blast cell population, while the primary cytogenetic/molecular event might have gone undetected with the set of probes used. In line with this latter hypothesis, all three male AML with MRC patients who showed no clonal residual hematopoiesis on cytogenetic grounds carried multilineage morphological dysplasia, which is highly suggestive of an underlying clonal hematopoiesis.

Based on all the above, new sensitive markers for clonality directed either at the detection of primary genetic events or their consequences on the phenotypic and/or morphological appearance of the cells are needed. In this regard, multiparameter flow cytometry immunophenotyping has emerged as an attractive approach, as the presence of multiple phenotypic alterations in different compartments of BM cells have been recurrently reported in MDS.^{9,10,19–22,40} Interestingly, our results also showed that newly diagnosed AML and MPAL patients who showed clonal hematopoiesis on molecular/cytogenetic grounds, more frequently displayed aberrant patterns of protein expression by FCM together with a greater number of aberrant phenotypes on the different populations of residual mature/maturing BM hematopoietic cells analyzed vs all other cases. However, aberrant phenotypes were also detected at lower frequencies among the latter cases. These results may suggest that in such cases, the markers used to assess clonality could be not sensitive enough (for example, assessment of clonality by the HUMARA test requires that clonally related cells represent $\geq 70\%$ of the cells investigated⁸); at the same time, they point out the potential

utility of FCM immunophenotyping, in addition to conventional cytomorphology, for the identification of MRC in the BM of newly diagnosed AML and MPAL cases presenting as *de novo* cases.^{9,20} Of note, three of our AML cases—two males and one female—in whom clonal hematopoiesis could not be demonstrated by FISH and/or HUMARA, showed aberrant phenotypes in all residual hematopoietic lineages investigated (neutrophils, monocytes and NRBC); interestingly, all these three cases were classified as AML–MRC based on cytomorphology. Taken together, these results would support the notion that FCM could contribute to increase the sensitivity of conventional cytomorphology in those cases where mild or no dysplastic features are seen in residual mature/maturing BM cells, or where they are present at relatively low frequencies among a major population of AML blasts, hampering adequate morphological assessment. Further prospective studies are required in this regard to demonstrate the combined utility of FCM and cytomorphology for the identification of AML with MRC.

In summary, our results indicate that the vast majority of adults with newly diagnosed AML and MPAL displays an underlying clonal hematopoiesis, residual mature/maturing granulomonocytic and/or erythroid cells displaying chromosomal alterations, which are frequently shared by the blast cells, in addition to multiple aberrant phenotypes; noteworthy, this appears to involve most WHO 2008 diagnostic subtypes of AML and also MPAL. Whether the presence vs absence of clonal residual hematopoiesis contributes to a better prognostic stratification of newly diagnosed adult AML and MPAL patients deserves further investigations.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) of the Ministerio de Economía y Competitividad, Madrid, Spain (RETICS RD12/0036/0048-FEDER); Junta de Castilla y León (Ayuda al Grupo GR37 de Excelencia de Castilla y León). CFG was supported by a grant from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) of the Ministerio de Economía y Competitividad, Madrid, Spain (PI08/90881). MCS-S was supported by a grant from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -CAPES (1386/06-9) do Ministério de Educação do Brasil.

REFERENCES

- Arber DA, Brunning RD, Vardiman JW, Le Beau MM, Orazi A, Bain BJ *et al*. Acute myeloid leukaemia and related precursor neoplasms. In: Swerdlow SH *et al*. (eds) *WHO Classification of Tumours and Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC: Lyon, 2008, pp 106–145.
- Mrozek K, Bloomfield CD. Chromosome aberrations, gene mutations and expression changes, and prognosis in adult acute myeloid leukemia. *ASH Education Book* 2006; **2006**: 167–177.
- Mrozek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman SP, Bloomfield CD. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood* 2007; **109**: 431–448.
- Larson RA. Is secondary leukemia an independent poor prognostic factor in acute myeloid leukemia? *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; **20**: 29–37.
- Arber DA, Stein AS, Carter NH, Ikle D, Forman SJ, Slovak ML. Prognostic impact of acute myeloid leukemia classification. Importance of detection of recurring cytogenetic abnormalities and multilineage dysplasia on survival. *Am J Clin Pathol* 2003; **119**: 672–680.
- Mrozek K, Dohner H, Bloomfield CD. Influence of new molecular prognostic markers in patients with karyotypically normal acute myeloid leukemia: recent advances. *Curr Opin Hematol* 2007; **14**: 106–114.
- Radmacher MD, Marcucci G, Ruppert AS, Mrozek K, Whitman SP, Vardiman JW *et al*. Independent confirmation of a prognostic gene-expression signature in adult acute myeloid leukemia with a normal karyotype: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood* 2006; **108**: 1677–1683.
- Kopp P, Jaggi R, Tobler A, Borisch B, Oestreicher M, Sabacan L *et al*. Clonal X-inactivation analysis of human tumours using the human androgen receptor gene (HUMARA) polymorphism: a non-radioactive and semiquantitative strategy applicable to fresh and archival tissue. *Mol Cell Probes* 1997; **11**: 217–228.
- Matarraz S, Lopez A, Barrena S, Fernandez C, Jensen E, Flores J *et al*. The immunophenotype of different immature, myeloid and B-cell lineage-committed

- CD34+ hematopoietic cells allows discrimination between normal/reactive and myelodysplastic syndrome precursors. *Leukemia* 2008; **22**: 1175–1183.
- 10 Matarraz S, Lopez A, Barrena S, Fernandez C, Jensen E, Flores-Montero J et al. Bone marrow cells from myelodysplastic syndromes show altered immunophenotypic profiles that may contribute to the diagnosis and prognostic stratification of the disease: a pilot study on a series of 56 patients. *Cytometry B Clin Cytom* 2010; **78**: 154–168.
- 11 Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VH, Martin-Ayuso M, Bottcher S, Ritgen M et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia* 2012; **26**: 1986–2010.
- 12 van Dongen JJ, Lhermitte L, Bottcher S, Almeida J, van der Velden VH, Flores-Montero J et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* 2012; **26**: 1908–1975.
- 13 Rasillo A, Taberero MD, Sanchez ML, Perez de Andres M, Martin Ayuso M, Hernandez J et al. Fluorescence in situ hybridization analysis of aneuploidization patterns in monoclonal gammopathy of undetermined significance versus multiple myeloma and plasma cell leukemia. *Cancer* 2003; **97**: 601–609.
- 14 Gale RE, Mein CA, Linch DC. Quantification of X-chromosome inactivation patterns in haematological samples using the DNA PCR-based HUMARA assay. *Leukemia* 1996; **10**: 362–367.
- 15 Nakahara Y, Suzuki H, Ohashi H, Hatano S, Tomita A, Kinoshita T et al. Clonality analysis of granulocytes and T lymphocytes in healthy females by the PCR-based HUMARA method. *Int J Hematol* 1999; **69**: 237–243.
- 16 Uchida T, Ohashi H, Aoki E, Nakahara Y, Hotta T, Murate T et al. Clonality analysis by methylation-specific PCR for the human androgen-receptor gene (HUMARA-MSP). *Leukemia* 2000; **14**: 207–212.
- 17 Sotlar K, Escribano L, Landt O, Mohrle S, Herrero S, Torrello A et al. One-step detection of c-kit point mutations using peptide nucleic acid-mediated polymerase chain reaction clamping and hybridization probes. *Am J Pathol* 2003; **162**: 737–746.
- 18 Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sanchez ML, Nunez R, Prados A et al. KIT mutation in mast cells and other bone marrow hematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood* 2006; **108**: 2366–2372.
- 19 Westers TM, Ireland R, Kern W, Alhan C, Balleisen JS, Bettelheim P et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: a report from an international consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leukemia* 2012; **26**: 1730–1741.
- 20 Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* 2008; **111**: 3941–3967.
- 21 Della Porta MG, Picone C, Pascutto C, Malcovati L, Tamura H, Handa H et al. Multicenter validation of a reproducible flow cytometric score for the diagnosis of low-grade myelodysplastic syndromes: results of a European LeukemiaNET study. *Haematologica* 2012; **97**: 1209–1217.
- 22 van de Loosdrecht AA, Ireland R, Kern W, Della Porta MG, Alhan C, Balleisen JS et al. Rationale for the clinical application of flow cytometry in patients with myelodysplastic syndromes: position paper of an International Consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leuk Lymphoma* 2012; **54**: 472–475.
- 23 Gahn B, Haase D, Unterhalt M, Drescher M, Schoch C, Fonatsch C et al. De novo AML with dysplastic hematopoiesis: cytogenetic and prognostic significance. *Leukemia* 1996; **10**: 946–951.
- 24 Lowenberg B. Diagnosis and prognosis in acute myeloid leukemia—the art of distinction. *N Engl J Med* 2008; **358**: 1960–1962.
- 25 Baldus CD, Mrozek K, Marcucci G, Bloomfield CD. Clinical outcome of de novo acute myeloid leukaemia patients with normal cytogenetics is affected by molecular genetic alterations: a concise review. *Br J Haematol* 2007; **137**: 387–400.
- 26 Ohyashiki JH, Ohyashiki K, Kawakubo K, Fujimura T, Shimamoto T, Nakazawa S et al. Comparison between immunogenotypic findings in de novo AML and AML post MDS. *Leukemia* 1993; **7**: 1747–1751.
- 27 Pagano L, Mele L, Fianchi L, Rutella S, Piscitelli R, Leone G et al. Immunophenotypic analysis in 119 patients with acute myeloid leukemia following a previous malignancy: a comparison with the immunophenotype of 231 de novo AML. *Haematologica* 2003; **88**: 225–227.
- 28 Ostgard LS, Kjeldsen E, Holm MS, Brown Pde N, Pedersen BB, Bendix K et al. Reasons for treating secondary AML as de novo AML. *Eur J Haematol* 2010; **85**: 217–226.
- 29 Preiss BS, Bergmann OJ, Friis LS, Sorensen AG, Frederiksen M, Gadeberg OV et al. Cytogenetic findings in adult secondary acute myeloid leukemia (AML): frequency of favorable and adverse chromosomal aberrations do not differ from adult de novo AML. *Cancer Genet Cytogenet* 2010; **202**: 108–122.
- 30 Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999; **341**: 1051–1062.
- 31 Tefferi A, Thiele J, Vardiman JW. The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms: order out of chaos. *Cancer* 2009; **115**: 3842–3847.
- 32 Milosevic JD, Puda A, Malcovati L, Berg T, Hofbauer M, Stukalov A et al. Clinical significance of genetic aberrations in secondary acute myeloid leukemia. *Am J Hematol* 2012; **87**: 1010–1016.
- 33 Estey E, Dohner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet* 2006; **368**: 1894–1907.
- 34 Arber DA, Slovak ML, Popplewell L, Bedell V, Ikle D, Rowley JD. Therapy-related acute myeloid leukemia/myelodysplasia with balanced 21q22 translocations. *Am J Clin Pathol* 2002; **117**: 306–313.
- 35 Mauritzson N, Albin M, Rylander L, Billstrom R, Ahlgren T, Mikoczy Z et al. Pooled analysis of clinical and cytogenetic features in treatment-related and de novo adult acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes based on a consecutive series of 761 patients analyzed 1976–1993 and on 5098 unselected cases reported in the literature 1974–2001. *Leukemia* 2002; **16**: 2366–2378.
- 36 Leone G, Mele L, Pulsoni A, Equitani F, Pagano L. The incidence of secondary leukemias. *Haematologica* 1999; **84**: 937–945.
- 37 Leith CP, Kopecky KJ, Godwin J, McConnell T, Slovak ML, Chen IM et al. Acute myeloid leukemia in the elderly: assessment of multidrug resistance (MDR1) and cytogenetics distinguishes biologic subgroups with remarkably distinct responses to standard chemotherapy. A Southwest Oncology Group study. *Blood* 1997; **89**: 3323–3329.
- 38 Miyazaki Y, Kuriyama K, Miyawaki S, Ohtake S, Sakamaki H, Matsuo T et al. Cytogenetic heterogeneity of acute myeloid leukaemia (AML) with trilineage dysplasia: Japan Adult Leukaemia Study Group-AML 92 study. *Br J Haematol* 2003; **120**: 56–62.
- 39 Yanada M, Suzuki M, Kawashima K, Kiyoi H, Kinoshita T, Emi N et al. Long-term outcomes for unselected patients with acute myeloid leukemia categorized according to the World Health Organization classification: a single-center experience. *Eur J Haematol* 2005; **74**: 418–423.
- 40 Miesner M, Haferlach C, Bacher U, Weiss T, Maciejewski K, Kohlmann A et al. Multilineage dysplasia (MLD) in acute myeloid leukemia (AML) correlates with MDS-related cytogenetic abnormalities and a prior history of MDS or MDS/MPN but has no independent prognostic relevance: a comparison of 408 cases classified as "AML not otherwise specified" (AML-NOS) or "AML with myelodysplasia-related changes" (AML-MRC). *Blood* 2010; **116**: 2742–2751.
- 41 Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 1998; **92**: 2322–2333.
- 42 Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* 2002; **100**: 4325–4336.
- 43 Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* 2010; **116**: 354–365.
- 44 Marlton P, Keating M, Kantarjian H, Pierce S, O'Brien S, Freireich EJ et al. Cytogenetic and clinical correlates in AML patients with abnormalities of chromosome 16. *Leukemia* 1995; **9**: 965–971.
- 45 Claxton DF, Marlton P, Siciliano MJ. Molecular genetics of inversion 16 leukemia: implications for leukemogenesis. *Cancer Treat Res* 1996; **84**: 1–18.
- 46 Speck NA, Gilliland DG. Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**: 502–513.
- 47 Chen Z, Morgan R, Berger CS, Pearce-Birge L, Stone JF, Sandberg AA. Identification of masked and variant Ph (complex type) translocations in CML and classic Ph in AML and ALL by fluorescence in situ hybridization with the use of bcr/abl cosmid probes. *Cancer Genet Cytogenet* 1993; **70**: 103–107.
- 48 Hamaguchi H, Suzukawa K, Nagata K, Yamamoto K, Yagasaki F, Morishita K. Establishment of a novel human myeloid leukaemia cell line (HNT-34) with t(3;3)(q21;q26), t(9;22)(q34;q11) and the expression of EVI1 gene, P210 and P190 BCR/ABL chimaeric transcripts from a patient with AML after MDS with 3q21q26 syndrome. *Br J Haematol* 1997; **98**: 399–407.
- 49 Tefferi A, Vardiman JW. The diagnostic interface between histology and molecular tests in myeloproliferative disorders. *Curr Opin Hematol* 2007; **14**: 115–122.
- 50 Yang Y, Huang Q, Lu Y, Li X, Huang S. Reactivating PP2A by FTY720 as a novel therapy for AML with C-KIT tyrosine kinase domain mutation. *J Cell Biochem* 2012; **113**: 1314–1322.
- 51 Appelbaum FR, Kopecky KJ, Tallman MS, Slovak ML, Gundacker HM, Kim HT et al. The clinical spectrum of adult acute myeloid leukaemia associated with core binding factor translocations. *Br J Haematol* 2006; **135**: 165–173.

- 52 Walter MJ, Shen D, Ding L, Shao J, Koboldt DC, Chen K *et al*. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2012; **366**: 1090–1098.
- 53 Mrozek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev* 2004; **18**: 115–136.
- 54 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**: 2079–2088.
- 55 Bernell P, Arvidsson I, Hast R, Jacobsson B, Stenke L. Differences in cell lineage involvement between MDS-AML and de novo AML studied by fluorescence in situ hybridization in combination with morphology. *Eur J Haematol* 1997; **58**: 241–245.
- 56 Preisler HD. Evolution of secondary hematologic disorders: preMDS→MDS→sAML. *Cancer Treat Res* 2001; **108**: 185–230.
- 57 Kelly L, Clark J, Gilliland DG. Comprehensive genotypic analysis of leukemia: clinical and therapeutic implications. *Curr Opin Oncol* 2002; **14**: 10–18.
- 58 Kelly LM, Gilliland DG. Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2002; **3**: 179–198.
- 59 Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A *et al*. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009; **114**: 937–951.
- 60 Dicker F, Haferlach C, Sundermann J, Wendland N, Weiss T, Kern W *et al*. Mutation analysis for RUNX1, MLL-PTD, FLT3-ITD, NPM1 and NRAS in 269 patients with MDS or secondary AML. *Leukemia* 2010; **24**: 1528–1532.

Supplementary Information accompanies this paper on the Leukemia website (<http://www.nature.com/leu>)

ARTÍCULO 4:

“Impacto clínico de los perfiles oncogénicos presentes en mastocitosis sistémica asociada a otra hemopatía clonal.”

Objetivos. En algunos pacientes que presentan mastocitosis sistémica asociada a otra hemopatía (MS–AHNMD), ambos componentes de la enfermedad (MS y AHNMD) pueden albergar la mutación de *KIT*, lo cual sugiere la posible implicación de una célula *stem* totipotencial común, en el origen de las dos enfermedades. Por el contrario, en otros casos, la mutación de *KIT* está restringida al compartimento mastocitario. Estos hallazgos sugieren la posible existencia de distintas vías etiopatogénicas de la enfermedad, cuyo conocimiento podría contribuir a explicar la gran heterogeneidad en el comportamiento clínico de este grupo de pacientes. El presente trabajo ha tenido como objetivo identificar y definir las vías de evolución clonal asociadas al desarrollo de MS–AHNMD, según la secuencia (hipotética) de adquisición de alteraciones genéticas observada en cada paciente; como objetivo secundario, nos propusimos determinar la posible asociación entre las distintas vías de evolución clonal identificadas y las características clínicas y biológicas de la enfermedad.

Materiales y métodos. En total se analizaron 65 muestras de MO de pacientes con MS–AHNMD. Para la caracterización fenotípica y la separación física (pureza $\geq 97\%$) de los distintos compartimentos de células de línea de granulocito neutrófilo y monocito, de la serie eritroide y los linfocitos maduros de MO, además de las células patológicas correspondientes a la MS y a la AHNMD, empleamos técnicas de citometría de flujo multiparamétrica, basadas en combinaciones de 4 (n=30) y 8 colores (n=35). Sobre las poblaciones celulares purificadas mediante citometría de flujo, se realizaron estudios de FISH, análisis moleculares del patrón de inactivación del cromosoma X (test de HUMARA) y/o análisis de la mutación D816V de *KIT*.

Resultados. En términos generales, los pacientes con MS–AHNMD mostraron tres patrones oncogénicos distintos en los que: i) los dos componentes de células tumorales de MO (MS y AHNMD) mostraban alteraciones genéticas/moleculares independientes, ii) ambos componentes de células tumorales de MO compartían la mutación de D816V de *KIT* y, iii) ambos componentes de células tumorales de MO compartían alteraciones genéticas asociadas a la AHNMD, independientemente de la presencia o ausencia

de la mutación de *KIT* en este último grupo de células. Desde el punto de vista pronóstico, los pacientes con MS-AHNMD cuyos compartimientos de células tumorales de MO (MS y AHNMD) mostraban alteraciones genéticas independientes (i.e. no relacionadas), presentaron un mejor pronóstico (respecto al de pacientes con MS-AHNMD cuyas células tumorales de MO compartían alguna alteración genética/molecular), tanto en lo que a supervivencia global como a supervivencia libre de enfermedad se refiere. Así, el análisis univariante puso de manifiesto que el subtipo de AHNMD, el tipo de mastocitosis sistémica (MSI vs MSA) y el grado de afectación por la mutación de *KIT* de las distintas poblaciones de células hematopoyéticas de MO (mastocito; mastocito + otras células mieloides, y; mastocito + células mieloides + células linfoides) eran las tres variables con mayor impacto sobre la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad de los pacientes. A su vez, el análisis multivariante mostró que el tipo de enfermedad asociada (LMA vs. otras), seguida del grado de afectación multilineal de la hematopoyesis por la mutación de *KIT*, constituían los principales factores pronósticos independientes con un impacto adverso sobre la supervivencia global y la supervivencia libre de progresión de los pacientes. Además, merece destacar que entre los pacientes con MS y SMD o SMD/NMP tipo LMMC, la afectación multilineal de la hematopoyesis por la mutación de *KIT* se comportó como el principal factor pronóstico adverso a la hora de predecir la supervivencia global de los pacientes, mientras que el tipo de MS (MSA) mostró ser el factor de riesgo independiente de mayor peso para predecir una supervivencia libre de enfermedad significativamente más corta.

Conclusiones. En resumen, nuestro trabajo pone de manifiesto que los pacientes con MS-AHNMD presentan diferentes patrones genéticos y/o moleculares de evolución clonal, posiblemente relacionados con el momento y la célula en los que aparecen dichas alteraciones. Estos diferentes perfiles oncogénicos parecen contribuir a determinar en gran medida, la evolución clínica y biológica de la enfermedad, confiriendo la coexistencia en ambas poblaciones de células tumorales de MO de la mutación de *KIT* y/o de las alteraciones genéticas y moleculares asociadas a la AHNMD, un peor pronóstico. De esta manera, el estudio simultáneo de los patrones genéticos y moleculares en las distintas poblaciones de células tumorales de MO (MS y AHNMD) podría contribuir a un abordaje terapéutico más personalizado de este grupo heterogéneo de pacientes.

TITLE:

Clinical impact of oncogenetic profiles in Systemic mastocytosis with an associated hematological non-mast cell disease.

RUNNING TITLE: *KIT* mutation and AHNMD-associated genetic alterations in SM-AHNMD patients

AUTHORS:

Carlos Fernández Giménez MD^{1*}

Cristina Teodosio PhD^{3*}

Sergio Matarraz PhD¹

Antonio López MSc¹

María Jara-Acevedo PhD¹⁻²

Andrea Mayado PhD¹⁻²

Ivan Álvarez-Twose MD⁴

Laura Sánchez-Muñoz MD, PhD⁴

Andrés García-Montero PhD¹

Carolina Caldas MSc¹⁻²

María Laura Gutierrez PhD¹

Paloma Bárcena MSc¹

Marina Díaz-Beyá MD, PhD^{5,6,7}

Jordi Esteve MD, PhD^{5,6,7}

Lourdes Florensa MD, PhD⁸

Enrique Colado MD, PhD⁹

Álvaro Lorenzo MSc¹⁰

Mar Luis MSc¹¹

Leonor Senent MD¹²

Nerea Uresandi MD¹³

Carlos Salvador Osuna MD, PhD¹⁴

Matxalen Olivares MD¹⁵

José Mario Morgado MSc⁴

Luis Escribano MD, PhD⁴

Alberto Orfao MD, PhD¹

INSTITUTIONS:

¹Servicio General de Citometría (NUCLEUS), Centro de Investigación del Cáncer – Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC-CSIC/USAL) and Instituto Biosanitario de Salamanca (IBSAL) - and Departamento de Medicina, University of Salamanca, Spain; ²Servicio de Secuenciación de ADN, Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC-CSIC/USAL and IBSAL) and Departamento de Medicina, University of Salamanca, Spain; ³Department of Immunohematology and Blood Transfusion, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands; ⁴Instituto de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha, Hospital Virgen del Valle, Toledo, Spain; ⁵Josep Carreras Leukemia Research Institute, Campus Clínic-University of Barcelona, Spain. ⁶Department of Hematology, Hospital Clínic, Barcelona, Spain. ⁷Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona, Spain. ⁸Laboratori de Citologia Hematològica. Servei de Patologia, H. del Mar. Barcelona; ⁹Department of Hematology Hospital Universitario Central de Asturias. Spain; ¹⁰Servicio de Hematología Hospital Lucus Augusti, Lugo, Spain ¹¹Department of Hematology, Hospital Arnau de Vilanova, Valencia, Spain, ¹²Department of Hematology, Hospital Universitari i Politècnic la Fe, Valencia, Spain, ¹³Department of Hematology, Hospital de Donostia, Guipuzkoa, Spain, ¹⁴Department of Hematology, Hospital Miguel Servet, Zaragoza, Spain, ¹⁵Department of Hematology, Hospital de Galdakao, Guipuzkoa, Spain * These authors have equally contributed to this work.

CORRESPONDING AUTHOR:

Professor Alberto Orfao MD, PhD. Centro de Investigación del Cáncer, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain. Phone: +34 923 29 48 11. Fax: +34 923 29 47 95. e-mail: orfao@usal.es

TOTAL TEXT WORD COUNT: 3838

ABSTRACT WORD COUNT: 248

NUMBER OF FIGURES: 2

NUMBER OF TABLES: 3

NUMBER OF SUPPLEMENTARY TABLES: 1

REFERENCE COUNT: 59

SCIENTIFIC HEADING: Myeloid Neoplasia

ABSTRACT

In a substantial fraction of systemic mastocytosis (SM) patients, SM coexists with an associated clonal hematological non-mast cell (MC) lineage disease (AHNMD). Most SM-AHNMD patients carry *KIT* mutations and AHNMD-associated genetic alterations; however, there is limited information about the frequency and clinical impact of the coexistence of both types of genetic/molecular alterations in distinct bone marrow (BM) cell compartments. Here we studied 65 SM-AHNMD patients grouped into SM-AHNMD cases with: i) unrelated genetic alterations; ii) shared *KIT* mutation in BM MC and AHNMD tumor cells, in the absence of AHNMD-associated genetic alterations in BM MC, and; iii) shared AHNMD-associated genetic alterations. Overall, patients with shared AHNMD-associated genetic alterations showed a significantly poorer progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) vs. the other two groups ($p < 0.01$). In addition, the pattern of involvement of BM cell compartments other than MC by the *KIT* mutation and the subtypes of SM and AHNMD, were also relevant prognostic factors in the univariate analysis ($p < 0.01$). Multivariate analysis confirmed that the best combination of independent prognostic factors for OS and PFS were the pattern of involvement of BM cells by the *KIT* mutation ($p < 0.001$ and $p < 0.01$, respectively) and the oncogenetic subgroup of AHNMD ($p = 0.02$ and $p < 0.01$, respectively) together or not with the type of AHNMD (HR, 27.9; $p < 0.001$), respectively. Thus, in SM-AHNMD patients, the pattern of involvement of SM and AHNMD tumor cell compartments by the *KIT* mutation and AHNMD-associated genetic alterations adds prognostic information to that of specific diagnostic subtypes of SM and AHNMD.

KEY POINTS

1. SM-AHNMD patients show different oncogenetic profiles with an impact on disease outcome.
2. Coexistence of the *KIT* mutation and AHNMD-associated genetic markers in BM MC and AHNMD cells is an adverse prognostic factor in SM-AHNMD.

INTRODUCTION

Systemic mastocytosis (SM) comprises a heterogeneous group of diseases characterized by an abnormal accumulation of clonal mast cells (MC) in one or more tissues.^{1,3} According to their clinical, histopathological and biological features, seven different diagnostic subtypes of SM are currently recognized by the World Health Organization (WHO), including mild and poor-prognosis variants of the disease ^{1,2}. Among the later cases, SM with an associated clonal hematological non-MC lineage disease (SM-AHNMD) remains a particularly heterogeneous subgroup which most frequently consists of indolent (ISM) or aggressive SM (ASM) associated with a (coexisting) malignant myeloid disease –e.g. acute myeloid leukemia (AML) and chronic myelomonocytic leukemia (CMML) ^{2,4,5}-. However, in a significant proportion of SM-AHNMD cases, SM also coexists with a lymphoid and/or plasma cell neoplasm ⁶⁻¹¹. The specific subtypes of SM and AHNMD coexisting in individual patients are currently considered as the most relevant prognostic factors.^{12,13}

Similarly to other diagnostic subtypes of SM, most (>90%) SM-AHNMD patients carry the D816V activating *KIT* mutation¹⁴⁻¹⁶. Despite this, previous observations indicate that ¹⁷⁻¹⁹ while in some SM-AHNMD patients the *KIT* mutation and/or other coexisting genetic alterations are present in both the SM and AHNMD cell compartments due to the potential involvement of a common stem cell, in other cases the *KIT* mutation is restricted to the MC; these findings point out the potential existence of distinct underlying molecular pathways for the two coexisting diseases ^{19,20} which might also potentially contribute to explain the heterogeneous clinical behavior of SM-AHNMD, even when considering cases presenting with the same subtypes of SM and AHNMD^{17,21-23}. The clonal relationship between the SM and AHNMD cell compartments has been previously investigated in a limited number of studies including single case reports and a few SM-AHNMD patients series ^{18,24-28}; however, the clinical impact of the distinct ontogenetic pathways leading to the development of both diseases, in addition to their specific subtypes, still remains to be investigated ^{14,28-30}.

Here, we report on the clinic-biological, immunophenotypic, genetic and prognostic features of 65 SM-AHNMD patients classified into three different ontogenetic groups based on the pattern of

involvement of BM MC, AHNMD tumor cells and other residual BM cells, by both the *KIT* mutation and AHNMD-associated cytogenetic/molecular alterations. To our knowledge, this is the largest series in which the clinical, histopathological and prognostic features of the disease are described for SM-AHNMD patients carrying distinct oncogenetic profiles.

MATERIALS AND METHODS

Patients and samples. Overall, 65 patients (40 males and 25 females; median age of 63 years, ranging from 10 to 87 years) with newly-diagnosed SM-AHNMD, were studied. SM and AHNMD were diagnosed and classified according to the WHO2008 criteria [31](#) (Table 1). For each patient, EDTA-anticoagulated BM samples were collected at diagnosis, after informed consent was given by the patient; the study was approved by the local Ethics Committee of the two REMA (Spanish Network on Mastocytosis) centers: Instituto de Estudios de Mastocytosis de Castilla-La Mancha (Toledo, Spain) and Cancer Research Center (University of Salamanca, Salamanca, Spain). Disease progression was defined as progression of SM and/or AHNMD to more advanced forms of either one or the two diseases, based on well-established criteria [32-40](#). At the moment of closing this study, median follow-up was of 25 months (range: 1-217 months) and 54% of patients remained alive.

Cell Purification. Purification of specific BM cell populations was performed using a FACSAria flow cytometer (BD). Prior to sorting, cells were stained with ≥ 4 -color combinations of fluorochrome-conjugated MAb aimed at specific and simultaneous identification of the different cell populations of interest in the sample -e.g. blast/tumor (i.e. AHNMD) cells, maturing neutrophils, monocytic cells, nucleated red blood cells (NRBC) and mature lymphocytes-, as previously described in detail [41,42](#). The purity achieved for the different FACS-sorted cell populations was systematically $>97\%$.

Interphase fluorescence *in situ* hybridization (iFISH) and human androgen receptor assay (HUMARA) studies. iFISH studies aimed at detection of t(9;22), t(8;21), inv(16), 11q abnormalities, -5/del(5q), -7/del(7q), del(20q), trisomy 8, nullosomy Y, trisomy 12, del(17p13.1), del(13q14), t(14q32), t(18q21), t(11;14), t(3q27) and del(6q21) were performed on interphase nuclei from different FACS-purified and methanol/acetic fixed 3/1 (v/v) cell populations. The following panel of Spectrum OrangeTM and Spectrum GreenTM DNA probes (Vysis Inc, Downers Grove, IL) was used: LSI BCR/ABL, LSI AML1/ETO, LSI CBFb dual color breakapart,(DCBA) LSI MLL DCBA, LSI EGR1/D5S23, D5S721, LSI D7S486/CEP7, LSI D20S108, CEP8 (alpha satellite), CEPY (satellite III), CEP12 (alpha satellite), LSI ATM, LSI MLL, LSI P53, LSI 13/RB1, LSI D13S25, LSI IgH DCBA, LSI MALT1 DCBA, LSI

IgH/CCND1, and LSI BCL6 DCBA DNA probes. Additional DNA probes (Kreatech Diagnostics, Amsterdam, The Netherlands) used included the ON 6q21/SE Probe cocktail. Hybridization with fluorochrome-labeled FISH probes was performed as recommended by the manufacturer with slight modifications [43](#). Fluorescence signals were evaluated using an Eclipse Ci fluorescence microscope (Nikon, Tokyo, Japan) and a 100x oil objective, as previously described [43](#).

In order to determine the pattern of inactivation of chromosome X, FACS-purified BM maturing neutrophils, monocytic cells, NRBC, CD34+ hematopoietic precursors (HPC) and mature lymphocytes were analyzed using HUMARA, as previously reported [44](#).

***KIT* mutational analysis.** The *KIT* D816V mutation was assessed in genomic DNA from FACS-purified cell populations, using a previously described polymerase chain reaction and peptide nucleic acid-clamping technique [14,45](#).

Statistical methods. For all continuous variables, median values and range were calculated using the Statistical Package for the Social Sciences Software (SPSS 23.0, IBM, Chicago, IL); for categorical variables, frequencies were used. For categorical and continuous variables, comparisons between two or more groups were made using the chi-square test, and either the Student T (for parametric data) or the Mann-Whitney U and the Kruskal-Wallis tests (for non-parametric data), respectively. Survival curves were plotted according to the method of Kaplan and Meier [46](#) and compared by the (one-side) log-rank test. Based on those variables which had a significant effect on overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) in the univariate analysis, multivariate Cox proportional-hazard models were built using those parameters which showed independent predictive value for OS and PFS, and a forward stepwise approach. P-values <0.05 were considered to be associated with statistical significance.

RESULTS

Diagnostic subgroups of SM-AHNMD. The majority of SM-AHNMD cases (58/65; 89%) had SM associated with one AHNMD; in the other 7 patients (11%) SM was associated with two AHNMD (Table 1). Most cases in the former group (48/65; 74%) had SM plus a myeloid AHNMD (Table 1) consisting of: i) MDS in 25 cases, (38%); ii) AML in 12 (18%), iii) MDS/myeloproliferative neoplasm (MDS/MPN) in 7, (11%) including CMML in 5 (8%), MDS/MPN with eosinophilia (MPNEo) in 1 (2%) and MDS/MPN-unclassifiable (MPN-UC) in the remaining case (2%), and; iv) MPN in 4 cases (6%) -two (3%) polycythaemia vera (PV) patients, one (1%) essential thrombocythemia (ET) and one (2%) hypereosinophilic syndrome (HES)- (Table 1). In turn, lymphoid AHNMD were less frequently observed (17/65 patients; 26%) (Table 1) and included monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) in 7 (11%) patients, multiple myeloma (MM) in 2 (3%), chronic lymphocytic leukemia (CLL) in another 2 (3%) and marginal zone lymphoma (MZL) in 1 patient (2%) (Table 1). In those 7 patients (11%) who presented with two AHNMD neoplasms, these consisted of a myeloid plus a lymphoid AHNMD in 4 cases (6%) -i.e. ET together with MZL, MDS plus MM, CMML with an MGUS and CMML plus MM in one patient each- and of two coexisting lymphoid neoplasms in the other 3 patients (5%) - i.e. CLL plus MZL in 2 cases (3%) and diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) plus large granular T-cell leukemia (T-LGL) in one (2%) - (Table 1). According to the WHO2008 classification, 34 patients (52%) had ISM-AHNMD, 26 (40%) had ASM-AHNMD and 2 (4%) were diagnosed with mast cell leukemia (MCL)-AHNMD. No significant association was found between the subtypes of SM and AHNMD, except for a greater frequency ($p=0.05$) of CMML in ASM vs ISM cases -6/26 (23%) vs 2/34 (6%)- and a higher proportion ($p=0.03$) of lymphoid AHNMD in ISM vs ASM patients -12/34 (35%) vs 3/26 (12%)-

Frequency of *KIT* mutation and AHNMD-associated genetic alterations in different BM cell compartments of SM-AHNMD patients. The *KIT* D816V mutation was present in BM MC from all SM-AHNMD patients; in 28/65 cases (43%) it was restricted to MC, while in 37/65 patients (57%) it was shared by both MC and AHNMD cells (Table 1 and Supplementary Table 1). In addition, AHNMD-associated genetic alterations other than the *KIT* mutation were also detected in 33/65 (51%) SM-AHNMD cases. In a subset of these patients (12/33; 36%), the *KIT* mutation was restricted to BM MC in the absence

(in these cells) of AHNMD-associated genetic alterations; in contrast, in another 12/33 cases (36%) BM MC and AHNMD cells carried one or more AHNMD-associated cytogenetic alterations in common (Supplementary Table 1) together (9/33; 27%) or not (3/33; 9%) with the *KIT* mutation in both cell compartments (Table 2); in the remaining 9 patients (27%) who had AHNMD-associated genetic alterations, both BM MC and non-MC compartments, including AHNMD cells, shared the *KIT* mutation but not the AHNMD-associated alterations (Supplementary Table 1).

In all cases that shared the *KIT* mutation in BM MC and AHNMD tumor cells, this mutation was detected in both BM MC and other myeloid BM cells; additionally, a significant fraction of them - 10/28 cases (36%)- showed also *KIT*-mutated BM lymphoid cells (Tables 1 and 2). Interestingly, purified BM mesenchymal stem cells (MSC) from 5/6 (83%) SM-AHNMD cases investigated, who carried myeloid (n=1) or myeloid plus lymphoid (n=5) involvement by the *KIT* mutation, showed *KIT*-mutated MSC. In turn, all 12 cases that shared AHNMD-associated genetic alterations in BM MC and AHNMD cells (together or not with the *KIT* mutation) showed involvement of myeloid but not lymphoid residual BM cells by such genetic alterations. (Tables 1 and 2 and Supplementary Table 1). Of note, in the majority of these patients (7/12; 58%) the *KIT* mutation was detected in all myeloid and lymphoid BM cell lineages analyzed, while AHNMD-associated genetic alterations were restricted to BM AHNMD and myeloid cells, but absent in lymphoid cells (Table 2), suggesting the *KIT* mutation was an earlier event.

Based on the above patterns of involvement of BM MC, AHNMD tumor cells and other BM myeloid and lymphoid cell compartments by the *KIT* mutation and/or AHNMD-associated genetic alterations, an hypothetical model of clonal evolution was built for each individual patient (Figure 1). Altogether, individual patient models showed that, while there are cases where the *KIT* mutation is restricted to BM MC (28/65; 43%) and patients with AHNMD-associated genetic alterations restricted to BM AHNMD tumor cells (25/65; 39%), in most SM-AHNMD patients either one or the two alterations coexisted in BM MC, AHNMD tumor cells and/or other BM cells (37/65; 57%). In the later cases, the *KIT* mutation almost systematically appears to be the first hit, being positive across most myeloid and lymphoid cell populations analyzed, while AHNMD-associated genetic changes displayed a more restricted pattern of involvement of the different BM myeloid and/or lymphoid compartments (Figure 1 and Table 2).

Oncogenetic subgroups of SM-AHNMD. Depending on whether the *KIT* mutation and/or the AHNMD-associated genetic alterations were shared or not by BM MC and AHNMD tumor cells, SM-AHNMD patients were subclassified into three distinct groups (Table 1): i) SM-AHNMD with unrelated genetic alterations in whom the *KIT* mutation and AHNMD-associated genetic alterations were present in different tumor cell compartments (n=25; 39%); ii) SM-AHNMD which shared the *KIT* mutation (but not AHNMD-associated genetic alterations) in both BM MC and AHNMD cells (n=28; 43%), and; iii): cases who shared AHNMD-associated genetic alterations in BM MC and AHNMD tumor cells, the *KIT* mutation being present (n=7) or absent (n=5) in the later cell population (n=12; 18%).

Overall, SM-AHNMD cases whose BM MC and AHNMD tumor cells shared the *KIT* mutation and/or AHNMD-associated genetic alterations, more frequently showed myeloid AHNMD (31% vs 69%, p=0.04). Interestingly, within these cases the frequency of MDS plus MDS/MPN was also significantly higher (25% vs 75%, p=0.03). In turn, AML was more frequently observed among patients who did not have the *KIT* mutation in AHNMD cells -2/12 (17%) vs 10/12 (83%), (p=0.02)-. By contrast, cases who have no shared genetic alterations between BM MC and AHNMD cells showed predominance of lymphoid AHNMD, in association or not with another myeloid AHNMD (p= 0.03): 10/25 (40%) vs 7/40 (18%) cases, respectively (Table 1).

Clinical and biological features of SM-AHNMD cases grouped according to the pattern of involvement of BM cells by the *KIT* mutation and AHNMD-associated genetic alterations. Overall, SM-AHNMD patients who showed AHNMD-associated genetic alterations in both BM AHNMD cells and MC at diagnosis, had lower age (p=0.03), lower frequency of skin lesions (p=0.03), lower peripheral blood (PB) platelet counts (p=0.05) and higher creatinine serum levels (p<0.01) (Table 3). In contrast, cases who had no genetic alterations in common in BM MC and AHNMD tumor cells had a lower frequency of splenomegaly (p<0.01), a higher percentage of skin lesions (p=0.03) and anaphylaxis (p<0.01), together with lower creatinine (p<0.01) and tryptase serum levels (p=0.03) (Table 3). Cases presenting with the *KIT* mutation in both BM MC and AHNMD cells had intermediate features between the other two groups, more closely resembling those of patients who shared AHNMD-associated genetic alterations (Table 3).

Most interestingly, SM-AHNMD cases who showed no shared genetic alterations between BM MC and AHNMD tumor cells, more frequently had ISM, while ASM was more commonly observed in the other two groups of patients ($p<0.01$) and the two SM-MCL cases had AHNMD-associated genetic alterations also in BM MC (Table 3).

Clinical outcome of SM-AHNMD cases. Overall, PFS and OS progressively decreased from SM-AHNMD patients who did not share any genetic alterations - median PFS and OS: not reached (NR) - to cases that shared the *KIT* mutation (median PFS and OS: 30 and 48 months, respectively) and patients with AHNMD-associated genetic alterations in both BM MC and AHNMD cells (median PFS and OS: 6 and 11 months, respectively) ($p<0.01$) (Table 4 and Figure 2). Of note, differences in PFS and OS rates were maintained when the analysis was restricted to patients who had SM associated with a myeloid malignancy ($p=0.04$ and $p=0.02$ respectively), SM associated with MDS and/or MDS/MPN ($p=0.06$ and $p=0.04$, respectively) or just to SM-MDS patients ($p=0.04$ and $p=0.02$, respectively) (Figure 2). Other prognostic factors in the univariate analysis included: the subtype of SM –median PFS and OS of ISM vs ASM/MCL: NR vs 13 months ($p=0.001$) and NR vs 18 months ($p=0.005$), respectively-, the pattern of involvement of BM cells by the *KIT* mutation -median PFS and OS of MC-restricted vs myeloid vs myeloid plus lymphoid involvement of NR vs NR vs 7 months ($p=0.007$ and 0.001 , respectively)- and the type of AHNMD - median PFS and OS of AML vs MDS plus MDS/MPN vs other AHNMD of 9 vs 21 vs 167 months ($p<0.001$) and 4 months vs 43 months vs NR ($p<0.001$), respectively)-.

Multivariate analysis of prognostic factors for the whole patient series showed that the best combination of independent variables to predict for OS included the type of AHNMD (AML vs other; HR of 27.9, $p<0.001$), the pattern of involvement of BM cells by the *KIT* mutation -myeloid plus lymphoid or myeloid vs MC-restricted; HR of 23.9 ($p\leq 0.001$) and 6.2 ($p=0.03$), respectively- and the oncogenetic subgroup of SM-AHNMD (shared genetic alterations by BM MC and AHNMD cells vs the other groups; HR of 5.0, $p=0.02$). Similarly, the best combination of prognostic factors to predict for PFS included the oncogenetic group -shared AHNMD-associated genetic alterations or shared *KIT* mutation vs the other group; HR of 12.1 ($p<0.001$) and 3.1 ($p=0.03$), respectively- and the type of AHNMD -AML or CMML vs other AHNMD; HR of 5.2 ($p<0.001$) and 3.2 ($p=0.03$), respectively-.

When multivariate analysis was restricted to SM-MDS plus SM-MDS/MPN patients, the pattern of involvement of BM cells by the *KIT* mutation (myeloid plus lymphoid vs both myeloid and MC-restricted; HR of 4.3, $p=0.03$) emerged as the most powerful independent (adverse) prognostic factor for OS. For this specific subgroup of SM-AHNMD patients, the type of SM (ASM vs ISM; HR of 2.8, $p=0.04$) was the only independent predictor for PFS.

DISCUSSION

The association of SM with another non-MC hematopoietic neoplasm has been long recognized as a common finding among mastocytosis patients, occurring in between 5% to 40% of all SM patients,^{1,3,17} such cases being considered by the WHO as a specific poor-prognosis subgroup of SM¹. Despite this, SM-AHNMD still remains a highly heterogeneous diagnostic entity from the clinical, genetic and prognostic point of view. In fact, both the SM (e.g. ISM vs AML and MCL) and AHNMD diagnostic components of SM-AHNMD patients vary substantially, leading to many different combinations of malignant (e.g. ASM or MCL and AML or MDS, respectively) and/or indolent (e.g. ISM and MGUS) disorders^{2,47}. Despite few studies have been reported so far in which relatively small series of SM-AHNMD patients are characterized in detail, the diagnostic subtypes of both SM and AHNMD are generally considered as the major variables that influence disease behavior and patient outcome^{12,48} and thereby, the most relevant prognostic factors for SM-AHNMD cases⁵. In turn, at present it is also well-established that SM-AHNMD patients might display distinct oncogenetic profiles, even within well-defined categories of SM-AHNMD such as ASM-MDS^{12,19,20,48-52}. However, the potential clinical impact and prognostic relevance of the underlying oncogenetic pathways, defined by the pattern of involvement of BM MC and AHNMD cells (and other non-MC hematopoietic cells) by the *KIT* mutation and other AHNMD-associated genetic alterations, has not been thoroughly investigated.

Here, we confirmed the presence of distinct oncogenetic profiles in SM-AHNMD patients, based on the pattern of involvement of the coexisting hematopoietic tumor cell compartments by the *KIT* mutation and AHNMD-associated genetic alterations. Thus, SM-AHNMD patients could be classified into three major oncogenetic groups depending on whether such alterations were shared or not by BM MC and AHNMD tumor cells. Of note, the former patterns were more frequently associated with ASM and myeloid AHNMD, particularly MDS, MDS/MPN and AML, while the later predominate in patients with ISM and lymphoid neoplasms.

Previous studies indicate that coexistence of SM with AHNMD is not random^{13,18,53-56}, occurrence of an AHNMD being a relatively common finding among SM patients, either at diagnosis or during disease progression^{12,14,48}. In addition, recent studies also found a direct relationship between a greater degree of

involvement of distinct BM hematopoietic cells compartments [9,13](#) and MSC [57](#) by the *KIT* mutation, and an increased risk of progression of ISM to poor-prognosis categories of the disease, including ASM and SM-AHNMD. Altogether, these findings suggest that the occurrence of the *KIT* mutation in an early hematopoietic stem cell could favor the development of another (typically myeloid) hematological malignancy. In line with these findings, here we observed a substantial degree of involvement of BM hematopoietic cell compartments other than MC by the *KIT* mutation, including AHNMD tumor cells, particularly among SM-AHNMD patients who had ASM and myeloid malignancies [12,18,47,48](#). Most importantly, in a substantial fraction of our cases, BM MC also shared AHNMD-associated genetic alterations, frequently together with *KIT*-mutated AHNMD cells; in these cases, the later genetic alteration was associated with a more extended pattern of involvement of BM hematopoiesis, frequently including both myeloid and lymphoid cells. Altogether, these findings suggest that in most SM-AHNMD patients who show shared genetic alterations, the *KIT* mutation could occur at an earlier stage of hematopoietic development, AHNMD-associated genetic changes emerging later in an already *KIT*-mutated hematopoietic stem cell which is more prone to undergo myeloid than lymphoid differentiation; this could contribute to explain the higher frequency of myeloid malignancies in these patients. These findings are in contrast with previous *in vitro* culture observations that suggested SM-AHNMD is a multi-mutated neoplasm where the *KIT* mutation appears to be a late event [19](#). However, these investigations were developed in single cell-derived granulocyte-macrophage colonies (CFU-GM) (and not primary single tumor cells) from a relatively limited number of SM-AHNMD patients who mostly had SM-MDS/MPN [19](#). In line with this, a small fraction of our patients also had *KIT* mutation restricted to BM MC with AHNMD-associated genetic alterations positive in AHNMD cells and *KIT*-mutated MC. Of note, this later pattern was also more frequently observed among AML and high risk MDS cases, and it may lead to an earlier development of AHNMD, as reflected by the younger age found here for this patient subgroup.

Apart from the above two patient groups, a significant proportion of our SM-AHNMD patients, showed no genetic markers in common between tumoral BM MC and AHNMD cells, suggesting they had two unrelated diseases, in line with previous observations [18,20,52](#). It should be noted however, that we did not specifically search for all molecular changes that have been reported to be associated with myeloid

malignancies (e.g. MDS and AML) such as *NMP1*, *ASXL1*, *TET2*, *DNMT3A* gene mutations^{19,49-53}. So far, these later AHNMD-associated molecular markers have not been separately investigated in BM MC and AHNMD cells from individual SM-AHNMD patients, further investigations being necessary to determine whether in this subset of patients both diseases are in fact ontogenetically independent. Despite this, in a significant fraction of those SM-AHNMD patients who shared no genetic alterations, the AHNMD corresponded to (some of) the most prevalent (benign/indolent) hematological disorders in the elderly such as MGUS, CLL and low-grade lymphomas, in the absence of involvement of the hematopoiesis by the *KIT* mutation. These findings suggest that at least in a substantial fraction of cases, both tumor cell types could be genetically unrelated.

From the clinical point of view, cases who had no genetic/molecular markers in common between BM MC and AHNMD cells, more frequently displayed symptoms/signs of disease associated with early forms of mastocytosis such as anaphylaxis and skin lesions; in contrast, other SM-AHNMD cases had more advanced forms of SM (e.g. ASM and MCL) together with disease features associated with advanced disease (e.g. greater serum tryptase levels and creatinine and/or higher frequency of splenomegaly), although some of these features could also be related or influenced by the coexisting AHNMD. These results are in line with previous observations from our and other groups^{9,13,14,44,56,58,59}, which demonstrated that most ASM and MCL patients display multilineage involvement of BM hematopoiesis by the *KIT* mutation, whereas ISM patients most frequently show a MC-restricted *KIT* mutational profile, independently of the AHNMD^{9,14,20,44}. From the prognostic point of view, our results extend on these observations and show that SM-AHNMD cases who share AHNMD-associated genetic alterations and/or the *KIT* mutation by both BM MC and AHNMD tumor cells display a significant poorer outcome than SM-AHNMD patients in which such genetic alterations are restricted to the AHNMD tumor cell and BM MC compartments, respectively. Interestingly, the pattern of involvement of BM MC and AHNMD cells by both molecular/genetic alterations emerged as a powerful prognostic factor for both PFS and OS among SM-AHNMD patients, independently of the specific subtypes of SM and AHNMD, even when the analysis was restricted to the most frequent subtypes of AHNMD (e.g. MDS plus MDS/MPN).

In summary, our results confirm the clinical, genetic and prognostic heterogeneity of SM-AHNMD and indicate that both disease behavior and patient outcome depend on the underlying oncogenetic profile of tumor MC and AHNMD cells, in addition to the specific diagnostic subtypes of SM and AHNMD.

AUTHORSHIP CONTRIBUTIONS: C.F.G. designed the research, analyzed the data, interpreted results, made the figures and wrote the paper; C.T. performed experiments, analyzed the data and interpreted results and critically reviewed the paper; S.M designed the research and wrote the paper; A.G.M. designed experiments and critically reviewed the paper; C.C performed experiments, contributed with technical support and critically reviewed the paper; P.B. contributed with technical support and critically reviewed the paper; A.L. critically reviewed the paper; M.J, A.M. and M.L.G performed experiments, analyzed the data and critically reviewed the paper I.A-T, L. S-M, M.D-B, J.E, L.F, E.C, A.L, M.L; L.S, N.U, C.S-O, M.O and J.M.M. collected samples, performed clinical follow-up of patients and critically reviewed the paper; L.E. supervised the study, performed clinical follow-up of the patients and critically reviewed the paper; A.O. designed the research, supervised the study and wrote the paper.

DISCLOSURE/CONFLICTS OF INTEREST: The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGEMENTS: We would like to thank Jose Ángel Díaz, Nicolás González, Carlos Aguilar, David Gallardo and Manuel González-Silva for their collaboration. This work was supported in part by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS; grant number PI11/02399, FEDER) and Red Temática de Investigación Cooperativa en Cancer (RTICC; grant number RD12/0036/0048, FEDER) of the Instituto de Salud Carlos III (Ministry of Economy and Competitivity, Madrid, Spain), from Fundacion Ramon Areces (grant number CIVP16A1806, Madrid, Spain;), from Fundación Samuel Solorzano (grant number FS/22-2014, Salamanca, Spain;) and from Ayudas a Proyectos de Investigación en Salud de la Fundacion Mutua Madrileña 2014.

REFERENCES

1. Horny HP MD, Bennett JM, Bain BJ, Akin C, Escribano L, et al. Mastocytosis. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, editors. World Health Organization (WHO) classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer (IARC); 2008. p. 54-63.; 2008.
2. Travis WD, Li CY, Yam LT, Bergstralh EJ, Swee RG. Significance of systemic mast cell disease with associated hematologic disorders. *Cancer*. 1988;62(5):965-972.
3. Valent P, Horny HP, Escribano L, et al. Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. *Leuk Res*. 2001;25(7):603-625.
4. Sperr WR, Horny HP, Valent P. Spectrum of associated clonal hematologic non-mast cell lineage disorders occurring in patients with systemic mastocytosis. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002;127(2):140-142.
5. Pardanani A, Lim KH, Lasho TL, et al. Prognostically relevant breakdown of 123 patients with systemic mastocytosis associated with other myeloid malignancies. *Blood*. 2009;114(18):3769-3772.
6. Gasljevic G, Grcar-Kuzmanov B, Grosel A, Sever M, Gazic B, Kloboves-Prevodnik V. Hodgkin's lymphoma is a rare form of clonal haematological non-mast cell disease in systemic mastocytosis. *Diagn Pathol*. 2015;10(1):5.
7. Gonzalez-Diaz SN, Palma-Gomez S, Perez-Vanzzini R, Arias-Cruz A. [Mastocytosis]. *Rev Alerg Mex*. 2015;62(1):60-74.
8. Schipper EM, Posthuma W, Snieders I, Brouwer RE. Mastocytosis and diffuse large B-cell lymphoma, an unlikely combination. *Neth J Med*. 2011;69(3):132-134.
9. Escribano L, Alvarez-Twose I, Sanchez-Munoz L, et al. Prognosis in adult indolent systemic mastocytosis: a long-term study of the Spanish Network on Mastocytosis in a series of 145 patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(3):514-521.
10. Pullarkat ST, Sedarat F, Paquette R, Said J. Systemic mastocytosis with plasma cell dyscrasia: report of a case. *Leuk Res*. 2008;32(7):1160-1163.
11. Ault P, Lynn A, Tam CS, Medeiros LJ, Keating MJ. Systemic mastocytosis in association with chronic lymphocytic leukemia: a rare diagnosis. *Leuk Res*. 2007;31(12):1755-1758.
12. Pardanani A, Lim K-HH, Lasho TL, et al. Prognostically relevant breakdown of 123 patients with systemic mastocytosis associated with other myeloid malignancies. *Blood*. 2009;114(18):3769-3772.
13. Lim HK, Tefferi A, Lasho TL, et al. Systemic mastocytosis in 342 consecutive adults: survival studies and prognostic factors. *Blood*. 2009;113(23):5727-36
14. Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C, et al. KIT mutation in mast cells and other bone marrow hematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood*. 2006;108(7):2366-2372.
15. Arock M, Sotlar K, Akin C, et al. KIT mutation analysis in mast cell neoplasms: recommendations of the European Competence Network on Mastocytosis. *Leukemia*. 2015;29(6):1223-1232.
16. Jawhar M, Schwaab J, Schnittger S, et al. Additional mutations in SRSF2, ASXL1 and/or RUNX1 identify a high-risk group of patients with KIT D816V(+) advanced systemic mastocytosis. *Leukemia*. 2016;30(1):136-143.
17. Theoharides TC, Valent P, Akin C. Mast Cells, Mastocytosis, and Related Disorders. *The New England journal of medicine*. 2015;373(2):163-172.
18. Sotlar K, Colak S, Bache A, et al. Variable presence of KITD816V in clonal haematological non-mast cell lineage diseases associated with systemic mastocytosis (SM-AHNMD). *J Pathol*. 2010;220(5):586-595.
19. Jawhar M, Schwaab J, Schnittger S, et al. Molecular profiling of myeloid progenitor cells in multi-mutated advanced systemic mastocytosis identifies KIT D816V as a distinct and late event. *Leukemia*. 2015;29(5):1115-1122.
20. Damaj G, Joris M, Chandesris O, et al. ASXL1 but not TET2 mutations adversely impact overall survival of patients suffering systemic mastocytosis with associated clonal hematologic non-mast-cell diseases. *PLoS one*. 2014;9(1). e85362

21. Arock M, Akin C, Hermine O, Valent P. Current treatment options in patients with mastocytosis: status in 2015 and future perspectives. *Eur J Haematol*. 2015, 94 (6):474-90
22. Valent P, Escribano L, Broesby-Olsen S, et al. Proposed diagnostic algorithm for patients with suspected mastocytosis: a proposal of the European Competence Network on Mastocytosis. *Allergy*. 2014;69(10):1267-1274.
23. Valent P, Escribano L, Broesby-Olsen S, et al. Proposed diagnostic algorithm for patients with suspected mastocytosis: a proposal of the European Competence Network on Mastocytosis. *Allergy*. 2014;69(10):1267-1274.
24. Horny HP, Valent P. Diagnosis of mastocytosis: general histopathological aspects, morphological criteria, and immunohistochemical findings. *Leuk Res*. 2001;25(7):543-551.
25. Pullarkat VA, Bueso-Ramos C, Lai R, et al. Systemic mastocytosis with associated clonal hematological non-mast-cell lineage disease: analysis of clinicopathologic features and activating c-kit mutations. *Am J Hematol*. 2003;73(1):12-17.
26. Vigil CE, Wang SA, Cortes JE, et al. Dasatinib-responsive mast cell neoplasms as initial presentation of chronic myelogenous leukemia in blast phase. *J Clin Oncol*. 2011;29(17):e514-516.
27. Pullarkat ST, Pullarkat V, Kroft SH, et al. Systemic mastocytosis associated with t(8;21)(q22;q22) acute myeloid leukemia. *J Hematop*. 2009;2(1):27-33.
28. Pullarkat V, Bedell V, Kim Y, et al. Neoplastic mast cells in systemic mastocytosis associated with t(8;21) acute myeloid leukemia are derived from the leukemic clone. *Leuk Res*. 2007;31(2):261-265.
29. Sotlar K, Bache A, Stellmacher F, Bultmann B, Valent P, Horny HP. Systemic mastocytosis associated with chronic idiopathic myelofibrosis: a distinct subtype of systemic mastocytosis associated with a [corrected] clonal hematological non-mast [corrected] cell lineage disorder carrying the activating point mutations KITD816V and JAK2V617F. *J Mol Diagn*. 2008;10(1):58-66.
30. Bernd HW, Sotlar K, Lorenzen J, et al. Acute myeloid leukaemia with t(8;21) associated with "occult" mastocytosis. Report of an unusual case and review of the literature. *J Clin Pathol*. 2004;57(3):324-328.
31. Swerdlow SH. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2008.
32. Sperr WR, Valent P. Diagnosis, progression patterns and prognostication in mastocytosis. *Expert Rev Hematol*. 2012;5(3):261-274.
33. Mayado A, Teodosio C, Garcia-Montero AC, et al. Increased IL6 plasma levels in indolent systemic mastocytosis patients are associated with high risk of disease progression. *Leukemia*. 2016;30 (1):124-30
34. Mailankody S, Mena E, Yuan CM, Balakumaran A, Kuehl WM, Landgren O. Molecular and biologic markers of progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2010;51(12):2159-2170.
35. Kyle RA, Durie BG, Rajkumar SV, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia*. 2010;24(6):1121-1127.
36. Perez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G, et al. New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood*. 2007;110(7):2586-2592.
37. Cheson BD, Bennett JM, Kantarjian H, et al. Report of an international working group to standardize response criteria for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2000;96(12):3671-3674.
38. Cheson BD, Greenberg PL, Bennett JM, et al. Clinical application and proposal for modification of the International Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia. *Blood*. 2006;108(2):419-425.
39. Bacher U, Kern W, Alpermann T, Schnittger S, Haferlach C, Haferlach T. Prognoses of MDS subtypes RARS, RCMD and RCMD-RS are comparable but cytogenetics separates a subgroup with inferior clinical course. *Leuk Res*. 2012;36(7):826-831.
40. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2013;122(22):3616-3627.

41. van Lochem EG, van der Velden VH, Wind HK, te Marvelde JG, Westerdaal NA, van Dongen JJ. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry B Clin Cytom.* 2004;60(1):1-13.
42. van Dongen JJ, Lhermitte L, Bottcher S, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia.* 2012;26(9):1908-1975.
43. Rasillo A, Tabernero MD, Sanchez ML, et al. Fluorescence in situ hybridization analysis of aneuploidization patterns in monoclonal gammopathy of undetermined significance versus multiple myeloma and plasma cell leukemia. *Cancer.* 2003;97(3):601-609.
44. Teodosio C, Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, et al. Mast cells from different molecular and prognostic subtypes of systemic mastocytosis display distinct immunophenotypes. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(3):719-726.
45. Sotlar K, Escribano L, Landt O, et al. One-step detection of c-kit point mutations using peptide nucleic acid-mediated polymerase chain reaction clamping and hybridization probes. *Am J Pathol.* 2003;162(3):737-746.
46. Fonatsch C, Gudat H, Lengfelder E, et al. Correlation of cytogenetic findings with clinical features in 18 patients with inv(3)(q21q26) or t(3;3)(q21;q26). *Leukemia.* 1994;8(8):1318-1326.
47. Horny HP, Sotlar K, Sperr WR, Valent P. Systemic mastocytosis with associated clonal haematological non-mast cell lineage diseases: a histopathological challenge. *J Clin Pathol.* 2004;57(6):604-608.
48. Lim KH, Tefferi A, Lasho TL, et al. Systemic mastocytosis in 342 consecutive adults: survival studies and prognostic factors. *Blood.* 2009;113(23):5727-5736.
49. Hussein K, Horny HP, Busche G, et al. Systemic mastocytosis (SM) with associated BCR-ABL-positive myelogenous leukaemia (SM-AHNMD): evidence that mast cells do not belong to the leukaemic clone. *Leukemia.* 2011;25(6):1050-1053.
50. Valent P, Arock M, Akin C, et al. The classification of systemic mastocytosis should include mast cell leukemia (MCL) and systemic mastocytosis with a clonal hematologic non-mast cell lineage disease (SM-AHNMD). *Blood.* 2010;116(5):850-851.
51. Rechsteiner M, Muller R, Reineke T, et al. Modelling of a genetically diverse evolution of Systemic Mastocytosis with Chronic Myelomonocytic Leukemia (SM-CMML) by Next Generation Sequencing. *Exp Hematol Oncol.* 2014;3:18.
52. Wang SA, Hutchinson L, Tang G, et al. Systemic mastocytosis with associated clonal hematological non-mast cell lineage disease: clinical significance and comparison of chromosomal abnormalities in SM and AHNMD components. *Am J Hematol.* 2013;88(3):219-224.
53. Lim KH, Pardanani A, Tefferi A. KIT and mastocytosis. *Acta Haematol.* 2008;119(4):194-198.
54. Gotlib J, Pardanani A, Akin C, et al. International Working Group-Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment (IWG-MRT) & European Competence Network on Mastocytosis (ECNM) consensus response criteria in advanced systemic mastocytosis. *Blood.* 2013;121(13):2393-2401.
55. Pardanani A. Systemic mastocytosis in adults: 2013 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol.* 2013;88(7):612-624.
56. Pardanani A. Systemic mastocytosis in adults: 2015 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol.* 2015;90(3):250-262.
57. Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, Alvarez-Twose I, et al. KIT D816V mutated bone marrow mesenchymal stem cells in indolent systemic mastocytosis are associated with disease progression. *Blood.* 2015.
58. Tefferi A, Verstovsek S, Pardanani A. How we diagnose and treat WHO-defined systemic mastocytosis in adults. *Haematologica.* 2008;93(1):6-9.
59. Alvarez-Twose I, Zanotti R, Gonzalez-de-Olano D, et al. Nonaggressive systemic mastocytosis (SM) without skin lesions associated with insect-induced anaphylaxis shows unique features versus other indolent SM. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133(2):520-528.

FIGURE LEGENDS:

FIGURE 1: Clonal evolution patterns observed in SM-AHNMD patients according to the distribution of the *KIT* mutation as well as AHNMD-associated cytogenetic/molecular alterations in different BM cell compartments. The sequence of acquisition of the *KIT* D816V mutation and other AHNMD-associated cytogenetic/molecular alterations by MC and other non-MC BM cell compartments (from CD34+ HSC to the common myeloid and lymphoid precursors, maturing myeloid cells, mast cells and lymphoid cells) is shown for the 65 SM-AHNMD patients analyzed. Numbers the small circles represent cases who acquired the *KIT* mutation and AHNMD-associated genetic/molecular alterations (gray and black areas in the upper and lower part of the small circle) at the indicated level. The large pie charts represent the accumulated frequency (%) of cases carrying the *KIT* mutation and AHNMD-associated genetic/molecular alterations at each cell differentiation stage.*In 5/6 cases, involvement of bone marrow mesenchymal stem cell (BM MSC) was also confirmed, suggesting that in such cases the genetic abnormalities have most probably targeted an earlier precursor than the HSC. **C-Ly Progenitor**, Common lymphoid progenitor; **C-My Progenitor**, common myeloid progenitor; **GM cells**; maturing neutrophils and monocytic cells; **HSC**, hematopoietic stem cell.

FIGURE 2: Progression-free survival (left panels) and overall survival (left panels) of SM-AHNMD patients grouped according to the pattern of involvement of BM MC and other non-MC hematopoietic cell compartments by the *KIT* mutation and other AHNMD-associated cytogenetic/molecular alterations. Numbers indicate median survival in months (95% confidence interval). — No genetic/molecular alteration shared. Shared *KIT* mutation. -- Shared AHNMD associated cytogenetic/molecular alteration w/o *KIT* mutation.

Table 1. Distribution of SM-AHNMD cases according to the pattern of involvement of BM MC and other BM non-MC hematopoietic cell compartments by the *KIT* mutation and other AHNMD-associated cytogenetic/molecular alterations.

Subtype of AHNMD	TOTAL (n=65)	Pattern of involvement of BM MC and other non-MC hematopoietic cell compartments by the <i>KIT</i> mutation and AHNMD-associated genetic alterations			P
		No genetic alterations shared (n=25)	Shared <i>KIT</i> mutation (n=28)	Shared AHNMD-associated genetic alterations (n=12) ^a	
AHNMD of myeloid origin	48/65 (73%)	15/25 (60%)	22/28 (78%)	11/12 (92%)	*0.04
AML	12/65 (18%)	5/25 (20%)	2/28 (7%)	5/12 (42%)	0.05 ; *0.02
MDS	25/65 (38%)	7/25 (28%)	13/28 (46%)	5 ^a /12 (42%)	NS
MDS/MPN ¹	7/65 (11%)	1/25 (4%)	5/28 (18%)	1/12 (8%)	*0.05
MPN ²	4/65 (6%)	2/25 (8%)	2/28 (7%)	0/12 (0%)	NS
AHNMD of lymphoid origin	10/65 (16%)	7/25 (28%)	3/28(11%)	0/12 (0%)	0.05 ; ***0.03
B-CLPD or T-CLPD	3/65 (5%)	2/25 (8%)	1/28(4%)	0/12 (0%)	NS
MGUS	7/65 (11%)	5/25 (20%)	2/28(7%)	0/12	**0.05
Multiple myeloid and/or lymphoid AHNMD	7/65 (11%)	3/25 (12%)	3/28 (11%)	1/12 (8%)	NS
B-CLPD + B-CLPD ³	2/65 (3%)	2/25 (8%)	0/28	0/12 (0%)	NE
B-CLPD + T-CLPD ⁴	1/65 (1.5%)	0/25	1/28(4%)	0/12 (0%)	NE
B-CLPD + MPN ⁵	1/65 (1.5%)	1/25 (4%)	0/28	0/1 (0%)	NE
MDS/MPN + MGUS	1/65 (1.5%)	0/25	1/28(4%)	0/1 (0%)	NE
MDS + MM ⁶	1/65 (1.5%)	0/25	1/28(4%)	0/1 (0%)	NE
MDS/MPN + MM	1/65 (1.5%)	0/25	0/28	1/12 (8%)	NE

AML, acute myeloid leukemia; ANHMD, associated clonal hematological non-mast cell lineage disease; **B-CLPD**, B-cell chronic lymphoproliferative disorder; **MDS**, myelodysplastic syndrome; **MDS/MPN** myelodysplastic syndrome/myeloproliferative neoplasm; ¹Chronic myelomonocytic leukemia (CMML), 5 cases; myeloproliferative neoplasm with eosinophilia (MPNEo), 1 case; unclassified myeloproliferative neoplasm (MPN-UC), 1 patient; **MGUS**, monoclonal gammopathy of undetermined significance 8 cases; **MM**, multiple myeloma 2 cases; ²polycythemia vera (PV), 2 cases; essential thrombocythemia (ET), 1 case; hypereosinophilic syndrome (HES) 1 patient; **T-CLPD**, T-cell chronic lymphoproliferative disorder; **SM**, systemic mastocytosis; ³ Chronic lymphocytic leukaemia (CLL) + marginal zone B cell lymphoma (MZL) 2 cases; ⁴Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) + large granular T cell leukemia/lymphoma (LGL), 1 case; ⁵ET + MZL, 1 case; ³ cases showed *KIT* mutation restricted to MC but MC showed MDS genetic markers of clonality. * Shared *KIT* mutation group vs the other two groups. ** Shared AHNMD-associated genetic alterations group vs the other two groups. *** No shared genetic alterations group vs the other two groups. **NE**: not evaluable due to the low number of cases/group. **NS**, no statistically significant differences found for all group comparisons (p>0.05).

Table 2. Distribution of the *KIT* mutation and AHNMD-genetic alterations detected in BM MC, AHNMD tumor cells and different non-MC BM cell compartments in SM-AHNMD patients (n=65).

Patient code	SM-AHNMD subgroups	Diagnosis	MC		AHNMD tumor cells		Myeloid cells								Lymphoid cells		MSC	
			<i>KIT</i>	AHNMD*	<i>KIT</i>	AHNMD	CD34+		Neutrophils		Monocytes		NRBC		<i>KIT</i>	AHNMD		
							<i>KIT</i>	AHNMD	<i>KIT</i>	AHNMD	<i>KIT</i>	AHNMD	<i>KIT</i>	AHNMD				<i>KIT</i>
1		SM-AML	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	
2		SM-AML	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	
3		SM-AML	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	
4		SM-AML	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	
5		SM-AML	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	
6		SM-MDS	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	NA	
7		SM-MDS	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	
8		SM-MDS	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	
9		SM-MDS	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	NA	
10		SM-MDS	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	
11		SM-MDS	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	
12	No genetic alteration shared	SM-MDS	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	
13		SM-CMML	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	
14		SM-TE	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	
15		SM-PV	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	
16		SM-MGUS	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	
17		SM-MGUS	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	
18		SM-MGUS	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	
19		SM-MGUS	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	
20		SM-MGUS	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	
21		SM-CLPD	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	
22		SM-CLPD	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	
23		SM+ET+MZL	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	NA	
24		SM+CLL+MZL	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	
25	SM+CLL+MZL	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA		
26		SM-AML	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	NA	
27		SM-MDS	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	NA	
28		SM-MDS	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	NA	
29		SM-MDS	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	NA	
30		SM-MDS	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	NA	
31		SM-MDS	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	NA	
32		SM-MDS	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	NA	
33		SM-MDS	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	NA	
34		SM-CMML	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	NA	
35		SM-CMML	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	NA	
36		SM-CMML	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	NA	
37		SM-CMML	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	NA	
38		SM-PV	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	NA	
39	Shared <i>KIT</i> mutation	SM-HES	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	NA	
40		SM-MGUS	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	NA	
41		SM-MGUS	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	NA	
42		SM-CLPD	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	NA	
43		SM+MGUS+CMML	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	NA	
44		SM-AML	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
45		SM-MDS	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	NA	
46		SM-MDS	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	NA	
47		SM-MDS	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	NA	
48		SM-MDS	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
49		SM-MDS	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	NA	
50		SM-MDS	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	NA	
51		SM-CMML	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	NA	
52		SM+DLBCL+LGL	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	
53		SM+MM+SMD	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	
54		SM-AML	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	NA	
55		SM-MDS	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	NA	-	-	NA	
56		SM-AML	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	NA	
57		SM-AML	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	NA	
58		SM-MDS	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	NA	
59	Shared AHNMD-associated genetic alteration	SM-AML	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NA	+	-	+	-	NA	
60		SM-AML	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
61		SM-MDS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	NA	
62		SM-MDS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	NA	
63		SM-MDS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
64		SM-CMML	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	NA
65		SM+MM+CMML	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	NA
TOTAL			65/65 (100%)	12/65 (18%)	38/65 (59%)	33/65 (51%)	38/65 (59%)	19/65 (29%)	38/65 (59%)	19/65 (29%)	38/65 (59%)	12/64 (19%)	37/65 (57%)	12/64 (19%)	18/65 (28%)	0	5/6 (83%)	

AML, acute myeloid leukemia; ANHMD, associated clonal hematological non-mast cell lineage disease; CLL, Chronic lymphocytic leukaemia; CLPD, chronic lymphoproliferative disorder; CMML, chronic myelomonocytic leukemia; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; ET, essential thrombocythemia; HES, hypereosinophilic syndrome; LGL, large granular T cell leukemia/lymphoma; MDS, myelodysplastic syndrome; MGUS, monoclonal gammopathy of undetermined significance; MM, multiple myeloma; MSC, mesenchymal stem cell; MZL, marginal zone B cell lymphoma; PV, polycythemia vera; SM, systemic mastocytosis; NA, not analyzed. *AHNMD-associated genetic alteration.

Table 3. SM-AHNMD: clinical and biological disease features of the disease at diagnosis according to the pattern of involvement of BM MC and other non-BM MC hematopoietic cell compartments by the *KIT* mutation and other AHNMD-associated cytogenetic/molecular alterations

Clinical and laboratory parameters	Pattern of involvement of BM MC and other non-MC hematopoietic cell compartments by the <i>KIT</i> mutation and AHNMD-associated genetic alterations			P
	No genetic alterations shared (n=25)	Shared <i>KIT</i> mutation (n=28)	Shared AHNMD-associated genetic alterations (n=12)	
Demographics and clinical findings				
Age	62 ± 15 (25-82)	63 ± 12 (40-87)	53 ± 17 (10-72)	0.05/ ** 0.03
Sex (male/female)	13/12 (52%/48%)	20/8 (71%/29%)	7/5 (58%/42%)	NS
Constitutional symptoms	8/24 (33%)	6/28 (21%)	5/11 (46%)	NS
Fever	2/21 (9%)	7/24 (29%)	5/11 (46%)	NS
Lymphadenopathies	0/19 (0%)	5/21 (24%)	1/11 (9%)	NS
Splenomegaly	6/24 (25%)	17/25 (68%)	5/11 (46%)	<0.01
Hepatomegaly	1/19 (8%)	8/24 (33%)	3/11 (27%)	NS
Skin lesions	12/21 (57%)	9/23 (39%)	1/11 (10%)	0.03
Anaphylaxis	6/14 (43%)	0/23 (0%)	0/11 (0%)	<0.01
Anemia (<100g/L)	4/21 (19%)	14/28 (50%)	6/12 (50%)	NS
Thrombocytopenia (<100 x 10 ⁹ /L)	7/19 (37%)	12/26 (46%)	7/12 (58%)	NS
Laboratory parameters¹				
Hb (g/L)	123 ± 19 (88-154)	115 ± 29 (54-188)	111 ± 20 (82-150)	NS
WBC (x10 ⁹ /L)	91 ± 68 (16-225)	134 ± 19 (19-963)	189 ± 23 (21-791)	NS
N. of platelets (x10 ⁹ /L)	205 ± 173 (24-725)	143 ± 99 (12-356)	95 ± 60 (14-197)	0.05
Serum LDH (IU/mL)	326 ± 316 (85-1450)	324 ± 208 (114-1130)	363 ± 206 (116-790)	NS
Serum β-2microglobulin (μg/mL)	2.3 ± 0.8 (0.9-3.8)	4.1 ± 2.9 (0.6-12.8)	5.5 ± 5.5 (1.9-18.7)	NS
Serum CRP (mg/L)	5.4 ± 3.7 (0.5-11.1)	18.1 ± 19.3 (3.0-66.1)	17.6 ± 34.2 (0.1-87)	NS
Serum creatinine (mg/dL)	0.86 ± 0.17 (0.6-1.2)	0.98 ± 0.38 (0.6-2.3)	7.6 ± 20.4 (0.5-62)	** <0.01
Serum tryptase (ng/mL)	71 ± 73 (8.1-232)	226 ± 278 (12.6-1328)	242 ± 190 (19-598)	* 0.03
Subtype of SM #				
ISM (n=34)	19/34 (56%)	11/34 (32%)	4/34 (12%)	<0.01
ASM (n=26)	3/26 (12%)	17/26 (65%)	6/26 (23%)	
MCL(n=2)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	2/2 (100%)	
Patient outcome				
% Deaths	6/21 (29%)	13/23 (57%)	7/9 † (78%)	0.03
Median PFS ² (95% confidence interval)	NR (0-167)	30 (0-138)	6 (0-21)	<0.01
Median OS ² (95% confidence interval)	NR (0-217)	48 (0-138)	11 (1-24)	<0.01

Results expressed as number of cases from all cases in the corresponding patient group and percentage between brackets, or ¹ as mean ± one standard deviation (SD) unless otherwise specified. **AHNMD**, associated clonal hematological non-mast cell lineage disease; **SM**, systemic mastocytosis; **WBC**, white blood cell count; **ASM**, aggressive systemic mastocytosis; **CRP**, C-reactive protein; **Hb**, hemoglobin; **ISM**, indolent systemic mastocytosis; **LDH**, lactate dehydrogenase; **MCL**, mast cell leukemia; **NR**, not reached; ²**OS**, overall survival expressed in months; ¹**PFS**, progression-free survival expressed in months. †Excluding from the comparison three cases that showed the *KIT* mutation restricted to MC while MC shared the same cytogenetic abnormality than myeloid BM cells involved in the AHNMD, all three cases, remaining alive at the moment of closing this study. # 3 SM cases could not be classified as ISM, ASM or MCL. *No genetic alterations shared vs the other two groups. ** Shared AHNMD-associated genetic alterations vs the other two groups. **NS**, no statistically significant differences found for all group comparisons (p>0.05).

FIGURE 1

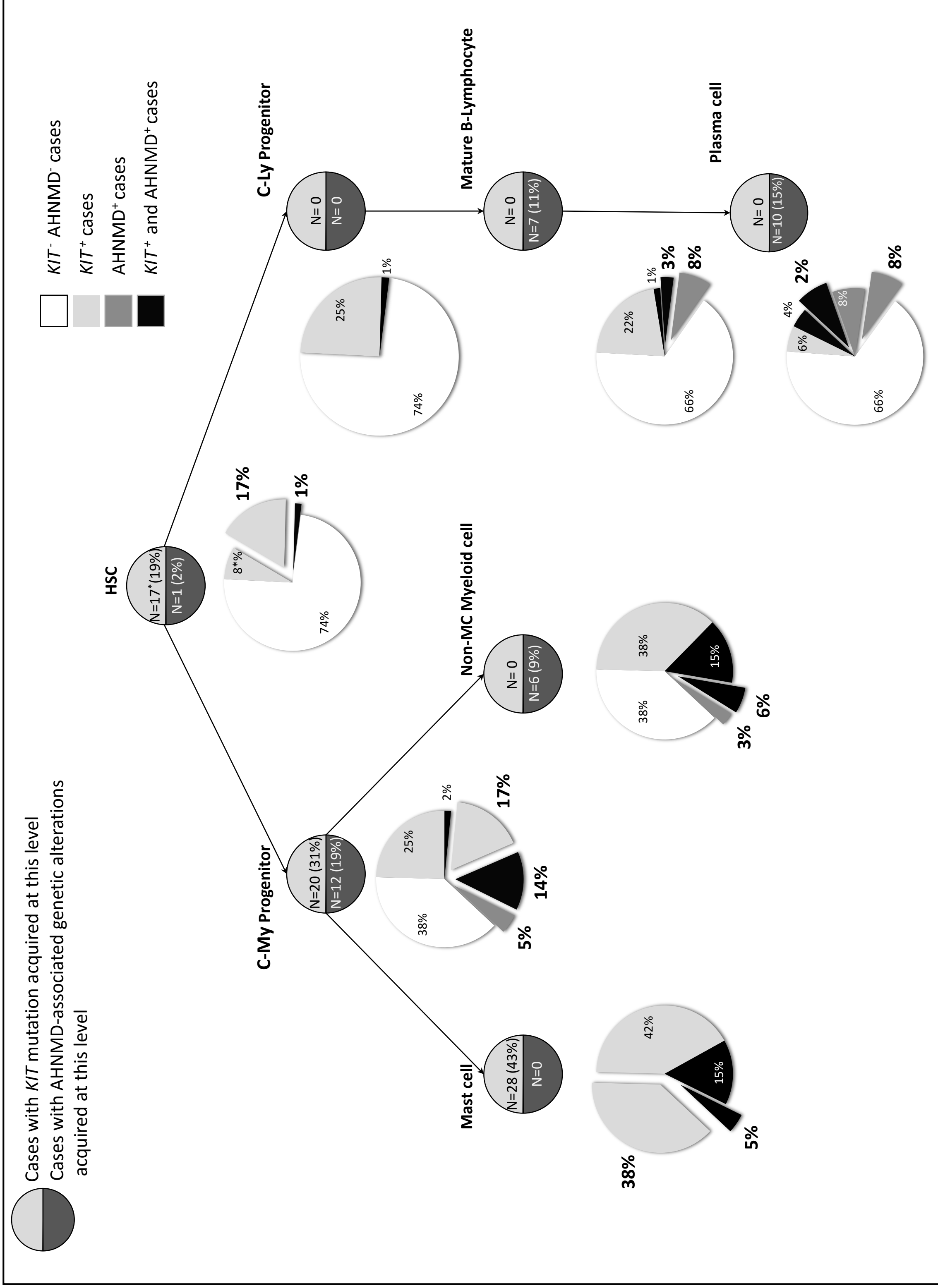
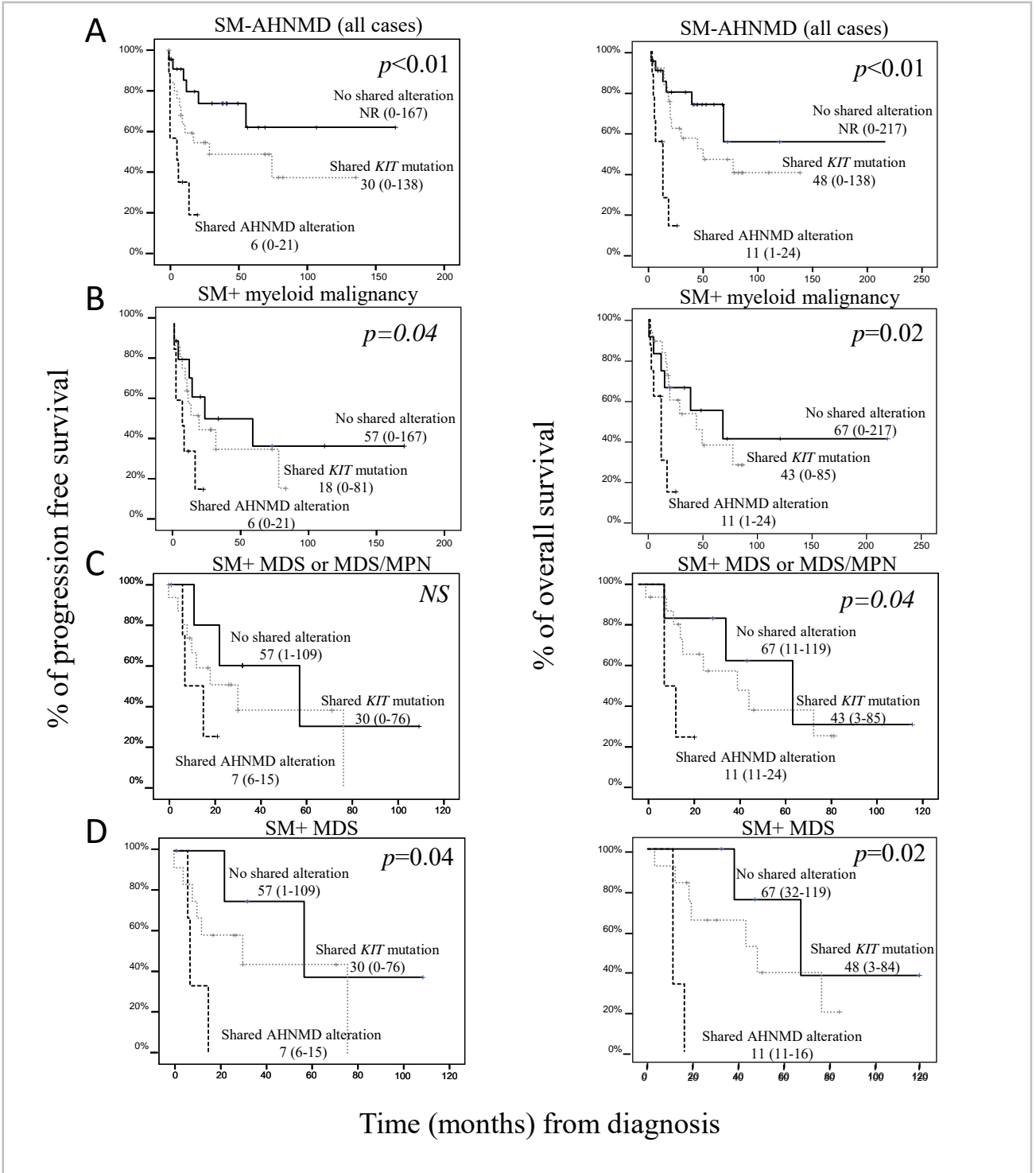


FIGURE 2



CAPÍTULO IV.

Discusión.

La producción de células hematopoyéticas humanas constituye un proceso esencial para la vida, al estar destinado entre otros objetivos, a la producción de: i) las células que han de transportar el oxígeno a todos los tejidos, ii) las células encargadas de vigilar la integridad de los vasos sanguíneos y iii) las células inmunes responsables a la vez, de proteger el organismo de agentes extraños (p.ej. infecciosos) y de facilitar la reparación y regeneración de tejidos dañados^{112,113,205}. Esto requiere que mediante la hematopoyesis se produzcan una gran variedad de células maduras funcionalmente distintas^{112,113,205}.

Desde hace tiempo se conoce que la renovación del tejido hematopoyético está basada en un proceso de reposición continua de células maduras, a partir de un número relativamente reducido de células madre totipotenciales con capacidad de i) autorrenovarse y mantener un *pool* estable de progenitores, y ii) diferenciarse a distintas líneas celulares generando un número importante de elementos maduros de cada uno de los distintos compartimientos de células hematopoyéticas linfoides y mieloides^{112,113,205,593-596}. Hoy día conocemos en detalle los procesos de diferenciación hematopoyética, especialmente en lo que hace referencia a los patrones (característicos) de expresión de proteínas asociadas a cada línea celular y sus estadios madurativos^{120,597-599}. Sin embargo, los momentos concretos del proceso madurativo asociados a una expansión numérica (proliferación) de las células de una misma línea celular, así como los posibles cambios en la tasa proliferativa relativa de cada compartimiento de células hematopoyéticas que ocurren en procesos reactivos frente a MO normal, siguen siendo en gran medida desconocidos.

Ante estos antecedentes, nos planteamos como primer objetivo de este trabajo doctoral analizar el impacto que tienen las citopenias secundarias (no clonales) sobre la proliferación de distintos compartimientos de células hematopoyéticas de MO. Con ello podríamos establecer un marco de referencia de la proliferación de los distintos compartimientos de células hematopoyéticas, tanto en MO normal como en MO reactiva, que permitiese definir en una etapa posterior y de forma precisa, la posible existencia de

alteraciones proliferativas en dichos compartimientos celulares en MO de pacientes con SMD y LMA. Este último aspecto, ha constituido el segundo objetivo específico del presente trabajo.

En términos generales, actualmente se considera que el origen de la gran mayoría de las hemopatías malignas mieloides, incluyendo los SMD, las NMP, MS y LMA, tendría lugar en una célula *stem* hematopoyética genéticamente alterada^{229,291,293,323,324,373,446,453,454,600-602}. Dependiendo del tipo de anomalías genéticas y/o moleculares adquiridas, de los patrones de alteraciones acumuladas, de su secuencia de adquisición, y de la célula concreta en la que ocurren, la enfermedad se manifestaría de forma distinta, incluyendo en ocasiones, formas asociadas a la transformación/progresión de una neoplasia hematológica en otra hemopatía distinta^{121,371,372,381,603-608}. Pese a la gran heterogeneidad genética y fenotípica de las hemopatías malignas mieloides, en común, estos pacientes suelen presentar alteraciones madurativas de uno o más compartimientos celulares, asociados con frecuencia a desequilibrios numéricos entre distintos compartimientos de células maduras e inmaduras, y a la presencia de patrones anormales de expresión proteica^{121,371,372,381,603-608}. Es decir, la presencia de alteraciones genéticas en hemopatías malignas mieloides se traduce con frecuencia, en bloqueos madurativos –p.ej. acúmulo de blastos–, defectos de producción celular –p.ej. citopenias– y fenotipos aberrantes^{291,438,453,454,604-606,609-612}. Mientras que en los últimos años se ha avanzado de forma notable en el conocimiento y definición de las alteraciones genéticas (y de las anomalías fenotípicas) asociadas a SMD, el conocimiento disponible acerca del impacto de estas alteraciones en la proliferación de los diferentes compartimientos hematopoyéticos de MO, sigue siendo limitado. Más aún, queda sin aclarar si el desarrollo de diferentes hemopatías mieloides está asociado a la afectación específica de diferentes compartimientos celulares y su distribución relativa, si está asociada con alteraciones genéticas concretas y/o con diferentes vías de evolución clonal que pudieran contribuir incluso a explicar el desarrollo y aparición secuencial de diferentes tipos de hemopatías en un mismo individuo.

En este sentido, merece destacar que desde hace tiempo se conoce que las LMA pueden desarrollarse sobre una hemopatía mieloide previa (SMD, NMP o MS) o aparecer “*de novo*”, lo cual apoyaría la hipótesis de la existencia de al menos dos vías distintas (una directa y otra indirecta) de desarrollo de la LMA^{229,291,293,446,453-455}.

La disponibilidad de nuevas herramientas y tecnologías para el estudio detallado del genoma humano, ha permitido demostrar la presencia de alteraciones genéticas asociadas a hematopoyesis clonal en adultos aparentemente sanos –hematopoyesis clonal de significado indeterminado (CHIP)– incrementándose su frecuencia de forma significativa con la edad^{229,230,235,309}. Estos hallazgos sugieren que, con más frecuencia de lo esperado, las hemopatías malignas mieloides, como por ejemplo la LMA, podrían desarrollarse sobre una hematopoyesis ya de por sí alterada genéticamente, pero que ha pasado desapercibida al no estar asociada a citopenias y/u otros signos o signos de la enfermedad^{230,235,309,310,314}. Sin embargo, en el momento de iniciar este trabajo se desconocía con qué frecuencia esto podría ocurrir, especialmente entre adultos con LMA o leucemia aguda de fenotipo mixto (MPAL) “*de novo*”.

Dado que en la literatura se encuentran bien definidos los perfiles fenotípicos aberrantes asociados a SMD y LMA^{589,590,603,613,614}, nos planteamos como tercer objetivo, analizar su posible asociación con la existencia de alteraciones genéticas en las células hematopoyéticas residuales de MO de adultos con LMA “*de novo*” estudiadas al diagnóstico. Con ello podríamos definir, además: i) la frecuencia con la que una LMA que aparentemente surge “*de novo*” sobre una hematopoyesis “normal”, en realidad lo hace sobre una hematopoyesis de base ya alterada, y; ii) en qué medida las células blásticas de la LMA comparten las mismas alteraciones genéticas que presentan dichos compartimientos de células hematopoyéticas residuales clonales.

En este momento estaríamos en condiciones de abordar, como último objetivo del trabajo, el análisis de la secuencia de aparición de dichas alteraciones de forma que se pudieran identificar vías de evolución clonal asociadas a la transformación maligna de hemopatías mieloides. Para ello necesitábamos de un modelo en el que pudiéramos definir el tipo y grado de relación genética existente entre distintos compartimientos de células tumorales afectadas que coexisten en un mismo paciente.

Un modelo idóneo para el estudio del posible desarrollo de una LMA sobre una hematopoyesis clonal, lo representaría la MS. Pese a que la gran mayoría de los pacientes con MS presenta una enfermedad clínicamente indolente y con una esperanza de vida similar a la de la población general^{514,515}, en un porcentaje significativo de los casos (5-10%) la enfermedad progresa a formas agresivas (p.ej. MSA o

leucemia de mastocitos), SMD, SMD/NMP y LMA^{514,515,520,523,527,549}. Al tratarse de una neoplasia que presenta una alteración genética prácticamente universal y específica como es la mutación de *KIT*, y que con frecuencia muestra afectación clonal de toda la hematopoyesis^{46,47} asociada a manifestaciones clínicas que abocan a un diagnóstico temprano de la misma (p.ej. lesiones cutáneas visibles o crisis anafilácticas), incluso durante el periodo neonatal, resulta fácil entender que esta neoplasia constituye un modelo interesante para el estudio de la génesis y transformación maligna de las hemopatías mieloides. Por todo ello, para el último objetivo de este trabajo seleccionamos la MS-AHNMD como modelo de enfermedad que permitiese conocer la distribución de distintas alteraciones genéticas en diferentes compartimientos de células mieloides tumorales y las posibles vías de evolución clonal subyacentes.

1. Distribución de distintos compartimientos de células hematopoyéticas de MO normal y reactiva a lo largo de las distintas fases del ciclo celular.

La distribución de distintos compartimientos de células normales y leucémicas en las diferentes fases del ciclo celular (G_0 - G_1 vs S + G_2 / M), constituye un parámetro que habitualmente refleja de forma fidedigna la tasa proliferativa global de dichas células⁶¹⁵. Estudios previos han demostrado que la tasa proliferativa de las células tumorales de pacientes con diferentes hemopatías malignas como síndromes linfoproliferativos crónicos B (SLPC-B), mieloma múltiple (MM), LLA y LMA⁶¹⁶⁻⁶²⁰ es muy variable, asociándose, dentro de cada una de estas enfermedades, una mayor tasa proliferativa de las células tumorales a un peor pronóstico⁶²¹⁻⁶²⁴. Sin embargo, en el momento de iniciar este trabajo, no existían estudios en los que se proporcionasen valores de referencia de normalidad en lo que a la tasa proliferativa de los diferentes compartimientos de células hematopoyéticas de MO de sujetos sanos se refiere, siendo este conocimiento imprescindible para poder evaluar la posible alteración de la tasa proliferativa de distintos compartimientos tumorales de cualquier hemopatía maligna.

En términos globales, nuestros resultados confirman los hallazgos preliminares de otros grupos y muestran que en MO normal, los precursores eritroides, junto con los progenitores CD34⁺, constituyen los dos compartimientos de células hematopoyéticas que presentan mayor tasa proliferativa⁶¹⁷. Por el

contrario, los linfocitos, al ser en su mayoría células terminalmente diferenciadas, muestran un bajo índice de proliferación⁶¹⁷. A su vez, las células de línea monocítica y los precursores de granulocito neutrófilo de MO, presentaron una tasa proliferativa intermedia, respecto a las demás poblaciones celulares de MO normal y reactiva.

En general, nuestros resultados mostraron también una gran similitud en la tasa proliferativa de los diferentes compartimientos celulares de MO normal y MO de adultos con citopenias reactivas. No obstante, un estudio más detallado de los distintos compartimientos madurativos de línea de granulocito neutrófilo, puso de manifiesto un incremento significativo de la tasa proliferativa de las células más maduras de este compartimiento celular en MO reactivas (vs normal), a expensas de un descenso de la tasa proliferativa en los estadios más inmaduros de precursor mielóide CD34⁺. Estos hallazgos podrían reflejar la posible existencia de una respuesta medular ante citopenias periféricas, asociada a una producción acelerada de formas maduras e inmunocompetentes de granulocito neutrófilo, a expensas de una menor expansión de los precursores más inmaduros (CD34⁺) de otras líneas. En resumen, nuestros resultados muestran que es factible analizar la distribución de diferentes compartimientos celulares de MO mediante citometría de flujo y que, salvo pequeñas excepciones, la tasa proliferativa de dichos compartimientos celulares es similar en MO normal y reactiva. Estos hallazgos abren la posibilidad de identificar alteraciones en la tasa proliferativa de distintos compartimientos celulares de MO, que pudieran ser específicas de pacientes que presentan citopenias de naturaleza clonal asociadas por ejemplo a SMD, aspecto en el que hemos centrado el siguiente objetivo específico de este trabajo.

2. Distribución de distintas poblaciones de células hematopoyéticas de MO de pacientes con SMD y LMA a lo largo de las distintas fases del ciclo celular.

Tanto los SMD como las LMA, constituyen grupos de hemopatías malignas mieloides biológica y clínicamente muy heterogéneos, en los que resulta difícil predecir el comportamiento clínico y la evolución de la enfermedad, incluso cuando se hace uso de los modelos de clasificación diagnóstica y estratificación pronóstica disponibles^{601,625-633}. Por este motivo, resulta necesario identificar nuevos parámetros capaces

de mejorar los modelos predictivos y así, contribuir a un adecuado manejo clínico y terapéutico, adaptado a cada paciente ^{315,316,331,539,634-642}. En este sentido, estudios previos han identificado múltiples parámetros que, como las cifras de hemoglobina, el número de citopenias y/o las necesidades transfusionales^{316,643,644} tienen valor pronóstico en los SMD. Aunque se trata de parámetros dinámicos que reflejan, por ejemplo, la tasa de producción de células eritroides, hasta la fecha no existe en nuestro conocimiento ningún estudio en el que se analice el índice de proliferación de los distintos compartimientos de células hematopoyéticas de MO de pacientes con SMD y su posible impacto pronóstico, aspecto que ha centrado la atención del segundo objetivo de este trabajo doctoral.

En términos generales, en consonancia con otros (dos) trabajos previos, nuestros resultados mostraron que la proliferación global del compartimiento de células de MO de pacientes con SMD estaba significativamente incrementada respecto a la observada en MO normal/reactiva y en la MO de pacientes con LMA ^{645,646}. Globalmente, este incremento se producía sobre todo a expensas de un aumento de la tasa proliferativa de los estadios de maduración más avanzados de los precursores de granulocito neutrófilo (CD11b⁺), lo que probablemente refleja un intento de producir un mayor número de neutrófilos maduros en respuesta a las citopenias periféricas, con el fin de mantener las cifras de los mismos en SP. Sin embargo, un estudio más detallado de la proliferación de las diferentes poblaciones celulares de MO de pacientes con SMD estratificados según su riesgo pronóstico, puso de manifiesto que, mientras que los SMD de bajo riesgo presentaban un incremento significativo de la proliferación celular a expensas de las poblaciones de precursores CD34⁺ no linfoides, de granulocito neutrófilo y de los precursores eritroides, en los SMD de alto riesgo y la LMA, el aumento de la proliferación celular global tiene lugar exclusivamente a expensas de la población de precursores maduros de granulocito neutrófilo CD11b⁺, mostrando incluso las demás poblaciones celulares de MO, un descenso significativo en su tasa proliferativa. Estos hallazgos en pacientes con SMD de alto riesgo y LMA podrían estar relacionados con el incremento de la metilación de algunos genes asociados a la proliferación y maduración hematopoyética, que en condiciones normales y en pacientes con SMD de bajo riesgo (genes no metilados) favorecen la proliferación celular y diferenciación mieloide^{222,322,647-649}. De igual manera, la mayor tasa proliferativa observada en pacientes con SMD de bajo riesgo podría deberse a la sobreexpresión en estos pacientes, de genes reguladores del ciclo celular (p.e.

ciclinas B, C, D₁ y D₂), genes que a su vez están infraexpresados en pacientes con SMD de alto riesgo^{222,646,650,651}. Por otro lado, al igual que sucede en MO reactiva, el incremento proliferativo de los estadios madurativos más avanzados de los precursores de granulocito neutrófilo de MO tanto en pacientes con SMD de bajo riesgo como en SMD de alto riesgo probablemente refleja, ante la existencia de neutropenia, un intento compensatorio de producir un mayor número de células a través de un incremento anormalmente elevado de la capacidad proliferativa de los precursores más diferenciados⁶⁵². En cambio, el descenso de la tasa proliferativa, sumado al bloqueo madurativo de los precursores más inmaduros, sería un hallazgo característico de los SMD de alto riesgo y podría deberse a la aparición de nuevas alteraciones genéticas asociadas a un descenso progresivo de la producción de citocinas y factores de crecimiento por parte del micromedioambiente medular y/o a una falta de respuesta de la propia célula tumoral inmadura a dichos estímulos^{323,354,373,577}. En este sentido, el incremento del porcentaje de progenitores mieloides granulocíticos (CD34⁺ cyMPO⁺) y eritroides (CD34⁺/CD36⁺/CD123^{+débil}) dentro de los precursores CD34⁺ de MO se ha relacionado con SMD de bajo riesgo, mientras que su descenso (o ausencia) se ha asociado a SMD de alto riesgo³⁷³. Estos hallazgos indicarían que el incremento de la tasa de producción (índice proliferativo) de los progenitores CD34⁺ mieloides de línea de granulocito neutrófilo y eritroide, detectable ya desde los estadios más tempranos (CD34⁺) de la diferenciación hematopoyética, podría constituir un reflejo del mecanismo de compensación por parte de la MO, de producir un mayor número de neutrófilos y eritrocitos para mantener la homeostasis de las cifras periféricas de ambos tipos celulares. Por el contrario, la disminución de la tasa proliferativa de los progenitores mieloides y eritroides podría reflejar de forma precoz, la progresión de SMD de bajo riesgo a SMD de alto riesgo y LMA^{132,373,653}. De igual modo, serían indicadores de progresión de SMD de bajo riesgo a SMD de alto riesgo, la adquisición de alteraciones genéticas adicionales y de patrones anómalos de hipermetilación génica en los progenitores inmaduros CD34⁺ y los precursores tempranos de diferentes líneas hematopoyéticas, al limitar su capacidad de proliferación y diferenciación^{132,373,647,652,654}. A su vez, el descenso significativo de la tasa proliferativa de las diferentes poblaciones celulares de MO, excepto la de los precursores de granulocito neutrófilo más diferenciados, podría reflejar también, una pérdida de respuesta a los estímulos de proliferación y diferenciación proporcionados por el micromedioambiente tumoral⁶⁵⁵⁻⁶⁵⁷. De hecho, en pacientes con

SMD/NMP como la LMMC, los patrones de proliferación de los diferentes compartimientos de precursores hematopoyéticos de MO se asemejaron a los observados en SMD de bajo riesgo; la única excepción la constituían los precursores monocíticos, que en pacientes con LMMC mostraban un incremento significativo de su tasa proliferativa respecto a otros SMD. Hallazgos previos sugieren que la sobreexpresión de proteínas moduladoras del ciclo celular como la ciclina D₁, podría ser en parte responsable de este perfil proliferativo tan característico de la LMMC⁶⁴⁶.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que el descenso progresivo de la tasa proliferativa de los diferentes compartimientos de precursores hematopoyéticos de MO se asociaría a estadios más avanzados de la enfermedad y a un mayor riesgo de progresión a LMA. Esto podría ser debido a que los progenitores más inmaduros de MO de pacientes con SMD de bajo riesgo conservan la capacidad de diferenciarse y madurar, mientras que en estadios más avanzados de la enfermedad, incluyendo la LMA, estas células serían incapaces de diferenciarse, perdiendo además su capacidad proliferativa, lo cual originaría un acúmulo progresivo de los mismos en MO, asociado a la aparición de nuevas alteraciones genéticas y epigenéticas que potencialmente les confieren una mayor supervivencia y pérdida de respuesta a los estímulos apoptóticos.

Ante estos resultados, cabía plantearse si la disminución de la tasa proliferativa de los distintos precursores de MO se correlaciona también con otros factores pronósticos conocidos. En este sentido, observamos que la disminución de la tasa proliferativa de los precursores CD34⁺ y de los precursores eritroides, se asociaban de forma especial, con factores pronósticos adversos, incluyendo un mayor número y severidad de las citopenias (anemia y trombocitopenia), niveles más elevados de LDH, incremento de las necesidades transfusionales, alteraciones citogenéticas de mal pronóstico, y una evolución significativamente más desfavorable (disminución de la supervivencia global, asociada a un mayor riesgo de transformación a LMA). Merece destacar que estas asociaciones se mantenían, incluso cuando considerábamos de forma separada los pacientes con SMD de bajo y de alto riesgo. Más aún, el análisis multivariante demostró que, en nuestra serie, el descenso de la tasa proliferativa de los precursores eritroides constituía el parámetro pronóstico de mayor valor predictivo independiente, tanto para la supervivencia global como para la evolución a LMA.

En resumen, nuestros resultados sugieren que el estudio de la tasa proliferativa de los precursores eritroides, junto con la de otros compartimientos de precursores hematopoyéticos de MO como los progenitores CD34⁺ no linfoides y los precursores de granulocito neutrófilo, podrían contribuir a un mejor conocimiento y manejo de los pacientes con SMD, siendo potencialmente útiles a la hora de diferenciar los SMD de bajo y alto riesgo. Además, nuestros resultados muestran también que el análisis de la tasa proliferativa de los precursores CD34⁺ y de los precursores eritroides, podrían constituir factores pronósticos independientes, a la hora de predecir la supervivencia global y la posibilidad de transformación a LMA en SMD de bajo riesgo y en SMD en general, respectivamente.

3. Caracterización de la hematopoyesis residual de pacientes con LMA “*de novo*” al diagnóstico.

La LMA incluye un grupo heterogéneo de hemopatías clonales de pronóstico variable^{658,659}. Dentro de éstas, las LMA secundarias a otras hemopatías o a tratamientos quimioterápicos previos muestran un pronóstico especialmente adverso⁶⁶⁰⁻⁶⁶³. Por este motivo, resulta especialmente relevante distinguir ya en el momento del diagnóstico, entre las LMA “*de novo*” y las LMA secundarias^{659,663-670}. En la última década, a las LMA secundarias a SMD, NMP y tratamientos quimioterápicos^{321,395,671} se ha añadido un tercer subgrupo de LMA de mal pronóstico, caracterizado por la existencia de cambios morfológicos y/o citogenéticos típicos de mielodisplasia (LMA-MRC) en >50% de las células de ≥ 2 o más líneas mieloides, en ausencia de antecedentes de mielodisplasia, y cuyo pronóstico es significativamente peor que en el de las demás LMA “*de novo*”^{291,658,669,672-675}. Sin embargo, un porcentaje importante de los pacientes que se clasifican como LMA “*de novo*” y que por lo tanto no llegan a cumplir rigurosamente los criterios que definen la LMA-MRC, presentan alteraciones morfológicas y/o inmunofenotípicas evidentes, sugerentes de la presencia de una hematopoyesis clonal subyacente⁶⁷⁶. En este trabajo investigamos la posible naturaleza clonal de distintos compartimientos de células hematopoyéticas residuales de pacientes con LMA o MPAL “*de novo*” según los criterios de la OMS de 2008³²¹

En la inmensa mayoría de los adultos con LMA y MPAL "de novo" que estudiamos, constatamos la existencia de una hematopoyesis residual con rasgos de clonalidad, definidos por la presencia de alteraciones citogenéticas recurrentes asociadas a LMA, SMD y/o NMP y/o un patrón clonal de inactivación del cromosoma X mediante el test HUMARA, en los precursores de granulocito neutrófilo, monocito y/o de la serie eritroide. Merece destacar que las LMA/MPAL que presentaban rasgos de hematopoyesis residual clonal se distribuían por la práctica totalidad de los subtipos diagnósticos de LMA establecidos por la clasificación de la OMS de 2008, incluyendo LMA con alteraciones genéticas recurrentes y las LMA-NOS (del inglés "not otherwise specified"), además de las LMA-MRC. Estos resultados sugieren que probablemente la gran mayoría de las LMA y MPAL del adulto se desarrollan sobre una MO en la que la hematopoyesis residual normal ya ha sido reemplazada previamente por una hematopoyesis clonal. La presencia de alteraciones citogenéticas compartidas en los blastos y en las células que maduran a los diferentes compartimientos mieloides residuales de MO⁶⁷⁷⁻⁶⁸⁶, apoyarían la hipótesis de que dichas lesiones aparecerían en un precursor mielóide inmaduro común a ambos grupos de células, al menos en un porcentaje elevado de las LMA y MPAL del adulto, y en algunos casos de mastocitosis sistémicas que desarrollaron una LMA (SM-AHNMD)^{350,545,549,658,660,687-690}, en los que los mastocitos tumorales compartían las mismas alteraciones (cito)genéticas que los blastos mieloides. Sin embargo, cabe señalar que muchas de las alteraciones genéticas/moleculares encontradas en estos pacientes no son por sí solas suficientes para desarrollar una LMA, debido a que esas mismas alteraciones se han detectado en pacientes con SMD y NMP, e incluso en individuos sanos de edad avanzada^{222,316,350,658,660,667,669,691-693}.

A pesar de todo lo anterior, y de la elevada frecuencia con la que demostramos la naturaleza clonal de la hematopoyesis residual en pacientes con LMA, cabe señalar que la determinación de clonalidad en base a la presencia de las alteraciones citogenéticas recurrentes más frecuentes en hemopatías mieloides malignas como los SMD, aunque es válida para la mayoría de los pacientes, no constituye un marcador universal de clonalidad, ya que estas alteraciones están presentes únicamente en el 70-80% de los pacientes^{348,350}. De acuerdo con ello, en nuestra serie, 3 de los 14 varones diagnosticados de LMA-MRC no presentaron alteraciones citogenéticas asociadas a SMD en ninguna de las poblaciones de células hematopoyéticas residuales de MO analizadas; por el contrario, todas las mujeres que estudiamos con LMA-

MRC que estudiamos, mostraron un patrón de inactivación del cromosoma X en los compartimientos de células hematopoyéticas residuales analizados, aun cuando no presentaban ninguna de las alteraciones citogenéticas recurrentes que se observan con mayor frecuencia en SMD. De igual modo, la ausencia de marcadores citogenéticos comunes a los blastos leucémicos y las células hematopoyéticas residuales, no descarta la naturaleza clonal de éstas últimas ni un origen común para ambas poblaciones, ya que los blastos leucémicos y las células hematopoyéticas residuales de MO podrían compartir otras alteraciones moleculares que no fueron analizadas en nuestro trabajo^{222,316,350,658,660,667,669,691-693}. En este sentido, nuestros hallazgos ponen de manifiesto la necesidad de identificar nuevos marcadores de clonalidad más sensibles y específicos que permitan establecer con mayor precisión si cabe, la posible relación existente entre los blastos leucémicos y las células hematopoyéticas residuales de MO de pacientes con LMA y MPAL “*de novo*”.

En este campo, los estudios inmunofenotípicos por citometría de flujo se presentan como una herramienta válida, debido por un lado a la sensibilidad elevada de la técnica para detectar fenotipos aberrantes característicos de SMD^{132,370,372,373,389,390,607,694-696}, y por otra parte, a la especificidad de dichos fenotipos aberrantes a la hora de identificar clonalidad^{371,380,381,607}. De acuerdo con ello, en nuestra serie observamos una asociación significativa entre la presencia de hematopoyesis clonal y patrones fenotípicos alterados similares a los detectados en SMD y NMP¹³². Así, mientras las células mieloides residuales de MO de pacientes con LMA “*de novo*” en los que la hematopoyesis residual no mostró rasgos clonales, apenas presentaban alteraciones fenotípicas, los pacientes con LMA y hematopoyesis residual clonal mostraron un número significativamente mayor de aberraciones fenotípicas, tanto al considerar el número de poblaciones de precursores hematopoyéticos que mostraban fenotipos aberrantes, como al tener en cuenta el promedio de anomalías fenotípicas detectadas en cada uno de los ellos. De este modo, la citometría de flujo podría proporcionar información complementaria a la de la morfología convencional en aquellas LMA “*de novo*” en las que las técnicas citomorfológicas no fueran lo suficientemente sensibles para establecer el diagnóstico de LMA-MRC^{394,395,603,688}. No obstante, cabe señalar que, de los pacientes incluidos en nuestra serie, tres mostraron ausencia de marcadores citogenéticos de clonalidad con un test HUMARA no concluyente; los tres pacientes presentaban patrones fenotípicos característicos de SMD en todos los

compartimientos mieloides analizados, habiendo sido todos ellos previamente clasificados, atendiendo a sus características citomorfológicas, dentro del grupo de LMA–MRC. Estos hallazgos apoyan aún más si cabe, la posible utilidad del inmunofenotipado por citometría de flujo a la hora de incrementar la sensibilidad de la morfología en el diagnóstico de las LMA con rasgos displásicos, en los que los resultados de esta última técnica no sean concluyentes.

En resumen, nuestros resultados demuestran que la gran mayoría de las LMA y MPAL “*de novo*”, se asientan sobre una hematopoyesis residual de naturaleza clonal, independientemente del subtipo diagnóstico OMS de la enfermedad. Además, los blastos leucémicos y las poblaciones de células mieloides residuales de MO, con relativa frecuencia comparten alteraciones citogenéticas, lo cual sugiere un origen común para ambos grupos de células. Merece destacar además que la presencia de una hematopoyesis residual clonal se ha asociado a una mayor prevalencia y número de aberraciones fenotípicas, sugiriendo que éstas podrían contribuir a un diagnóstico precoz de la enfermedad.

4. Vías de evolución clonal y transformación maligna en un modelo de hemopatía maligna mieloide: la MS–AHNMD.

La coexistencia de mastocitos clonales y una hemopatía maligna que involucra células diferentes del mastocito, constituye un hallazgo relativamente frecuente entre pacientes diagnosticados de MS (5%–40% según las series analizadas)^{514,515,549}. Esto hace que la MS–AHNMD sea reconocida como una entidad diagnóstica independiente en la clasificación de la OMS de 2008 (revisada en 2016) de las mastocitosis sistémicas, dentro de los subtipos de enfermedad avanzada asociada a peor pronóstico^{514,524,545,549}. A pesar de ello, la MS–AHNMD sigue constituyendo un grupo muy heterogéneo de enfermedades, en las que distintos tipos de MS (indolente vs. agresiva) pueden coexistir con una o varias hemopatías malignas linfoides o mieloides de buen o mal pronóstico (p.ej. MBL vs. LLC, GMSI vs. MM, y CHIP vs. SMD, NMP y LMA, respectivamente)^{514,524,545,549}. De acuerdo con lo descrito en la literatura^{515,545,549,550}, nuestros resultados mostraron que dentro de las MS–AHNMD, las formas indolentes de MS se asociaban con mayor frecuencia

a hemopatías linfoides (SLPC-B, GMSI y MM), mientras que las formas agresivas de MS se asociaron en su mayoría con hemopatías malignas mieloides (SMD, NMP, SMD/NMP y LMA).

En la actualidad se considera que el tipo de MS y la AHNMD concreta a la que ésta se asocia, constituyen los factores pronósticos más relevantes en la MS-AHNMD^{549,550}. Por el contrario, aunque algunos trabajos han descrito el perfil genético y molecular global de la enfermedad^{545,555}, apenas existe referencia en la literatura acerca de la posible relación existente entre los perfiles genéticos de los distintos componentes tumorales (MS y AHNMD) de la MS-AHNMD. En este trabajo, investigamos de forma sistemática en un grupo de 65 pacientes con MS-AHNMD, la presencia de la mutación D816V de *KIT* y de las alteraciones citogenéticas características de la AHNMD, en ambos compartimientos tumorales, observando tres perfiles genéticos principales. Así, un primer grupo de pacientes se caracterizaba por la ausencia de marcadores de clonalidad comunes en los compartimientos de células tumorales correspondientes a la MS y la AHNMD, lo cual sugiere la ausencia de un vínculo genético común entre ambas hemopatías, y un origen en células progenitoras distintas. Un segundo grupo de pacientes con MS-AHNMD, compartía la mutación D816V de *KIT* en ambas poblaciones de células tumorales (MS y AHNMD), sugiriendo que éstas podrían tener un origen en un precursor mieloide común a la MS y la AHNMD, portador ya de la mutación D816V de *KIT*. Finalmente, el tercer grupo de pacientes, menos numeroso, se caracterizaba por la presencia de alteraciones citogenéticas/moleculares características de AHNMD en ambos compartimientos de células tumorales (MS y AHNMD), coexistiendo estas alteraciones también frecuentemente, con la mutación de *KIT*.

Desde hace tiempo se cree que la coexistencia de MS y AHNMD no se produce de forma aleatoria^{522,545,549,561}. En este sentido se conoce que ambas hemopatías pueden estar presentes ya en el momento diagnóstico de la enfermedad, o aparecer a lo largo de la evolución de la misma, especialmente en pacientes con MS que progresan a MS-AHNMD^{520,549,550}. Estudios recientes muestran una estrecha asociación entre un mayor grado de afectación de los diferentes compartimientos celulares hematopoyéticos de MO por la mutación D816V de *KIT* y un riesgo incrementado de progresión desde formas indolentes de MS a formas más agresivas de la enfermedad, incluyendo la MS-AHNMD^{515,520,522,527,545,549,550,561,697}. Así, la presencia de la mutación D816V de *KIT* en precursores

hematopoyéticos tempranos (p.ej. en la célula *stem* hematopoyética y en la célula *stem* mesenquimal) se ha asociado de forma significativa con el desarrollo de una hemopatía maligna, principalmente con hemopatías mieloides malignas y formas agresivas de MS^{527,541,563,592,698,699}. De acuerdo con estos hallazgos, nuestros resultados mostraron que la mayoría de los pacientes con MS-AHNMD que exhibían la mutación D816V de *KIT* tanto en las células hematopoyéticas tumorales de la MS como de la AHNMD, e incluso en otras células residuales de MO (p.ej. en granulocitos neutrófilos, monocitos, precursores eritroides y/o linfocitos) presentaban de forma casi sistemática una MSA asociada a hemopatías mieloides, principalmente SMD, SMD/NMP y en menor medida, NMP y LMA. Más aún, aquellos pacientes en los que ambos compartimientos de células tumorales (MS y AHNMD) compartían tanto alteraciones citogenéticas típicas de la AHNMD como la mutación D816V de *KIT*, esta última alteración estaba presente en prácticamente todos los compartimientos de células hematopoyéticas residuales mieloides y linfoides. Estos hallazgos sugieren que, en estos casos, la mutación D816V de *KIT* podría aparecer ya en los precursores hematopoyéticos más inmaduros. En contraposición con esta hipótesis, algunos autores han sugerido recientemente que en pacientes con MS-AHNMD la mutación D816V de *KIT* probablemente se adquiriría en una célula progenitora en estadios de diferenciación hematopoyética relativamente avanzados, y que sería portadora ya de otras alteraciones moleculares típicas de la AHNMD, incluyendo mutaciones de *ASXL1*, *CBL*, *ETV6*, *EZH2*, *IDH2*, *JAK2*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *TET2* y *U2AF1* entre otras anomalías^{523,552,554,555}.

En relación con lo anteriormente expuesto, merece destacar que un grupo relativamente importante de nuestros pacientes con MS-AHNMD, carecía de lesiones genéticas típicas de la AHNMD. Sin embargo, en estos pacientes, y especialmente en los casos de MS asociada a una AHNMD mieloide (SMD, SMD/NPM y LMA) se estudiaron un número relativamente limitado de alteraciones citogenéticas sin llegar a investigarse otras mutaciones (p.ej. *CBL*, *IDH1/2*, *JAK2*, *KRAS*, *MLL-PTD*, *NRAS*, *SRSF2*, *SF3B1*, *SETBP1*, *U2AF1*, *EZH2*, *ETV6*, *NMP1*, *ASXL1* y *TET2* entre otros genes.) asociadas a estas hemopatías^{523,552}. Por este motivo no podemos asegurar que no existan marcadores genéticos comunes a ambos compartimientos de células tumorales, y que en estos casos dichos compartimientos tumorales no tengan un origen común, siendo necesario realizar una caracterización genotípica ampliada de estos casos en la que se incluyan los

marcadores genéticos anteriormente mencionados (actualmente en desarrollo en nuestro laboratorio). Aun así, cabe señalar que un grupo importante de las MS-AHNMD estudiadas que no mostraban un perfil genotípico común a la MS y a la AHNMD correspondían a pacientes en los que coexistían una AHNMD linfoide y una MSI, lo cual sugiere que al menos en estos casos, ambas enfermedades (SM y AHNMD) podrían tener un origen genético distinto.

Desde un punto de vista clínico, los pacientes con MS-AHNMD cuyos compartimientos de células tumorales (MS y AHNMD) no compartían alteraciones genéticas/moleculares, presentaban con mayor frecuencia sintomatología típica de MSI (p.ej. presencia de lesiones cutáneas y crisis anafilácticas), mientras que en los demás pacientes, especialmente en aquellos que además de mostrar alteraciones genéticas/moleculares compartidas entre ambos grupos de células tumorales presentaban MSA y hemopatías mieloides malignas, se caracterizaron por presentar niveles significativamente más elevados de triptasa sérica, mayor afectación orgánica, con niveles más elevados de creatinina y mayor frecuencia de esplenomegalia.

Desde un punto de vista pronóstico, los pacientes con MS-AHNMD en los que las células tumorales de la MS y de la AHNMD compartían la mutación D816V de *KIT* y/o alteraciones genéticas típicas de AHNMD, mostraron una supervivencia significativamente acortada respecto a aquellos pacientes con MS-AHNMD cuyas células tumorales no compartían alteraciones genéticas/moleculares. Merece destacar que el impacto pronóstico de los patrones genotípicos detectados en los pacientes con MS-AHNMD, afectaba tanto a la supervivencia global como a la supervivencia libre de enfermedad, con independencia del subtipo concreto de MS y AHNMD. Este impacto pronóstico se reproducía incluso al considerar de forma exclusiva aquellos pacientes con SM asociada a SMD/NMP.

En resumen, nuestros resultados confirman que la MS-AHNMD constituye un subtipo de MS biológica, genética y clínicamente muy heterogéneo. Además, el comportamiento de la enfermedad y la evolución del paciente con MS-AHNMD dependería en gran medida del perfil genético subyacente en las distintas poblaciones de células tumorales que coexisten en cada paciente, además de los subtipos concretos de MS (indolente vs. agresiva) y de la AHNMD (LMA vs. SMD/NMP vs. SLPCB y GMSI). Estos

hallazgos abren nuevas perspectivas a la hora de identificar las vías de evolución clonal de otras hemopatías malignas, especialmente de hemopatías malignas mieloides como los SMD, SMD/NMP, NMP y la LMA.

CAPÍTULO V.

Conclusiones.

En relación con la tasa proliferativa de los distintos compartimientos celulares de MO normal y de MO de pacientes con citopenias reactivas:

1. En conjunto, nuestros hallazgos muestran que la tasa proliferativa de los diferentes compartimientos de células hematopoyéticas de MO normal varía de forma significativa entre distintas líneas hematopoyéticas y sus estadios madurativos. Así, los precursores más inmaduros (CD34+) y eritroides son los que muestran mayor tasa proliferativa, mientras que los linfocitos maduros, los granulocitos neutrófilos y los monocitos constituyen los compartimientos celulares con menor proliferación.

2. Globalmente, no se observan diferencias significativas en la tasa proliferativa de la MO normal y de la MO de pacientes con citopenias reactivas; no obstante, en estas últimas se observó un incremento significativo de la proliferación en los estadios más avanzados de diferenciación a granulocito neutrófilo, acompañado de un descenso de la proliferación del compartimiento de precursores CD34+, lo cual podría reflejar un intento por mantener las cifras periféricas de estas células en pacientes con citopenias.

En relación con la tasa proliferativa de los diferentes compartimientos celulares de MO de pacientes con SMD y LMA:

3. En términos generales, la tasa proliferativa de la MO de pacientes con SMD se encuentra elevada respecto tanto a MO normal como a MO de pacientes con LMA, debiéndose dicho incremento de forma especial al aumento del índice proliferativo de los precursores CD34+ y de los precursores eritroides.

4. Aunque en general los SMD mostraron una tasa proliferativa elevada en MO, existen importantes diferencias entre los SMD de bajo riesgo y los SMD de alto riesgo. Así, mientras que en los SMD de bajo riesgo existe un aumento de la proliferación de los precursores CD34+ no linfoides, los precursores

de granulocito neutrófilo y los precursores eritroides, en los SMD de alto riesgo y las LMA el aumento del índice proliferativo se restringe a los precursores de granulocito neutrófilo más maduros; estas diferencias probablemente reflejan una pérdida progresiva de la capacidad de diferenciación y de respuesta a los mecanismos de regulación normal de las cifras periféricas de células hematopoyéticas.

5. Desde el punto de vista pronóstico, el incremento de la tasa proliferativa de los precursores eritroides de MO, y en menor medida también de los precursores CD34⁺, mostró un impacto favorable a la hora de predecir la supervivencia de pacientes con SMD y su riesgo de transformación a LMA, respectivamente; sugiriendo que el estudio del índice proliferativo de la línea eritroide, y de los precursores hematopoyéticos CD34⁺ de MO, podría contribuir a una mejor estratificación pronóstica de los SMD.

En relación con la posible naturaleza clonal de la hematopoyesis residual de MO de pacientes con LMA y MPAL “*de novo*”:

6. La mayoría de las LMA y MPAL “*de novo*” del adulto muestran rasgos genéticos, moleculares e inmunofenotípicos sugerentes de clonalidad, en diferentes compartimientos de células hematopoyéticas residuales de MO, además de los blastos, sugiriendo que en estos pacientes, la LMA/MPAL se establecería sobre una MO cuya hematopoyesis normal ya ha sido reemplazada previamente por una hematopoyesis clonal que podría haber pasado clínicamente inadvertida.

7. Los blastos leucémicos y las células hematopoyéticas residuales clonales de MO de adultos con LMA y MPAL “*de novo*”, con frecuencia comparten alteraciones genéticas y moleculares, lo cual apoyaría un origen común para ambos compartimientos celulares.

8. La presencia de una hematopoyesis clonal residual en la MO de adultos con LMA y MPAL “*de novo*” se asocia a una mayor prevalencia y un mayor número de aberraciones fenotípicas en los precursores eritroides, monocíticos y de granulocito neutrófilo residuales, sugiriendo que el inmunofenotipado por citometría de flujo podría contribuir a un diagnóstico precoz de afectación clonal de la hematopoyesis residual en estos pacientes.

En relación con los patrones de alteraciones moleculares y las vías de evolución clonal presentes en distintos compartimientos de células tumorales de pacientes con mastocitosis sistémica asociada a otras hemopatías, y su impacto en el comportamiento clínico y biológico de la enfermedad:

9. Nuestros resultados confirman y amplían hallazgos previos de otros autores que sugieren que la MS-AHNMD constituye un grupo heterogéneo de enfermedades con un comportamiento clínico, genético y pronóstico variable, determinado en parte por las diferentes vías de evolución clonal subyacentes y los subtipos concretos de MS y AHNMD que coexisten en cada paciente.

Bibliografía.

1. Baldrige MT, King KY, Goodell MA. Inflammatory signals regulate hematopoietic stem cells. *Trends Immunol.* 2011;32(2):57-65.
2. Espin-Palazon R, Stachura DL, Campbell CA, et al. Proinflammatory signaling regulates hematopoietic stem cell emergence. *Cell.* 2014;159(5):1070-1085.
3. Manzo VE, Bhatt AS. The human microbiome in hematopoiesis and hematologic disorders. *Blood.* 2015;126(3):311-318.
4. Fares I, Chagraoui J, Gareau Y, et al. Cord blood expansion. Pyrimidoindole derivatives are agonists of human hematopoietic stem cell self-renewal. *Science.* 2014;345(6203):1509-1512.
5. Huang HT, Kathrein KL, Barton A, et al. A network of epigenetic regulators guides developmental haematopoiesis in vivo. *Nat Cell Biol.* 2013;15(12):1516-1525.
6. Mikkola HK, Orkin SH. The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development.* 2006;133(19):3733-3744.
7. Liang HC, Zúñiga-Pflücker JC. Hematopoiesis: from start to immune reconstitution potential. *Stem cell research & therapy.* 2015;6:52.
8. Sturgeon CM, Ditadi A, Awong G, Kennedy M, Keller G. Wnt signaling controls the specification of definitive and primitive hematopoiesis from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 2014;32(6):554-561.
9. Yang X, Gong Y, Friesel R. Spry1 is expressed in hemangioblasts and negatively regulates primitive hematopoiesis and endothelial cell function. *PLoS One.* 2011;6(4):e18374.
10. Xu MJ, Tsuji K, Ueda T, et al. Stimulation of mouse and human primitive hematopoiesis by murine embryonic aorta-gonad-mesonephros-derived stromal cell lines. *Blood.* 1998;92(6):2032-2040.
11. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell.* 2008;132(4):631-644.
12. Orkin SH, Zon LI. SnapShot: hematopoiesis. *Cell.* 2008;132(4):712.
13. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis and stem cells: plasticity versus developmental heterogeneity. *Nat Immunol.* 2002;3(4):323-328.
14. Paik EJ, Zon LI. Hematopoietic development in the zebrafish. *Int J Dev Biol.* 2010;54(6-7):1127-1137.
15. Muller AM, Medvinsky A, Strouboulis J, Grosveld F, Dzierzak E. Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity.* 1994;1(4):291-301.
16. Morgan K, Kharas M, Dzierzak E, Gilliland DG. Isolation of early hematopoietic stem cells from murine yolk sac and AGM. *J Vis Exp.* 2008(16).
17. Fu JR, Liu WL, Zhou JF, et al. [Role of the sonic hedgehog pathway in regulation of the proliferation, migration and differentiation of hemangioblast derived from AGM]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* 2007;28(11):757-761.
18. Charbord P. Mesenchymal lineage potentials of AGM stromal clones. *Haematologica.* 2006;91(9):1153B.
19. Tian F, Liu AL. [AGM region and hematopoiesis during ontogeny--review]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2005;13(1):164-168.
20. Orelia C, Harvey KN, Miles C, Oostendorp RA, van der Horn K, Dzierzak E. The role of apoptosis in the development of AGM hematopoietic stem cells revealed by Bcl-2 overexpression. *Blood.* 2004;103(11):4084-4092.
21. Jagannathan-Bogdan M, Zon LI. Hematopoiesis. *Development.* 2013;140(12):2463-2467.
22. Tavian M, Biasch K, Sinka L, Vallet J, Peault B. Embryonic origin of human hematopoiesis. *Int J Dev Biol.* 2010;54(6-7):1061-1065.
23. Tavian M, Cortes F, Charbord P, Labastie MC, Peault B. Emergence of the haematopoietic system in the human embryo and foetus. *Haematologica.* 1999;84 Suppl EHA-4:1-3.
24. Labastie MC, Cortes F, Romeo PH, Dulac C, Peault B. Molecular identity of hematopoietic precursor cells emerging in the human embryo. *Blood.* 1998;92(10):3624-3635.
25. Kennedy M, Keller GM. Hematopoietic commitment of ES cells in culture. *Methods Enzymol.* 2003;365:39-59.
26. Tavian M, Hallais MF, Peault B. Emergence of intraembryonic hematopoietic precursors in the pre-liver human embryo. *Development.* 1999;126(4):793-803.

27. Cheson BD, Greenberg PL, Bennett JM, et al. Clinical application and proposal for modification of the International Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia. *Blood*. 2006;108(2):419-425.
28. Zovein AC, Hofmann JJ, Lynch M, et al. Fate tracing reveals the endothelial origin of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2008;3(6):625-636.
29. Rybtsov S, Sobiesiak M, Taoudi S, et al. Hierarchical organization and early hematopoietic specification of the developing HSC lineage in the AGM region. *J Exp Med*. 2011;208(6):1305-1315.
30. Ivanovs A, Rybtsov S, Welch L, Anderson RA, Turner ML, Medvinsky A. Highly potent human hematopoietic stem cells first emerge in the intraembryonic aorta-gonad-mesonephros region. *J Exp Med*. 2011;208(12):2417-2427.
31. Boulais PE, Frenette PS. Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood*. 2015;125(17):2621-2629.
32. Jaffredo T, Lempereur A, Richard C, et al. Dorso-ventral contributions in the formation of the embryonic aorta and the control of aortic hematopoiesis. *Blood Cells Mol Dis*. 2013;51(4):232-238.
33. McGrath KE, Palis J. Hematopoiesis in the yolk sac: more than meets the eye. *Exp Hematol*. 2005;33(9):1021-1028.
34. Calvi LM, Link DC. The hematopoietic stem cell niche in homeostasis and disease. *Blood*. 2015;126(22):2443-2451.
35. Challier JC, Galtier M, Cortez A, Bintein T, Rabreau M, Uzan S. Immunocytological evidence for hematopoiesis in the early human placenta. *Placenta*. 2005;26(4):282-288.
36. Christensen JL, Wright DE, Wagers AJ, Weissman IL. Circulation and chemotaxis of fetal hematopoietic stem cells. *PLoS Biol*. 2004;2(3):E75.
37. Sankaran VG, Orkin SH. Genome-wide association studies of hematologic phenotypes: a window into human hematopoiesis. *Curr Opin Genet Dev*. 2013;23(3):339-344.
38. Vo LT, Daley GQ. De novo generation of HSCs from somatic and pluripotent stem cell sources. *Blood*. 2015;125(17):2641-2648.
39. Álvarez-Errico D, Vento-Tormo R, Sieweke M, Ballestar E. Epigenetic control of myeloid cell differentiation, identity and function. *Nature reviews Immunology*. 2015;15(1):7-17.
40. Galloway JL, Wingert RA, Thisse C, Thisse B, Zon LI. Loss of Gata1 but Not Gata2 Converts Erythropoiesis to Myelopoiesis in Zebrafish Embryos. *Developmental Cell*. 2005;8(1):109-116.
41. Dahl R, Iyer SR, Owens KS, Cuylear DD, Simon MC. The Transcriptional Repressor GFI-1 Antagonizes PU.1 Activity through Protein-Protein Interaction. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(9):6473-6483.
42. Querfurth E, Schuster M, Kulesa H, et al. Antagonism between C/EBPbeta and FOG in eosinophil lineage commitment of multipotent hematopoietic progenitors. *Genes Dev*. 2000;14(19):2515-2525.
43. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2007;446(7137):758-764.
44. Huang H-TT, Kathrein KL, Barton A, et al. A network of epigenetic regulators guides developmental haematopoiesis in vivo. *Nature cell biology*. 2013;15(12):1516-1525.
45. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978;4(1-2):7-25.
46. Hoggatt J, Scadden DT. The stem cell niche: tissue physiology at a single cell level. *J Clin Invest*. 2012;122(9):3029-3034.
47. Bianco P. Bone and the hematopoietic niche: a tale of two stem cells. *Blood*. 2011;117(20):5281-5288.
48. Taichman RS. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood*. 2005;105(7):2631-2639.
49. van Pel M, Fibbe WE, Schepers K. The human and murine hematopoietic stem cell niches: are they comparable? *Ann N Y Acad Sci*. 2015.
50. Sugiyama T, Nagasawa T. Bone marrow niches for hematopoietic stem cells and immune cells. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2012;11(3):201-206.
51. Huang MM, Zhu J. The regulation of normal and leukemic hematopoietic stem cells by niches. *Cancer Microenviron*. 2012;5(3):295-305.
52. Chotinantakul K, Leeansaksiri W. Hematopoietic stem cell development, niches, and signaling pathways. *Bone Marrow Res*. 2012;2012:270425.

53. Flores-Figueroa E, Montesinos JJ, Mayani H. [Mesenchymal stem cell; history, biology and clinical application]. *Rev Invest Clin.* 2006;58(5):498-511.
54. Mayani H, Guilbert LJ, Janowska-Wieczorek A. Biology of the hemopoietic microenvironment. *Eur J Haematol.* 1992;49(5):225-233.
55. Deryugina EI, Muller-Sieburg CE. Stromal cells in long-term cultures: keys to the elucidation of hematopoietic development? *Crit Rev Immunol.* 1993;13(2):115-150.
56. Li J, Sensebe L, Herve P, Charbord P. Nontransformed colony-derived stromal cell lines from normal human marrows. III. The maintenance of hematopoiesis from CD34+ cell populations. *Exp Hematol.* 1997;25(7):582-591.
57. Teixido J, Hemler ME, Greenberger JS, Anklesaria P. Role of beta 1 and beta 2 integrins in the adhesion of human CD34hi stem cells to bone marrow stroma. *J Clin Invest.* 1992;90(2):358-367.
58. Arai F, Hirao A, Ohmura M, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell.* 2004;118(2):149-161.
59. Yoder MC, Williams DA. Matrix molecule interactions with hematopoietic stem cells. *Exp Hematol.* 1995;23(9):961-967.
60. Gordon MY. Extracellular matrix of the marrow microenvironment. *Br J Haematol.* 1988;70(1):1-4.
61. Almeida-Porada G, Brown RL, MacKintosh FR, Zanjani ED. Evaluation of serum-free culture conditions able to support the ex vivo expansion and engraftment of human hematopoietic stem cells in the human-to-sheep xenograft model. *J Hematother Stem Cell Res.* 2000;9(5):683-693.
62. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature.* 2003;425(6960):841-846.
63. Lataillade JJ, Clay D, Bourin P, et al. Stromal cell-derived factor 1 regulates primitive hematopoiesis by suppressing apoptosis and by promoting G(0)/G(1) transition in CD34(+) cells: evidence for an autocrine/paracrine mechanism. *Blood.* 2002;99(4):1117-1129.
64. Dorshkind K. Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Annu Rev Immunol.* 1990;8:111-137.
65. Gimble JM, Robinson CE, Wu X, Kelly KA. The function of adipocytes in the bone marrow stroma: an update. *Bone.* 1996;19(5):421-428.
66. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell.* 2007;131(2):324-336.
67. Tormin A, Li O, Brune JC, et al. CD146 expression on primary nonhematopoietic bone marrow stem cells is correlated with in situ localization. *Blood.* 2011;117(19):5067-5077.
68. Kobayashi H, Butler JM, O'Donnell R, et al. Angiocrine factors from Akt-activated endothelial cells balance self-renewal and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nature cell biology.* 2010;12(11):1046-1056.
69. Butler JM, Nolan DJ, Vertes EL, et al. Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2010;6(3):251-264.
70. Brown DC, Gatter KC. The bone marrow trephine biopsy: a review of normal histology. *Histopathology.* 1993;22(5):411-422.
71. Zhang J, Niu C, Ye L, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature.* 2003;425(6960):836-841.
72. Yoshihara H, Arai F, Hosokawa K, et al. Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell.* 2007;1(6):685-697.
73. Zhang CC, Kaba M, Ge G, et al. Angiopoietin-like proteins stimulate ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Nat Med.* 2006;12(2):240-245.
74. Sipkins DA, Wei X, Wu JW, et al. In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. *Nature.* 2005;435(7044):969-973.
75. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell.* 2005;121(7):1109-1121.
76. Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature.* 2010;466(7308):829-834.
77. Omatsu Y, Sugiyama T, Kohara H, et al. The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity.* 2010;33(3):387-399.

78. Nagasawa T, Omatsu Y, Sugiyama T. Control of hematopoietic stem cells by the bone marrow stromal niche: the role of reticular cells. *Trends Immunol.* 2011;32(7):315-320.
79. Nagasawa T. [Bone and Stem Cells. Bone marrow microenvironment niches for hematopoietic stem and progenitor cells]. *Clin Calcium.* 2014;24(4):517-526.
80. Nagasawa T. [Bone and marrow niches for hematopoiesis]. *Clin Calcium.* 2012;22(11):1659-1667.
81. Berrueta L, Solórzano, Eduvigis, Bahsas Zaky, Rima, Padrón, Karla, Soto Parra, Mabel, Salmen, Siham, Valencia Molina, Juan Camilo, Barboza, Luisa, Terán Angel, Guillermo, Paredes, Eddy Alexandra, Calderón, Ali, Volcanes, Ingrid, Silva Gutierrez, Nubia, Olávez, Daniela, Rondon, Miguel,. Células progenitoras pluripotenciales: Características y compartimientos especializados de residencia. *Avances en Biomedicina* 2013(1):12.
82. Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood.* 1993;81(11):2844-2853.
83. MM W. Clinical Hematology (ed 8); 1981.
84. Parmar K, Mauch P, Vergilio JA, Sackstein R, Down JD. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(13):5431-5436.
85. Seita J, Ema H, Ooehara J, et al. Lnk negatively regulates self-renewal of hematopoietic stem cells by modifying thrombopoietin-mediated signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2007;104(7):2349-2354.
86. Ema H, Suda T. Two anatomically distinct niches regulate stem cell activity. *Blood.* 2012;120(11):2174-2181.
87. Ding L, Saunders TL, Enikolopov G, Morrison SJ. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature.* 2012;481(7382):457-462.
88. Seita J, Weissman IL. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2010;2(6):640-653.
89. Seita J, Ema H, Ooehara J, et al. Lnk negatively regulates self-renewal of hematopoietic stem cells by modifying thrombopoietin-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(7):2349-2354.
90. Batard P, Monier MN, Fortunel N, et al. TGF-(beta)1 maintains hematopoietic immaturity by a reversible negative control of cell cycle and induces CD34 antigen up-modulation. *J Cell Sci.* 2000;113 (Pt 3):383-390.
91. Clements WK, Traver D. Signalling pathways that control vertebrate haematopoietic stem cell specification. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(5):336-348.
92. Yamazaki S, Iwama A, Takayanagi S, Eto K, Ema H, Nakauchi H. TGF-beta as a candidate bone marrow niche signal to induce hematopoietic stem cell hibernation. *Blood.* 2009;113(6):1250-1256.
93. Puri MC, Bernstein A. Requirement for the TIE family of receptor tyrosine kinases in adult but not fetal hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(22):12753-12758.
94. Beerman I, Maloney WJ, Weissmann IL, Rossi DJ. Stem cells and the aging hematopoietic system. *Curr Opin Immunol.* 2010;22(4):500-506.
95. Simsek T, Kocabas F, Zheng J, et al. The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell.* 2010;7(3):380-390.
96. Guan JL, Simon AK, Prescott M, et al. Autophagy in stem cells. *Autophagy.* 2013;9(6):830-849.
97. Suda T, Takubo K, Semenza GL. Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell Stem Cell.* 2011;9(4):298-310.
98. Maryanovich M, Gross A. A ROS rheostat for cell fate regulation. *Trends Cell Biol.* 2013;23(3):129-134.
99. Cain CJ, Manilay JO. Hematopoietic stem cell fate decisions are regulated by Wnt antagonists: comparisons and current controversies. *Exp Hematol.* 2013;41(1):3-16.
100. Blank U, Karlsson G, Karlsson S. Signaling pathways governing stem-cell fate. *Blood.* 2008;111(2):492-503.
101. Karanu FN, Murdoch B, Gallacher L, et al. The notch ligand jagged-1 represents a novel growth factor of human hematopoietic stem cells. *J Exp Med.* 2000;192(9):1365-1372.
102. Holland JD, Klaus A, Garratt AN, Birchmeier W. Wnt signaling in stem and cancer stem cells. *Curr Opin Cell Biol.* 2013;25(2):254-264.
103. Miharada K, Karlsson G, Rehn M, et al. Hematopoietic stem cells are regulated by Cripto, as an intermediary of HIF-1alpha in the hypoxic bone marrow niche. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1266:55-62.

104. Cheng T, Shen H, Rodrigues N, Stier S, Scadden DT. Transforming growth factor beta 1 mediates cell-cycle arrest of primitive hematopoietic cells independent of p21(Cip1/Waf1) or p27(Kip1). *Blood*. 2001;98(13):3643-3649.
105. Scandura JM, Bocconi P, Massague J, Nimer SD. Transforming growth factor beta-induced cell cycle arrest of human hematopoietic cells requires p57KIP2 up-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(42):15231-15236.
106. Beerman I, Maloney WJ, Weissmann IL, Rossi DJ. Stem cells and the aging hematopoietic system. *Current Opinion in Immunology*. 2010;22(4):500-506.
107. Challen GA, Boles NC, Chambers SM, Goodell MA. Distinct hematopoietic stem cell subtypes are differentially regulated by TGF-beta1. *Cell Stem Cell*. 2010;6(3):265-278.
108. Bigas A, D'Altri T, Espinosa L. The Notch pathway in hematopoietic stem cells. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2012;360:1-18.
109. Rossi DJ, Bryder D, Zahn JM, et al. Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(26):9194-9199.
110. Woolthuis CM, de Haan G, Huls G. Aging of hematopoietic stem cells: Intrinsic changes or micro-environmental effects? *Curr Opin Immunol*. 2011;23(4):512-517.
111. Mayani H, Alvarado-Moreno JA, Flores-Guzman P. Biology of human hematopoietic stem and progenitor cells present in circulation. *Arch Med Res*. 2003;34(6):476-488.
112. Weissman IL, Shizuru JA. The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. *Blood*. 2008;112(9):3543-3553.
113. Wognum AW, Eaves AC, Thomas TE. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res*. 2003;34(6):461-475.
114. <HEMATOPOYESIS. REVISTA DE CANCEROLOGIA.pdf>.
115. Dyer KD, Garcia-Crespo KE, Killoran KE, Rosenberg HF. Antigen profiles for the quantitative assessment of eosinophils in mouse tissues by flow cytometry. *Journal of immunological methods*. 2011;369(1-2):91-97.
116. von Laer D, Corovic A, Vogt B, et al. Loss of CD38 antigen on CD34+CD38+ cells during short-term culture. *Leukemia*. 2000;14(5):947-948.
117. McKenzie JL, Gan OI, Doedens M, Dick JE. Reversible cell surface expression of CD38 on CD34-positive human hematopoietic repopulating cells. *Experimental Hematology*. 2007;35(9):1429-1436.
118. Héctor Mayani EF-F, Rosana Pelayo, Juan José Montesinos, Patricia Flores-Guzmán y Antonieta Chávez-González. Hematopoyesis. *CANCEROLOGIA*. 2007;2(2):95-107.
119. Civin CI, Gore SD. Antigenic analysis of hematopoiesis: a review. *J Hematother*. 1993;2(2):137-144.
120. van Lochem EG, van der Velden VH, Wind HK, te Marvelde JG, Westerdaal NA, van Dongen JJ. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry B Clin Cytom*. 2004;60(1):1-13.
121. van Dongen JJ, Lhermitte L, Bottcher S, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012;26(9):1908-1975.
122. Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VH, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*. 2012;26(9):1986-2010.
123. Quesenberry P CG. Hematopoietic Stem Cells, progenitor cells and cytokines. In: Hill MG, ed. *Hematology*; 2001:pp153.
124. Rosenbauer F, Tenen DG. Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(2):105-117.
125. Back J, Allman D, Chan S, Kastner P. Visualizing PU.1 activity during hematopoiesis. *Exp Hematol*. 2005;33(4):395-402.
126. Fuller JF, McAdara J, Yaron Y, Sakaguchi M, Fraser JK, Gasson JC. Characterization of HOX gene expression during myelopoiesis: role of HOX A5 in lineage commitment and maturation. *Blood*. 1999;93(10):3391-3400.
127. Yamanaka R, Barlow C, Lekstrom-Himes J, et al. Impaired granulopoiesis, myelodysplasia, and early lethality in CCAAT/enhancer binding protein epsilon-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(24):13187-13192.

128. Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell*. 1996;84(2):321-330.
129. Shivdasani RA, Mayer EL, Orkin SH. Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncogene tal-1/SCL. *Nature*. 1995;373(6513):432-434.
130. Lowry JA, Mackay JP. GATA-1: one protein, many partners. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(1):6-11.
131. Cantor AB, Orkin SH. Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene*. 2002;21(21):3368-3376.
132. Matarraz S, Lopez A, Barrena S, et al. Bone marrow cells from myelodysplastic syndromes show altered immunophenotypic profiles that may contribute to the diagnosis and prognostic stratification of the disease: a pilot study on a series of 56 patients. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010;78(3):154-168.
133. Anderson DM, Lyman SD, Baird A, et al. Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. *Cell*. 1990;63(1):235-243.
134. Brasel K, McKenna HJ, Morrissey PJ, et al. Hematologic effects of flt3 ligand in vivo in mice. *Blood*. 1996;88(6):2004-2012.
135. N. N. GM-CSF. In: Joost J OJ, & Feldmann M ed. A compendium of cytokines and other mediators of host defense: AP Press 2001.; 2001:899.
136. Cohen AM, Zsebo KM, Inoue H, et al. In vivo stimulation of granulopoiesis by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(8):2484-2488.
137. Fortunel NO, Hatzfeld A, Hatzfeld JA. Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood*. 2000;96(6):2022-2036.
138. Broxmeyer HE. Suppressor cytokines and regulation of myelopoiesis. Biology and possible clinical uses. *Am J Pediatr Hematol Oncol*. 1992;14(1):22-30.
139. Sun XJ, Man N, Tan Y, Nimer SD, Wang L. The Role of Histone Acetyltransferases in Normal and Malignant Hematopoiesis. *Front Oncol*. 2015;5:108.
140. Haladyna JN, Yamauchi T, Neff T, Bernt KM. Epigenetic modifiers in normal and malignant hematopoiesis. *Epigenomics*. 2015;7(2):301-320.
141. Kitamura Y, Ito A. Mast cell-committed progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(32):11129-11130.
142. Kempuraj D, Saito H, Kaneko A, et al. Characterization of mast cell-committed progenitors present in human umbilical cord blood. *Blood*. 1999;93(10):3338-3346.
143. Chen CC, Grimbaldston MA, Tsai M, Weissman IL, Galli SJ. Identification of mast cell progenitors in adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(32):11408-11413.
144. Kitamura Y, Oboki K, Ito A. Molecular mechanisms of mast cell development. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2006;26(3):387-405; v.
145. Dahlin JS, Hallgren J. Mast cell progenitors: Origin, development and migration to tissues. *Molecular Immunology*. 2015;63(1):9-17.
146. Arinobu Y, Iwasaki H, Gurish MF, et al. Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(50):18105-18110.
147. Gurish MF, Boyce JA. Mast cell growth, differentiation, and death. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*;22(2):107-118.
148. Krishnan S, Mali RS, Koehler KR, et al. Class I(A) PI3Kinase regulatory subunit, p85alpha, mediates mast cell development through regulation of growth and survival related genes. *PLoS One*. 2012;7(1):e28979.
149. Liu C, Liu Z, Li Z, Wu Y. Molecular regulation of mast cell development and maturation. *Mol Biol Rep*. 2010;37(4):1993-2001.
150. Shiohara M, Koike K. Regulation of mast cell development. *Chem Immunol Allergy*. 2005;87:1-21.
151. Teodosio C, Mayado A, Sanchez-Munoz L, et al. The immunophenotype of mast cells and its utility in the diagnostic work-up of systemic mastocytosis. *J Leukoc Biol*. 2015;97(1):49-59.
152. Teodosio C, Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, et al. An immature immunophenotype of bone marrow mast cells predicts for multilineage D816V KIT mutation in systemic mastocytosis. *Leukemia*. 2012;26(5):951-958.

153. Sanchez-Munoz L, Teodosio C, Morgado JM, Escribano L. Immunophenotypic characterization of bone marrow mast cells in mastocytosis and other mast cell disorders. *Methods Cell Biol.* 2011;103:333-359.
154. Arinobu Y, Iwasaki H, Akashi K. Origin of basophils and mast cells. *Allergology International.* 2009;58(1):21-28.
155. Schernthaner GH, Hauswirth AW, Baghestanian M, et al. Detection of differentiation- and activation-linked cell surface antigens on cultured mast cell progenitors. *Allergy.* 2005;60(10):1248-1255.
156. Valent P, Schernthaner GH, Sperr WR, et al. Variable expression of activation-linked surface antigens on human mast cells in health and disease. *Immunol Rev.* 2001;179:74-81.
157. Dahl C, Hoffmann HJ, Saito H, Schiotz PO. Human mast cells express receptors for IL-3, IL-5 and GM-CSF; a partial map of receptors on human mast cells cultured in vitro. *Allergy.* 2004;59(10):1087-1096.
158. Tachimoto H, Hudson SA, Bochner BS. Acquisition and alteration of adhesion molecules during cultured human mast cell differentiation. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;107(2):302-309.
159. Rottem M, Okada T, Goff JP, Metcalfe DD. Mast cells cultured from the peripheral blood of normal donors and patients with mastocytosis originate from a CD34+/Fc epsilon RI- cell population. *Blood.* 1994;84(8):2489-2496.
160. Yokoi H, Myers A, Matsumoto K, Crocker PR, Saito H, Bochner BS. Alteration and acquisition of Siglecs during in vitro maturation of CD34+ progenitors into human mast cells. *Allergy.* 2006;61(6):769-776.
161. Escribano L, Díaz-Agustín B, Núñez R, Prados A, Rodríguez R, Orfao A. Abnormal expression of CD antigens in mastocytosis. *International Archives of Allergy and Immunology.* 2002;127(2):127-132.
162. Horny HP, Sotlar K, Valent P. Mastocytosis: state of the art. *Pathobiology.* 2007;74(2):121-132.
163. Gregory C, Eaves A. Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. *Blood.* 1978;51(3):527-537.
164. Mahmud N, Lavelle D. Cytokine-free rapid red cell regeneration. *Blood.* 2015;125(6):895-896.
165. Hattangadi SM, Wong P, Zhang L, Flygare J, Lodish HF. From stem cell to red cell: Regulation of erythropoiesis at multiple levels by multiple proteins, RNAs, and chromatin modifications. *Blood.* 2011;118(24):6258-6268.
166. Richmond TD, Chohan M, Barber DL. Turning cells red: Signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends in Cell Biology.* 2005;15(3):146-155.
167. Maguer-Satta V. In vitro Use of Primary Human Hematopoietic Cells as a Model to Investigate the Regulation of Erythropoiesis. *Transfusion Medicine and Hemotherapy.* 2004;31(1):33-40.
168. J. S. IL-3. In: Joost J OJ, & Feldmann M, ed. A compendium of cytokines and other mediators of host defense; 2001:899.
169. Miyajima A, Ito Y, Kinoshita T. Cytokine signaling for proliferation, survival, and death in hematopoietic cells. *Int J Hematol.* 1999;69(3):137-146.
170. Shivdasani RA, Orkin SH. The transcriptional control of hematopoiesis. *Blood.* 1996;87(10):4025-4039.
171. Chesney A, Good D, Reis M. Chapter 13 - Clinical Utility of Flow Cytometry in the Study of Erythropoiesis and Nonclonal Red Cell Disorders. In: Zbigniew Darzynkiewicz EHAOWT, Donald W, eds. *Methods in Cell Biology.* Vol. Volume 103: Academic Press; 2011:311-332.
172. Chen K, Liu J, Heck S, Chasis JA, An X, Mohandas N. Resolving the distinct stages in erythroid differentiation based on dynamic changes in membrane protein expression during erythropoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2009;106(41):17413-17418.
173. Tober J, Koniski A, McGrath KE, et al. The megakaryocyte lineage originates from hemangioblast precursors and is an integral component both of primitive and of definitive hematopoiesis. *Blood.* 2007;109(4):1433-1441.
174. Nakorn TN, Miyamoto T, Weissman IL. Characterization of mouse clonogenic megakaryocyte progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(1):205-210.
175. Parise LV. Integrin alpha(IIb)beta(3) signaling in platelet adhesion and aggregation. *Curr Opin Cell Biol.* 1999;11(5):597-601.
176. Joist JH, Bauman JE, Sutera SP. Platelet adhesion and aggregation in pulsatile shear flow: effects of red blood cells. *Thromb Res.* 1998;92(6 Suppl 2):S47-52.

177. Machlus KR, Italiano JE, Jr. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J Cell Biol.* 2013;201(6):785-796.
178. Inaba K, Inaba M, Deguchi M, et al. Granulocytes, macrophages, and dendritic cells arise from a common major histocompatibility complex class II-negative progenitor in mouse bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(7):3038-3042.
179. Izon D, Rudd K, DeMuth W, et al. A common pathway for dendritic cell and early B cell development. *J Immunol.* 2001;167(3):1387-1392.
180. Bjorck P, Kincade PW. CD19+ pro-B cells can give rise to dendritic cells in vitro. *J Immunol.* 1998;161(11):5795-5799.
181. Naik SH, Sathe P, Park HY, et al. Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat Immunol.* 2007;8(11):1217-1226.
182. Shortman K, Liu Y-J. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(3):151-161.
183. Zuniga EI, McGavern DB, Pruneda-Paz JL, Teng C, Oldstone MB. Bone marrow plasmacytoid dendritic cells can differentiate into myeloid dendritic cells upon virus infection. *Nat Immunol.* 2004;5(12):1227-1234.
184. Lee J, Breton G, Oliveira TY, et al. Restricted dendritic cell and monocyte progenitors in human cord blood and bone marrow. *J Exp Med.* 2015;212(3):385-399.
185. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science.* 2010;327(5966):656-661.
186. Liu K, Nussenzweig MC. Origin and development of dendritic cells. *Immunological Reviews.* 2010;234(1):45-54.
187. Liu QL, Wang YS, Wang JX. [Growth hormone influence on functional status of cord blood-derived dendritic cells]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2009;89(16):1139-1143.
188. Haniffa M, Ginhoux F, Wang XN, et al. Differential rates of replacement of human dermal dendritic cells and macrophages during hematopoietic stem cell transplantation. *J Exp Med.* 2009;206(2):371-385.
189. Affaticati P, Mignen O, Jambou F, et al. Sustained calcium signalling and caspase-3 activation involve NMDA receptors in thymocytes in contact with dendritic cells. *Cell Death Differ.* 2011;18(1):99-108.
190. Auffray C, Emre Y, Geissmann F. Homeostasis of dendritic cell pool in lymphoid organs. *Nat Immunol.* 2008;9(6):584-586.
191. Geissmann F, Auffray C, Palframan R, et al. Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. *Immunol Cell Biol.* 2008;86(5):398-408.
192. Martinez FO. The transcriptome of human monocyte subsets begins to emerge. *J Biol.* 2009;8(11):99.
193. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* 2008;13:453-461.
194. Olweus J, BitMansour A, Warnke R, et al. Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(23):12551-12556.
195. Pelayo R, Welner R, Perry SS, et al. Lymphoid progenitors and primary routes to becoming cells of the immune system. *Curr Opin Immunol.* 2005;17(2):100-107.
196. Baba Y, Pelayo R, Kincade PW. Relationships between hematopoietic stem cells and lymphocyte progenitors. *Trends Immunol.* 2004;25(12):645-649.
197. Igarashi H, Gregory SC, Yokota T, Sakaguchi N, Kincade PW. Transcription from the RAG1 locus marks the earliest lymphocyte progenitors in bone marrow. *Immunity.* 2002;17(2):117-130.
198. Yokota T, Kouro T, Hirose J, et al. Unique properties of fetal lymphoid progenitors identified according to RAG1 gene expression. *Immunity.* 2003;19(3):365-375.
199. Galy A, Travis M, Cen D, Chen B. Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity.* 1995;3(4):459-473.
200. Pelayo R, Welner RS, Nagai Y, Kincade PW. Life before the pre-B cell receptor checkpoint: specification and commitment of primitive lymphoid progenitors in adult bone marrow. *Semin Immunol.* 2006;18(1):2-11.
201. Perry SS, Welner RS, Kouro T, Kincade PW, Sun XH. Primitive lymphoid progenitors in bone marrow with T lineage reconstituting potential. *J Immunol.* 2006;177(5):2880-2887.

202. Blom B, Spits H. Development of human lymphoid cells. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:287-320.
203. Haddad R, Guardiola P, Izac B, et al. Molecular characterization of early human T/NK and B-lymphoid progenitor cells in umbilical cord blood. *Blood*. 2004;104(13):3918-3926.
204. Martin-Martin L, Almeida J, Hernandez-Campo PM, Sanchez ML, Lecrevisse Q, Orfao A. Immunophenotypical, morphologic, and functional characterization of maturation-associated plasmacytoid dendritic cell subsets in normal adult human bone marrow. *Transfusion*. 2009;49(8):1692-1708.
205. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, & Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. (ed 5th). New York: Garland Science.; 2008.
206. Nurse P. A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell*. 2000;100(1):71-78.
207. Doree M, Hunt T. From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? *J Cell Sci*. 2002;115(Pt 12):2461-2464.
208. Murray AW. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell*. 2004;116(2):221-234.
209. Bloom J, Cross FR. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(2):149-160.
210. Budirahardja Y, Goczy P. Coupling the cell cycle to development. *Development*. 2009;136(17):2861-2872.
211. Stanger BZ. Organ size determination and the limits of regulation. *Cell Cycle*. 2008;7(3):318-324.
212. Maddika S, Ande SR, Panigrahi S, et al. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. *Drug Resist Updat*. 2007;10(1-2):13-29.
213. Dor Y, Melton DA. How important are adult stem cells for tissue maintenance? *Cell Cycle*. 2004;3(9):1104-1106.
214. van Heemst D, den Reijer PM, Westendorp RG. Ageing or cancer: a review on the role of caretakers and gatekeepers. *Eur J Cancer*. 2007;43(15):2144-2152.
215. Wells AD. Cyclin-dependent kinases: molecular switches controlling anergy and potential therapeutic targets for tolerance. *Semin Immunol*. 2007;19(3):173-179.
216. Toba K, Koike T, Watanabe K, et al. Cell kinetic study of normal human bone marrow hematopoiesis and acute leukemia using 7AAD/PY. *Eur J Haematol*. 2000;64(1):10-21.
217. Grotto HZ, Lorand-Metze I, Metzke K. Nucleolar organizer regions in normal hematopoiesis: relationship to cellular proliferation and maturation. *Nouv Rev Fr Hematol*. 1991;33(1):1-4.
218. Eastment CE. Regulation of hematopoiesis in long term marrow cultures: role of humoral factors in the proliferation and differentiation of stem cells and committed progenitors. *Scan Electron Microsc*. 1986(Pt 3):1079-1086.
219. Xia B, Guo Q, Zhao DD, et al. Significance of CD34(-) and CD34(+) cell apoptosis and proliferation in bone marrow of patients with MDS and their impact on survival. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2012;20(6):1392-1397.
220. Sima J, Gilbert DM. Complex correlations: replication timing and mutational landscapes during cancer and genome evolution. *Curr Opin Genet Dev*. 2014;25:93-100.
221. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Jr., Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013;339(6127):1546-1558.
222. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*. 2011;364(26):2496-2506.
223. Bejar R, Abdel-Wahab O. The importance of subclonal genetic events in MDS. *Blood*. 2013;122(22):3550-3551.
224. Kwok B, Hall JM, Witte JS, et al. MDS-associated somatic mutations and clonal hematopoiesis are common in idiopathic cytopenias of undetermined significance. *Blood*. 2015.
225. Bejar R, Steensma DP. Recent developments in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2014;124(18):2793-2803.
226. Metcalf D, Alexander WS, Elefanty AG, et al. Aberrant hematopoiesis in mice with inactivation of the gene encoding SOCS-1. *Leukemia*. 1999;13(6):926-934.
227. Huang Y, Chen X, Dikov MM, et al. Distinct roles of VEGFR-1 and VEGFR-2 in the aberrant hematopoiesis associated with elevated levels of VEGF. *Blood*. 2007;110(2):624-631.
228. Hall J AHJ, Balmert E, et al. Somatic mutations indicative of clonal hematopoiesis are present in a large fraction of cytopenic patients who lack diagnostic evidence of MDS *Blood*. 2014(124).

229. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med*. 2014;371(26):2488-2498.
230. Genovese G, Jaiswal S, Ebert BL, McCarroll SA. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk. *N Engl J Med*. 2015;372(11):1071-1072.
231. Lichtman MA. Clonal hematopoiesis: a "CHIP" off the old block. *Blood*. 2015;126(1):1-2.
232. Shlush LI, Zandi S, Itzhkovitz S, Schuh AC. Aging, clonal hematopoiesis and preleukemia: not just bad luck? *Int J Hematol*. 2015.
233. Yan B, Ban K, Chng W-JJ. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk. *The New England journal of medicine*. 2015;372(11):1071.
234. Busque L, Patel JP, Figueroa ME, et al. Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. *Nat Genet*. 2012;44(11):1179-1181.
235. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2015;126(1):9-16.
236. Yan B, Ban K, Chng WJ. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk. *N Engl J Med*. 2015;372(11):1071.
237. Ross SD, Allen IE, Probst CA, Sercus B, Crean SM, Ranganathan G. Efficacy and safety of erythropoiesis-stimulating proteins in myelodysplastic syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Oncologist*. 2007;12(10):1264-1273.
238. Ismailova AZ, Makeshova AB, Eralieva MO, Levina AA, Makukova Iu I, Raimzhanov AR. [Regulation of erythropoiesis in patients with suppressed hematopoiesis during mountain climatic treatment]. *Ter Arkh*. 2010;82(1):39-42.
239. Chesney A, Good D, Reis M. Clinical utility of flow cytometry in the study of erythropoiesis and nonclonal red cell disorders. *Methods Cell Biol*. 2011;103:311-332.
240. Laranjeira P, Rodrigues R, Carneiro T, et al. Expression of CD44 and CD35 during normal and myelodysplastic erythropoiesis. *Leuk Res*. 2015;39(3):361-370.
241. Gomes AC, Gomes MS. Hematopoietic niches, erythropoiesis and anemia of chronic infection. *Exp Hematol*. 2016;44(2):85-91.
242. Rainville N, Jachimowicz E, Wojchowski DM. Targeting EPO and EPO receptor pathways in anemia and dysregulated erythropoiesis. *Expert Opin Ther Targets*. 2016;20(3):287-301.
243. Fandrey J, Hallek M. [Erythropoiesis: Physiology, pathophysiology, and algorithm for classification of the type of anemia]. *Internist (Berl)*. 2015;56(9):970-977.
244. Salama A, Hartnack D, Lindemann HW, Lange HJ, Rummel M, Loew A. The effect of erythropoiesis-stimulating agents in patients with therapy-refractory autoimmune hemolytic anemia. *Transfus Med Hemother*. 2014;41(6):462-468.
245. Knight ZA, Schmidt SF, Birsoy K, Tan K, Friedman JM. A critical role for mTORC1 in erythropoiesis and anemia. *Elife*. 2014;3:e01913.
246. Dutka P. Erythropoiesis-stimulating agents for the management of anemia of chronic kidney disease: past advancements and current innovations. *Nephrol Nurs J*. 2012;39(6):447-457.
247. Walkley CR. Erythropoiesis, anemia and the bone marrow microenvironment. *Int J Hematol*. 2011;93(1):10-13.
248. Gardenghi S, Grady RW, Rivella S. Anemia, ineffective erythropoiesis, and hepcidin: interacting factors in abnormal iron metabolism leading to iron overload in beta-thalassemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2010;24(6):1089-1107.
249. Fishbane S. The role of erythropoiesis-stimulating agents in the treatment of anemia. *Am J Manag Care*. 2010;16 Suppl Issues:S67-73.
250. Zyuz'kov GN, Abramova EV, Dygai AM, Gol'dberg ED. Mechanisms of regulation of erythropoiesis during hemolytic anemia. *Bull Exp Biol Med*. 2004;138(4):334-337.
251. Arndt U, Kaltwasser JP, Gottschalk R, Hoelzer D, Moller B. Correction of iron-deficient erythropoiesis in the treatment of anemia of chronic disease with recombinant human erythropoietin. *Ann Hematol*. 2005;84(3):159-166.
252. Gabrilove J. Overview: erythropoiesis, anemia, and the impact of erythropoietin. *Semin Hematol*. 2000;37(4 Suppl 6):1-3.
253. Gudim VI, Eremenko LL, Ivanova VS, et al. [Regulation of erythropoiesis in patients with iron deficiency anemia]. *Gematol Transfuziol*. 1991;36(7):3-5.

254. Wallner SF, Vautrin R. The anemia of thermal injury: mechanism of inhibition of erythropoiesis. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1986;181(1):144-150.
255. Weiss DJ, Krehbiel JD, Lund JE. Studies of the pathogenesis of anemia of inflammation: mechanism of impaired erythropoiesis. *Am J Vet Res*. 1983;44(10):1832-1835.
256. Alexanian R, Alfrey C. Erythropoiesis in the anemia of bone marrow failure. *J Clin Invest*. 1970;49(11):1986-1992.
257. Ogawa S. MDS-related mutations in aplastic anemia. *Blood*. 2014;124(17):2619-2620.
258. Malcovati L, de Latour RP, Risitano A. Aplastic anemia & MDS International Foundation (AA&MDSIF): Bone Marrow Failure Disease Scientific Symposium 2010. *Leuk Res*. 2011;35(3):291-294.
259. Angona A, Alvarez-Larran A, Bellosillo B, et al. Hematopoietic clonal dominance, stem cell mutations, and evolutionary pattern of JAK2V617F allele burden in polycythemia vera. *Eur J Haematol*. 2015;94(3):251-257.
260. Vickers MA. JAK2 617V>F positive polycythemia rubra vera maintained by approximately 18 stochastic stem-cell divisions per year, explaining age of onset by a single rate-limiting mutation. *Blood*. 2007;110(5):1675-1680.
261. Adamson JW, Fialkow PJ, Murphy S, Prchal JF, Steinmann L. Polycythemia vera: stem-cell and probable clonal origin of the disease. *N Engl J Med*. 1976;295(17):913-916.
262. Ouyang J, Zheng W, Shen Q, et al. Flow cytometry immunophenotypic analysis of Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms: Correlation with histopathologic features. *Cytometry B Clin Cytom*. 2015;88(4):236-243.
263. Giagounidis A, Haase D. Morphology, cytogenetics and classification of MDS. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2013;26(4):337-353.
264. Wong KF, So CC. Hypoplastic myelodysplastic syndrome-a clinical, morphologic, or genetic diagnosis? *Cancer Genet Cytogenet*. 2002;138(1):85-88.
265. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 1982;51(2):189-199.
266. Andres E, Federici L, Kaltenbach G. Hematological manifestations related to cobalamin deficiency in elderly patients. *Eur J Intern Med*. 2008;19(2):149-150.
267. Andres E, Vidal-Alaball J, Federici L, Loukili NH, Zimmer J, Kaltenbach G. Clinical aspects of cobalamin deficiency in elderly patients. Epidemiology, causes, clinical manifestations, and treatment with special focus on oral cobalamin therapy. *Eur J Intern Med*. 2007;18(6):456-462.
268. Harrison RJ. Vitamin B12 levels in erythrocytes in anaemia due to folate deficiency. *Br J Haematol*. 1971;20(6):623-628.
269. Toh BH, van Driel IR, Gleeson PA. Pernicious anemia. *N Engl J Med*. 1997;337(20):1441-1448.
270. Valent P, Horny HP, Bennett JM, et al. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leuk Res*. 2007;31(6):727-736.
271. Brunning R OA, Germing U, Le Beau MM, Porwit A, et al. Myelodysplastic syndromes/neoplasms, overview. In: WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. In: Swerdlow SH, ed. World Health Organization classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2008:87-104.
272. Tefferi A, Vardiman JW. Myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*. 2009;361(19):1872-1885.
273. Valent P, Horny HP. Minimal diagnostic criteria for myelodysplastic syndromes and separation from ICUS and IDUS: update and open questions. *Eur J Clin Invest*. 2009;39(7):548-553.
274. Barzi A, Sekeres MA. Myelodysplastic syndromes: a practical approach to diagnosis and treatment. *Cleve Clin J Med*. 2010;77(1):37-44.
275. Steensma DP. Myelodysplastic Syndromes: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin Proc*. 2015;90(7):969-983.
276. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016.
277. Peter Valent CA, Michel Arock, Christoph Bock, Tracy I. George, Steven J. Galli, Jason Gotlib, Torsten Haferlach, Gregor Hoermann, Olivier Hermine, Ulrich Jager, Lukas Kenner, Hans Kreipe, Ravi Majeti, Dean D. Metcalfe, Alberto Orfao, Andreas Reiter, Wolfgang R. Sperr, Philipp Staber, Karl Sotlar, Charles Schiffer,

- Giulio Superti-Furga, Hans-Peter Horny. Proposed terminology and classification of pre-malignant neoplastic conditions: report from a working conference. *In press*. 2016.
278. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976;194(4260):23-28.
279. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet*. 1993;9(4):138-141.
280. Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol*. 1999;9(12):M57-60.
281. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(3):220-228.
282. Yates LR, Campbell PJ. Evolution of the cancer genome. *Nat Rev Genet*. 2012;13(11):795-806.
283. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013;500(7463):415-421.
284. Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(10):726-734.
285. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature*. 2012;481(7381):306-313.
286. Martincorena I, Campbell PJ. Somatic mutation in cancer and normal cells. *Science*. 2015;349(6255):1483-1489.
287. Khoury MJ, McCabe LL, McCabe ER. Population screening in the age of genomic medicine. *N Engl J Med*. 2003;348(1):50-58.
288. Altman RB. Personal genomic measurements: the opportunity for information integration. *Clin Pharmacol Ther*. 2013;93(1):21-23.
289. Yang Y, Muzny DM, Reid JG, et al. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *N Engl J Med*. 2013;369(16):1502-1511.
290. Vassy JL, Lautenbach DM, McLaughlin HM, et al. The MedSeq Project: a randomized trial of integrating whole genome sequencing into clinical medicine. *Trials*. 2014;15:85.
291. Dohner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2015;373(12):1136-1152.
292. Genovese G, Kahler AK, Handsaker RE, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med*. 2014;371(26):2477-2487.
293. Lindsley RC, Mar BG, Mazzola E, et al. Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. *Blood*. 2015;125(9):1367-1376.
294. Astuti D, Morris MR, Cooper WN, et al. Germline mutations in DIS3L2 cause the Perlman syndrome of overgrowth and Wilms tumor susceptibility. *Nat Genet*. 2012;44(3):277-284.
295. Brugieres L, Remenieras A, Pierron G, et al. High frequency of germline SUFU mutations in children with desmoplastic/nodular medulloblastoma younger than 3 years of age. *J Clin Oncol*. 2012;30(17):2087-2093.
296. Gustafson SL, Raymond VM, Marvin ML, et al. Outcomes of genetic evaluation for hereditary cancer syndromes in unaffected individuals. *Fam Cancer*. 2015;14(1):167-174.
297. Spinner MA, Sanchez LA, Hsu AP, et al. GATA2 deficiency: a protean disorder of hematopoiesis, lymphatics, and immunity. *Blood*. 2014;123(6):809-821.
298. Welch JS, Ley TJ, Link DC, et al. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell*. 2012;150(2):264-278.
299. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med*. 2009;361(11):1058-1066.
300. Shanafelt TD, Ghia P, Lanasa MC, Landgren O, Rawstron AC. Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL): biology, natural history and clinical management. *Leukemia*. 2010;24(3):512-520.
301. Go RS, Swanson KM, Sangaralingham LR, Habermann EB, Shah ND. Clinical prevalence (diagnosed cases) of monoclonal gammopathy of undetermined significance in the US: estimating the burden on health care. *Leukemia*. 2016;30(6):1443-1446.
302. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med*. 2006;354(13):1362-1369.
303. Pierre RV, Hoagland HC. 45,X cell lines in adult men: loss of Y chromosome, a normal aging phenomenon? *Mayo Clin Proc*. 1971;46(1):52-55.
304. Maciejewski JP, Risitano A, Sloand EM, Nunez O, Young NS. Distinct clinical outcomes for cytogenetic abnormalities evolving from aplastic anemia. *Blood*. 2002;99(9):3129-3135.

305. Braun T, de Botton S, Taksin AL, et al. Characteristics and outcome of myelodysplastic syndromes (MDS) with isolated 20q deletion: a report on 62 cases. *Leuk Res.* 2011;35(7):863-867.
306. Soupir CP, Vergilio JA, Kelly E, Dal Cin P, Kuter D, Hasserjian RP. Identification of del(20q) in a subset of patients diagnosed with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol.* 2009;144(5):800-802.
307. Steensma DP, Dewald GW, Hodnefield JM, Tefferi A, Hanson CA. Clonal cytogenetic abnormalities in bone marrow specimens without clear morphologic evidence of dysplasia: a form fruste of myelodysplasia? *Leuk Res.* 2003;27(3):235-242.
308. Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* 2014;28(2):241-247.
309. Xie M, Lu C, Wang J, et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med.* 2014;20(12):1472-1478.
310. Valent P, Bain BJ, Bennett JM, et al. Idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS) and idiopathic dysplasia of uncertain significance (IDUS), and their distinction from low risk MDS. *Leuk Res.* 2012;36(1):1-5.
311. McKerrell T, Park N, Moreno T, et al. Leukemia-associated somatic mutations drive distinct patterns of age-related clonal hemopoiesis. *Cell Rep.* 2015;10(8):1239-1245.
312. Kwok B, Hall JM, Witte JS, et al. MDS-associated somatic mutations and clonal hematopoiesis are common in idiopathic cytopenias of undetermined significance. *Blood.* 2015;126(21):2355-2361.
313. Bain BJ. The bone marrow aspirate of healthy subjects. *Br J Haematol.* 1996;94(1):206-209.
314. Valent P, Jager E, Mitterbauer-Hohendanner G, et al. Idiopathic bone marrow dysplasia of unknown significance (IDUS): definition, pathogenesis, follow up, and prognosis. *Am J Cancer Res.* 2011;1(4):531-541.
315. de Swart L, Smith A, Johnston TW, et al. Validation of the revised international prognostic scoring system (IPSS-R) in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes: a report from the prospective European LeukaemiaNet MDS (EUMDS) registry. *Br J Haematol.* 2015;170(3):372-383.
316. 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(7):1502-1513.
317. Ok CY, Hasserjian RP, Fox PS, et al. Application of the international prognostic scoring system-revised in therapy-related myelodysplastic syndromes and oligoblastic acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2014;28(1):185-189.
318. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2012;120(12):2454-2465.
319. Swerdlow SH, International Agency for Research on Cancer., World Health Organization. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2008.
320. Brunning R OA, Germing U. Myelodysplastic syndromes/neoplasms. In: Swerdlow SH CE, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, ed. WHO classification of tumours and haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon; 2008:88 – 147.
321. Swerdlow SH. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2008.
322. Tiu RV, Visconte V, Traina F, Schwandt A, Maciejewski JP. Updates in cytogenetics and molecular markers in MDS. *Curr Hematol Malig Rep.* 2011;6(2):126-135.
323. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2013;122(22):3616-3627; quiz 3699.
324. Flach J, Dicker F, Schnittger S, et al. An accumulation of cytogenetic and molecular genetic events characterizes the progression from MDS to secondary AML: an analysis of 38 paired samples analyzed by cytogenetics, molecular mutation analysis and SNP microarray profiling. *Leukemia.* 2011;25(4):713-718.
325. Vardiman JW. Hematopathological concepts and controversies in the diagnosis and classification of myelodysplastic syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2006:199-204.
326. Fenaux P, Haase D, Sanz GF, Santini V, Buske C, Group EGW. Myelodysplastic syndromes: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2014;25 Suppl 3:iii57-69.

327. Malcovati L, Hellstrom-Lindberg E, Bowen D, et al. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood*. 2013;122(17):2943-2964.
328. Steensma DP, Bennett JM. The myelodysplastic syndromes: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc*. 2006;81(1):104-130.
329. Della Porta MG, Travaglino E, Boveri E, et al. Minimal morphological criteria for defining bone marrow dysplasia: a basis for clinical implementation of WHO classification of myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2015;29(1):66-75.
330. Goldberg SL, Chen E, Corral M, et al. Incidence and clinical complications of myelodysplastic syndromes among United States Medicare beneficiaries. *J Clin Oncol*. 2010;28(17):2847-2852.
331. Della Porta MG, Malcovati L, Strupp C, et al. Risk stratification based on both disease status and extra-hematologic comorbidities in patients with myelodysplastic syndrome. *Haematologica*. 2011;96(3):441-449.
332. Rollison DE, Howlander 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;112(1):45-52.
333. Fenaux P. [Myelodysplastic syndromes]. *Pathol Biol (Paris)*. 1997;45(7):537-538.
334. Du Y, Fryzek J, Sekeres MA, Taioli E. Smoking and alcohol intake as risk factors for myelodysplastic syndromes (MDS). *Leuk Res*. 2010;34(1):1-5.
335. Strom SS, Gu Y, Gruschkus SK, Pierce SA, Estey EH. Risk factors of myelodysplastic syndromes: a case-control study. *Leukemia*. 2005;19(11):1912-1918.
336. Asociación Madrileña de Hematología y Hemoterapia. Documentos de consenso en SMD. Majadahonda, Madrid: Ergon; 2012.
337. Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos, Asociación Española de Hematología y Hemoterapia. Guías españolas para el diagnóstico y tratamiento de los SMD y la LMMC. Barcelona: Márketing Farmacéutico e Investigación Clínica; 2013.
338. Mufti GJ, Bennett JM, Goasguen J, et al. Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome: International Working Group on Morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposals for the definition and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts. *Haematologica*. 2008;93(11):1712-1717.
339. Ma X. Epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Am J Med*. 2012;125(7 Suppl):S2-5.
340. Senent L, Arenillas L, Luno E, Ruiz JC, Sanz G, Florensa L. Reproducibility of the World Health Organization 2008 criteria for myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2013;98(4):568-575.
341. Font P, Loscertales J, Benavente C, et al. Inter-observer variance with the diagnosis of myelodysplastic syndromes (MDS) following the 2008 WHO classification. *Ann Hematol*. 2013;92(1):19-24.
342. Gauchan D, Shaaban H, Gedeon D, Maroules M. Use of eltrombopag for the treatment of thrombocytopenia in hypoplastic myelodysplastic syndrome. *Ann Hematol*. 2014;93(10):1777-1778.
343. Calado RT. Immunologic aspects of hypoplastic myelodysplastic syndrome. *Semin Oncol*. 2011;38(5):667-672.
344. Huang TC, Ko BS, Tang JL, et al. Comparison of hypoplastic myelodysplastic syndrome (MDS) with normo-/hypercellular MDS by International Prognostic Scoring System, cytogenetic and genetic studies. *Leukemia*. 2008;22(3):544-550.
345. Tamai Y, Takami H, Nakahata R, Kariya K, Munakata A. Sustained improvement in anemia with low-dose recombinant human erythropoietin therapy in a patient with hypoplastic myelodysplastic syndrome and chromosomal abnormalities. *Intern Med*. 1998;37(3):320-323.
346. Biesma DH, van den Tweel JG, Verdonck LF. Immunosuppressive therapy for hypoplastic myelodysplastic syndrome. *Cancer*. 1997;79(8):1548-1551.
347. Nand S, Godwin JE. Hypoplastic myelodysplastic syndrome. *Cancer*. 1988;62(5):958-964.
348. Haase D, Germing U, Schanz J, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood*. 2007;110(13):4385-4395.

349. Pedersen-Bjergaard J, Philip P, Larsen SO, et al. Therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. Cytogenetic characteristics of 115 consecutive cases and risk in seven cohorts of patients treated intensively for malignant diseases in the Copenhagen series. *Leukemia*. 1993;7(12):1975-1986.
350. Walter MJ, Shen D, Ding L, et al. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2012;366(12):1090-1098.
351. Gyger M, Infante-Rivard C, D'Angelo G, Forest L, Lussier P. Prognostic value of clonal chromosomal abnormalities in patients with primary myelodysplastic syndromes. *Am J Hematol*. 1988;28(1):13-20.
352. Tiu RV, Gondek LP, O'Keefe CL, et al. Prognostic impact of SNP array karyotyping in myelodysplastic syndromes and related myeloid malignancies. *Blood*. 2011;117(17):4552-4560.
353. Cazzola M, Rossi M, Malcovati L, Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro Gruppo Italiano Malattie M. Biologic and clinical significance of somatic mutations of SF3B1 in myeloid and lymphoid neoplasms. *Blood*. 2013;121(2):260-269.
354. Scheinberg P SD. Acquired marrow failure syndromes: aplastic anemia, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, and myelodysplastic syndromes. In: Steensma DP MK, ed. American Society of Hematology Self-Assessment Program (ASH-SAP). Washington, DC:: American Society of Hematology; 2013.
355. Xiao Z. [Gene mutations in the diagnosis of MPN and MDS/MPN: current state]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 2014;35(5):385-386.
356. Wimazal F, Fonatsch C, Thalhammer R, et al. Idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS) versus low risk MDS: the diagnostic interface. *Leuk Res*. 2007;31(11):1461-1468.
357. Schroeder T, Ruf L, Bernhardt A, et al. Distinguishing myelodysplastic syndromes (MDS) from idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS): HUMARA unravels clonality in a subgroup of patients. *Ann Oncol*. 2010;21(11):2267-2271.
358. Koh Y, Lee HR, Song EY, et al. Hypoplastic myelodysplastic syndrome (h-MDS) is a distinctive clinical entity with poorer prognosis and frequent karyotypic and FISH abnormalities compared to aplastic anemia (AA). *Leuk Res*. 2010;34(10):1344-1350.
359. Figueroa ME, Skrabanek L, Li Y, et al. MDS and secondary AML display unique patterns and abundance of aberrant DNA methylation. *Blood*. 2009;114(16):3448-3458.
360. Dicker F, Haferlach C, Sundermann J, et al. Mutation analysis for RUNX1, MLL-PTD, FLT3-ITD, NPM1 and NRAS in 269 patients with MDS or secondary AML. *Leukemia*. 2010;24(8):1528-1532.
361. Bacher U, Kern W, Alpermann T, Schnittger S, Haferlach C, Haferlach T. Prognoses of MDS subtypes RARS, RCMD and RCMD-RS are comparable but cytogenetics separates a subgroup with inferior clinical course. *Leuk Res*. 2012;36(7):826-831.
362. 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):820-829.
363. 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. *Br J Haematol*. 2013;160(5):660-672.
364. Jadersten M, Saft L, Smith A, et al. TP53 mutations in low-risk myelodysplastic syndromes with del(5q) predict disease progression. *J Clin Oncol*. 2011;29(15):1971-1979.
365. Dolatshad H, Pellagatti A, Fernandez-Mercado M, et al. Disruption of SF3B1 results in deregulated expression and splicing of key genes and pathways in myelodysplastic syndrome hematopoietic stem and progenitor cells. *Leukemia*. 2015;29(8):1798.
366. Malcovati L, Karimi M, Papaemmanuil E, et al. SF3B1 mutation identifies a distinct subset of myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts. *Blood*. 2015;126(2):233-241.
367. Stetler-Stevenson M, Arthur DC, Jabbour N, et al. Diagnostic utility of flow cytometric immunophenotyping in myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2001;98(4):979-987.
368. Elghetany MT. Diagnostic utility of flow cytometric immunophenotyping in myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2002;99(1):391-392.
369. Baumann MA, Keller RH, McFadden PW, Libnoch JA, Patrick CW. Myeloid cell surface phenotype in myelodysplasia: evidence for abnormal persistence of an early myeloid differentiation antigen. *Am J Hematol*. 1986;22(3):251-257.

370. Della Porta MG, Picone C, Pascutto C, et al. Multicenter validation of a reproducible flow cytometric score for the diagnosis of low-grade myelodysplastic syndromes: results of a European LeukemiaNET study. *Haematologica*. 2012;97(8):1209-1217.
371. Porwit A, van de Loosdrecht AA, Bettelheim P, et al. Revisiting guidelines for integration of flow cytometry results in the WHO classification of myelodysplastic syndromes-proposal from the International/European LeukemiaNet Working Group for Flow Cytometry in MDS. *Leukemia*. 2014;28(9):1793-1798.
372. Westers TM, Ireland R, Kern W, et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: a report from an international consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leukemia*. 2012;26(7):1730-1741.
373. Matarraz S, Lopez A, Barrena S, et al. The immunophenotype of different immature, myeloid and B-cell lineage-committed CD34+ hematopoietic cells allows discrimination between normal/reactive and myelodysplastic syndrome precursors. *Leukemia*. 2008;22(6):1175-1183.
374. Kalina T, Flores-Montero J, Lecrevisse Q, et al. Quality assessment program for EuroFlow protocols: summary results of four-year (2010-2013) quality assurance rounds. *Cytometry A*. 2015;87(2):145-156.
375. van Dongen JJ, Orfao A, EuroFlow C. EuroFlow: Resetting leukemia and lymphoma immunophenotyping. Basis for companion diagnostics and personalized medicine. *Leukemia*. 2012;26(9):1899-1907.
376. Ogata K, Kishikawa Y, Satoh C, Tamura H, Dan K, Hayashi A. Diagnostic application of flow cytometric characteristics of CD34+ cells in low-grade myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2006;108(3):1037-1044.
377. Ogata K, Della Porta MG, Malcovati L, et al. Diagnostic utility of flow cytometry in low-grade myelodysplastic syndromes: a prospective validation study. *Haematologica*. 2009;94(8):1066-1074.
378. Ogata K. Diagnostic flow cytometry for low-grade myelodysplastic syndromes. *Hematol Oncol*. 2008;26(4):193-198.
379. van de Loosdrecht AA, Westers TM. Cutting edge: flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *J Natl Compr Canc Netw*. 2013;11(7):892-902.
380. van de Loosdrecht AA, Ireland R, Kern W, et al. Rationale for the clinical application of flow cytometry in patients with myelodysplastic syndromes: position paper of an International Consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leuk Lymphoma*. 2013;54(3):472-475.
381. Westers TM, van der Velden VH, Alhan C, et al. Implementation of flow cytometry in the diagnostic work-up of myelodysplastic syndromes in a multicenter approach: report from the Dutch Working Party on Flow Cytometry in MDS. *Leuk Res*. 2012;36(4):422-430.
382. Cutler JA, Wells DA, van de Loosdrecht AA, et al. Phenotypic abnormalities strongly reflect genotype in patients with unexplained cytopenias. *Cytometry B Clin Cytom*. 2011;80(3):150-157.
383. Kern W, Haferlach C, Schnittger S, Haferlach T. Clinical utility of multiparameter flow cytometry in the diagnosis of 1013 patients with suspected myelodysplastic syndrome: correlation to cytomorphology, cytogenetics, and clinical data. *Cancer*. 2010;116(19):4549-4563.
384. Chu SC, Wang TF, Li CC, et al. Flow cytometric scoring system as a diagnostic and prognostic tool in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2011;35(7):868-873.
385. Wells DA, Benesch M, Loken MR, et al. Myeloid and monocytic dyspoiesis as determined by flow cytometric scoring in myelodysplastic syndrome correlates with the IPSS and with outcome after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2003;102(1):394-403.
386. van de Loosdrecht AA, Westers TM, Ossenkoppele GJ. Flowcytometry in myelodysplastic syndromes: towards a new paradigm in diagnosis and prognostication? *Leuk Res*. 2008;32(2):205-207.
387. van de Loosdrecht AA, Westers TM, Westra AH, Drager AM, van der Velden VH, Ossenkoppele GJ. Identification of distinct prognostic subgroups in low- and intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes by flow cytometry. *Blood*. 2008;111(3):1067-1077.
388. Scott BL, Wells DA, Loken MR, Myerson D, Leisenring WM, Deeg HJ. Validation of a flow cytometric scoring system as a prognostic indicator for posttransplantation outcome in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2008;112(7):2681-2686.
389. Alhan C, Westers TM, Cremers EM, et al. High flow cytometric scores identify adverse prognostic subgroups within the revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 2014;167(1):100-109.

390. Alhan C, Westers TM, Cremers EM, et al. The myelodysplastic syndromes flow cytometric score: a 3-parameter prognostic flow cytometric scoring system. *Leukemia*. 2015.
391. Huang J, Lai P, Zhou M, Weng J, Lu Z, Du X. A multiparametric flow cytometry immunophenotypic scoring system for the diagnosis and prognosis of myelodysplastic syndromes. *Clin Lab*. 2012;58(11-12):1241-1251.
392. Westers TA, C ; Cali, C ; Ossenkoppele, GJ; de Loosdrecht, AAV. Quantitative Dynamics of Flow Cytometric Aberrancies during Treatment with Erythropoietin/G-CSF Are Predictive for Responses in LOW/INT-1 Risk Myelodysplastic Syndromes. *Blood Cancer J*. 2008;112(11):586-586.
393. Silverman LR, Fenaux P, Mufti GJ, et al. Continued azacitidine therapy beyond time of first response improves quality of response in patients with higher-risk myelodysplastic syndromes. *Cancer*. 2011;117(12):2697-2702.
394. Vardiman JW BR, Arber DA, Le Beau MM, Porwit, A TA, Bloodfield CD, Thiele J. Introduction and overview of the classification of the myeloid neoplasms. In: Swerdlow SH CE, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, ed. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon; 2008:18-30.
395. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-951.
396. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002;100(7):2292-2302.
397. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997;89(6):2079-2088.
398. Mughal TI, Cross NC, Padron E, et al. An International MDS/MPN Working Group's perspective and recommendations on molecular pathogenesis, diagnosis and clinical characterization of myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2015;100(9):1117-1130.
399. Tefferi A. Myeloproliferative Neoplasms: A Decade of Discoveries and Treatment Advances. *American journal of hematology*. 2015.
400. Tefferi A, Guglielmelli P, Larson DR, et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood*. 2014;124(16):2507-2513; quiz 2615.
401. Milosevic Feenstra JD, Nivarthi H, Gisslinger H, et al. Whole exome sequencing identifies novel MPL and JAK2 mutations in triple negative myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2015.
402. Lundberg P, Karow A, Nienhold R, et al. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2014;123(14):2220-2228.
403. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia*. 2013;27(9):1861-1869.
404. Tefferi A, Finke CM, Lasho TL, et al. U2AF1 mutations in primary myelofibrosis are strongly associated with anemia and thrombocytopenia despite clustering with JAK2V617F and normal karyotype. *Leukemia*. 2014;28(2):431-433.
405. Rampal R, Ahn J, Abdel-Wahab O, et al. Genomic and functional analysis of leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(50):E5401-5410.
406. Jehn U, Mittermuller J, Greither L, et al. Repeated blast crisis (BC) of changing morphology, immunologic phenotype and cytogenetics in chronic myeloid leukemia (CML). *Anticancer Res*. 1989;9(6):1721-1723.
407. Ligler FS, Brodsky I, Schlam ML, Fuscaldo KE. Cytogenetics and cell surface marker analysis in CML-1. Prediction of phenotype of acute phase transformation. *Leuk Res*. 1985;9(9):1093-1098.
408. Ligler FS, Brodsky I, Schlam ML, Fuscaldo KE. Cytogenetics and flow cytometry may predict phenotype of CML blast crisis. *Cancer Detect Prev*. 1985;8(1-2):317-323.
409. Ouyang J, Zheng W, Shen Q, et al. Flow cytometry immunophenotypic analysis of Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms: Correlation with histopathologic features. *Cytometry B Clin Cytom*. 2014.
410. Barbui T, Thiele J, Vannucchi AM, Tefferi A. Rationale for revision and proposed changes of the WHO diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia and primary myelofibrosis. *Blood Cancer Journal*. 2015;5(8):e337.

411. Ortmann CA, Kent DG, Nangalia J, et al. Effect of mutation order on myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2015;372(7):601-612.
412. Kern W, Bacher U, Schnittger S, Alpermann T, Haferlach C, Haferlach T. Multiparameter flow cytometry reveals myelodysplasia-related aberrant antigen expression in myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Cytometry B Clin Cytom*. 2013;84(3):194-197.
413. Vainchenker W, Plo I. EZH2: a molecular switch of the MPN phenotype. *Blood*. 2016;127(26):3297-3298.
414. Rosti V, Campanelli R, Massa M, et al. Increased plasma nicotinamide phosphoribosyltransferase is associated with a hyperproliferative phenotype and restrains disease progression in MPN-associated myelofibrosis. *Am J Hematol*. 2016;91(7):709-713.
415. Schwaab J, Ernst T, Erben P, et al. Activating CBL mutations are associated with a distinct MDS/MPN phenotype. *Ann Hematol*. 2012;91(11):1713-1720.
416. Levine RL, Loriaux M, Huntly BJ, et al. The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2005;106(10):3377-3379.
417. Jelinek J, Oki Y, Gharibyan V, et al. JAK2 mutation 1849G>T is rare in acute leukemias but can be found in CMML, Philadelphia chromosome-negative CML, and megakaryocytic leukemia. *Blood*. 2005;106(10):3370-3373.
418. Kohlmann A, Grossmann V, Klein HU, et al. Next-generation sequencing technology reveals a characteristic pattern of molecular mutations in 72.8% of chronic myelomonocytic leukemia by detecting frequent alterations in TET2, CBL, RAS, and RUNX1. *J Clin Oncol*. 2010;28(24):3858-3865.
419. Kuo MC, Liang DC, Huang CF, et al. RUNX1 mutations are frequent in chronic myelomonocytic leukemia and mutations at the C-terminal region might predict acute myeloid leukemia transformation. *Leukemia*. 2009;23(8):1426-1431.
420. Bacher U, Haferlach T, Schnittger S, Kreipe H, Kroger N. Recent advances in diagnosis, molecular pathology and therapy of chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2011;153(2):149-167.
421. Jankowska AM, Makishima H, Tiu RV, et al. Mutational spectrum analysis of chronic myelomonocytic leukemia includes genes associated with epigenetic regulation: UTX, EZH2, and DNMT3A. *Blood*. 2011;118(14):3932-3941.
422. Tang G, Zhang L, Fu B, et al. Cytogenetic risk stratification of 417 patients with chronic myelomonocytic leukemia from a single institution. *Am J Hematol*. 2014;89(8):813-818.
423. Such E, Cervera J, Costa D, et al. Cytogenetic risk stratification in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica*. 2011;96(3):375-383.
424. Itzykson R, Kosmider O, Renneville A, et al. Clonal architecture of chronic myelomonocytic leukemias. *Blood*. 2013;121(12):2186-2198.
425. Matarraz S, Almeida J, Flores-Montero J, et al. Introduction to the diagnosis and classification of monocytic-lineage leukemias by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2015.
426. Sojitra P, Gandhi P, Fitting P, et al. Chronic myelomonocytic leukemia monocytes uniformly display a population of monocytes with CD11c underexpression. *Am J Clin Pathol*. 2013;140(5):686-692.
427. Pavlu J, Emmerson J, Marks AJ, Bain BJ. Idiopathic cytopenia of undetermined significance and the minimal criteria for a diagnosis of myelodysplastic syndrome. *Leuk Lymphoma*. 2011;52(3):515-516.
428. Muroi K, Fujiwara S, Tataru R, et al. CD56 expression in normal immature granulocytes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Exp Hematop*. 2013;53(3):247-250.
429. Sconocchia G, Keyvanfar K, El Ouriaghli F, et al. Phenotype and function of a CD56+ peripheral blood monocyte. *Leukemia*. 2005;19(1):69-76.
430. Shen Q, Ouyang J, Tang G, et al. Flow cytometry immunophenotypic findings in chronic myelomonocytic leukemia and its utility in monitoring treatment response. *Eur J Haematol*. 2015;95(2):168-176.
431. Cesana C, Regazzi E, Garau D, Caramatti C, Mangoni L, Rizzoli V. Clonogenic potential and phenotypic analysis of CD34+ cells mobilized by different chemotherapy regimens. *Haematologica*. 1999;84(9):771-778.
432. Tang G, Jorgensen LJ, Zhou Y, et al. Multi-color CD34(+) progenitor-focused flow cytometric assay in evaluation of myelodysplastic syndromes in patients with post cancer therapy cytopenia. *Leuk Res*. 2012;36(8):974-981.

433. Subira D, Font P, Villalon L, et al. Immunophenotype in chronic myelomonocytic leukemia: is it closer to myelodysplastic syndromes or to myeloproliferative disorders? *Transl Res.* 2008;151(5):240-245.
434. Ogata K, Nakamura K, Yokose N, et al. Clinical significance of phenotypic features of blasts in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood.* 2002;100(12):3887-3896.
435. Font P, Subira D. Expression of CD7 in myelodysplastic syndromes (MDS): is this a truly prognostic factor? *Leuk Res.* 2008;32(1):185-186.
436. Font P, Subira D, Mtnez-Chamorro C, et al. Evaluation of CD7 and terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) expression in CD34+ myeloblasts from patients with myelodysplastic syndrome. *Leuk Res.* 2006;30(8):957-963.
437. Normann AP, Egeland T, Madshus IH, Heim S, Tjonnfjord GE. CD7 expression by CD34+ cells in CML patients, of prognostic significance? *Eur J Haematol.* 2003;71(4):266-275.
438. Xiang Z, Zhao Y, Mitaksov V, et al. Identification of somatic JAK1 mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2008;111(9):4809-4812.
439. Dohner K, Paschka P, Dohner H. [Acute myeloid leukemia]. *Internist (Berl).* 2015;56(4):354-363.
440. Finn L, Sproat L, Heckman MG, et al. Epidemiology of adult acute myeloid leukemia: Impact of exposures on clinical phenotypes and outcomes after therapy. *Cancer Epidemiol.* 2015;39(6):1084-1092.
441. Deschler B, Lubbert M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer.* 2006;107(9):2099-2107.
442. Davies S. Epidemiology of acute leukemia: what do we know and what do we need to learn? *Clin Adv Hematol Oncol.* 2003;1(6):339-340.
443. Sandler DP. Epidemiology and etiology of acute leukemia: an update. *Leukemia.* 1992;6 Suppl 4:3-5.
444. Sandler DP. Epidemiology of acute myelogenous leukemia. *Semin Oncol.* 1987;14(4):359-364.
445. Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2002;52(1):23-47.
446. Walter MJ. What came first: MDS or AML? *Blood.* 2015;125(9):1357-1358.
447. Sperling C, Buchner T, Creutzig U, et al. Clinical, morphologic, cytogenetic and prognostic implications of CD34 expression in childhood and adult de novo AML. *Leuk Lymphoma.* 1995;17(5-6):417-426.
448. Pagliaro LC, Stanley WS. Interphase FISH and morphologic analysis of AML. *Cancer Genet Cytogenet.* 1993;67(2):95-100.
449. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol.* 1976;33(4):451-458.
450. Kadia TM, Ravandi F, O'Brien S, Cortes J, Kantarjian HM. Progress in acute myeloid leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2015;15(3):139-151.
451. Walter MJ. What came first: MDS or AML? *Blood.* 2015;125(9):1357-1358.
452. Ding L, Ley TJ, Larson DE, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature.* 2012;481(7382):506-510.
453. Cancer Genome Atlas Research N. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2013;368(22):2059-2074.
454. Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, et al. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature.* 2014;506(7488):328-333.
455. Corces-Zimmerman MR, Hong WJ, Weissman IL, Medeiros BC, Majeti R. Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(7):2548-2553.
456. Dohner H, Estey EH, Amadori S, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood.* 2010;115(3):453-474.
457. Bret C, Viziteu E, Kassambara A, Moreaux J. Identifying high-risk adult AML patients: epigenetic and genetic risk factors and their implications for therapy. *Expert Rev Hematol.* 2016;9(4):351-360.
458. Vidriales MB, Perez-Lopez E, Pegenaute C, et al. Minimal residual disease evaluation by flow cytometry is a complementary tool to cytogenetics for treatment decisions in acute myeloid leukaemia. *Leuk Res.* 2015.

459. Terwijn M, van Putten WL, Kelder A, et al. High prognostic impact of flow cytometric minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia: data from the HOVON/SAKK AML 42A study. *J Clin Oncol.* 2013;31(31):3889-3897.
460. Inaba H, Coustan-Smith E, Cao X, et al. Comparative analysis of different approaches to measure treatment response in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2012;30(29):3625-3632.
461. Ortuño FJ DSM, Orfao A. Flow cytometry in the diagnosis and follow-up of acute leukemia: the state of the art. In: Jeffries LP, ed. *Frontiers in Cancer Research*: Nueva Cork: Nova Science Publishers; 2006:1-52.
462. Orfao A, Ortuno F, de Santiago M, Lopez A, San Miguel J. Immunophenotyping of acute leukemias and myelodysplastic syndromes. *Cytometry A.* 2004;58(1):62-71.
463. Bene MC, Bernier M, Casasnovas RO, et al. Acute myeloid leukaemia M0: haematological, immunophenotypic and cytogenetic characteristics and their prognostic significance: an analysis in 241 patients. *Br J Haematol.* 2001;113(3):737-745.
464. Orfao A, Chillon MC, Bortoluci AM, et al. The flow cytometric pattern of CD34, CD15 and CD13 expression in acute myeloblastic leukemia is highly characteristic of the presence of PML-RARalpha gene rearrangements. *Haematologica.* 1999;84(5):405-412.
465. Gorczyca W. Flow cytometry immunophenotypic characteristics of monocytic population in acute monocytic leukemia (AML-M5), acute myelomonocytic leukemia (AML-M4), and chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Methods Cell Biol.* 2004;75:665-677.
466. Casasnovas RO, Slimane FK, Garand R, et al. Immunological classification of acute myeloblastic leukemias: relevance to patient outcome. *Leukemia.* 2003;17(3):515-527.
467. Casasnovas RO, Campos L, Mugneret F, et al. Immunophenotypic patterns and cytogenetic anomalies in acute non-lymphoblastic leukemia subtypes: a prospective study of 432 patients. *Leukemia.* 1998;12(1):34-43.
468. Ruiz-Arguelles A, Rivadeneyra-Espinoza L, Duque RE, Orfao A, Latin American Consensus C. Report on the second Latin American consensus conference for flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies. *Cytometry B Clin Cytom.* 2006;70(1):39-44.
469. Wood BL, Arroz M, Barnett D, et al. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. *Cytometry B Clin Cytom.* 2007;72 Suppl 1:S14-22.
470. Andrieu V, Radford-Weiss I, Troussard X, et al. Molecular detection of t(8;21)/AML1-ETO in AML M1/M2: correlation with cytogenetics, morphology and immunophenotype. *Br J Haematol.* 1996;92(4):855-865.
471. Bahia DM, Yamamoto M, Chauffaille Mde L, et al. Aberrant phenotypes in acute myeloid leukemia: a high frequency and its clinical significance. *Haematologica.* 2001;86(8):801-806.
472. Mauvieux L, Delabesse E, Bourquelot P, et al. NG2 expression in MLL rearranged acute myeloid leukaemia is restricted to monoblastic cases. *Br J Haematol.* 1999;107(3):674-676.
473. Menendez P, Bueno C. Expression of NG2 antigen in MLL-rearranged acute leukemias: how complex does it get? *Leuk Res.* 2011;35(8):989-990.
474. Hilden JM, Smith FO, Frestedt JL, et al. MLL gene rearrangement, cytogenetic 11q23 abnormalities, and expression of the NG2 molecule in infant acute myeloid leukemia. *Blood.* 1997;89(10):3801-3805.
475. Falini B, Nicoletti I, Martelli MF, Mecucci C. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features. *Blood.* 2007;109(3):874-885.
476. Chen CY, Chou WC, Tsay W, et al. Hierarchical cluster analysis of immunophenotype classify AML patients with NPM1 gene mutation into two groups with distinct prognosis. *BMC Cancer.* 2013;13:107.
477. Dalal BI, Mansoor S, Manna M, Pi S, Sauro GD, Hogge DE. Detection of CD34, TdT, CD56, CD2, CD4, and CD14 by flow cytometry is associated with NPM1 and FLT3 mutation status in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2012;12(4):274-279.
478. Paietta E, Wiernik PH, Andersen J, Bennett J, Yunis J. Acute myeloid leukemia M4 with inv(16)(p13q22) exhibits a specific immunophenotype with CD2 expression. *Blood.* 1993;82(8):2595.
479. Adriaansen HJ, te Boekhorst PA, Hagemeyer AM, van der Schoot CE, Delwel HR, van Dongen JJ. Acute myeloid leukemia M4 with bone marrow eosinophilia (M4Eo) and inv(16)(p13q22) exhibits a specific immunophenotype with CD2 expression. *Blood.* 1993;81(11):3043-3051.

480. Perea G, Domingo A, Villamor N, et al. Adverse prognostic impact of CD36 and CD2 expression in adult de novo acute myeloid leukemia patients. *Leuk Res*. 2005;29(10):1109-1116.
481. 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. *Annals of Internal Medicine*. 1985;103(4):620-625.
482. Martin-Martin L, Lopez A, Vidriales B, et al. Classification and clinical behavior of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms according to their maturation-associated immunophenotypic profile. *Oncotarget*. 2015;6(22):19204-19216.
483. Breccia M, Loglisci G, Loglisci MG, et al. FLT3-ITD confers poor prognosis in patients with acute promyelocytic leukemia treated with AIDA protocols: long-term follow-up analysis. *Haematologica*. 2013;98(12):e161-163.
484. Tallman MS, Kim HT, Montesinos P, et al. Does microgranular variant morphology of acute promyelocytic leukemia independently predict a less favorable outcome compared with classical M3 APL? A joint study of the North American Intergroup and the PETHEMA Group. *Blood*. 2010;116(25):5650-5659.
485. Haferlach T, Kohlmann A, Schnittger S, et al. AML M3 and AML M3 variant each have a distinct gene expression signature but also share patterns different from other genetically defined AML subtypes. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005;43(2):113-127.
486. Esteve J, Escoda L, Martin G, et al. Outcome of patients with acute promyelocytic leukemia failing to front-line treatment with all-trans retinoic acid and anthracycline-based chemotherapy (PETHEMA protocols LPA96 and LPA99): benefit of an early intervention. *Leukemia*. 2007;21(3):446-452.
487. Avvisati G. Coagulopathy in APL: a step forward? *Blood*. 2012;120(1):4-6.
488. Cassinat B, Chevret S, Zassadowski F, et al. In vitro all-trans retinoic acid sensitivity of acute promyelocytic leukemia blasts: a novel indicator of poor patient outcome. *Blood*. 2001;98(9):2862-2864.
489. Douer D, Estey E, Santillana S, et al. Treatment of newly diagnosed and relapsed acute promyelocytic leukemia with intravenous liposomal all-trans retinoic acid. *Blood*. 2001;97(1):73-80.
490. Fadilah SA, Hatta AZ, Keng CS, Jamil MA, Singh S. Successful treatment of acute promyelocytic leukemia in pregnancy with all-trans retinoic acid. *Leukemia*. 2001;15(10):1665-1666.
491. Degos L, Wang ZY. All trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene*. 2001;20(49):7140-7145.
492. Duchayne E, Demur C, Rubie H, Robert A, Dastugue N. Diagnosis of acute basophilic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 1999;32(3-4):269-278.
493. Taj AS, Ross FM, Vickers M, et al. t(8;21) myelodysplasia, an early presentation of M2 AML. *Br J Haematol*. 1995;89(4):890-892.
494. Gotoh H, Murakami S, Oku N, et al. Translocations t(15;17) and t(9;14)(q34;q22) in a case of acute promyelocytic leukemia with increased number of basophils. *Cancer Genet Cytogenet*. 1988;36(1):103-107.
495. Umeda M, Nojima Z, Yamaguchi R, Kato M, Yamauchi M, Shirai T. [Two cases of acute promyelocytic leukemia with marked basophilia--a variant type of APL with the capability of differentiating into basophils]. *Rinsho Ketsueki*. 1987;28(11):2004-2009.
496. Mancini M, Cedrone M, Diverio D, et al. Use of dual-color interphase FISH for the detection of inv(16) in acute myeloid leukemia at diagnosis, relapse and during follow-up: a study of 23 patients. *Leukemia*. 2000;14(3):364-368.
497. Martinet D, Muhlematter D, Leeman M, et al. Detection of 16 p deletions by FISH in patients with inv(16) or t(16;16) and acute myeloid leukemia (AML). *Leukemia*. 1997;11(7):964-970.
498. Liu P, Seidel N, Bodine D, Speck N, Tarle S, Collins FS. Acute myeloid leukemia with Inv (16) produces a chimeric transcription factor with a myosin heavy chain tail. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1994;59:547-553.
499. Cigudosa JC, Calasanz MJ, Gullon A, Cuesta B, Rifon J, Rocha E. [Cytogenetic marker del(12p) in a case of acute myeloid leukemia M4 with eosinophilia and inv(16)]. *Sangre (Barc)*. 1992;37(2):125-127.
500. Jaffe ES, World Health Organization. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon

Oxford: IARC Press ;

Oxford University Press (distributor); 2001.

501. Gaidzik VI, Teleanu V, Papaemmanuil E, et al. RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia are associated with distinct clinico-pathologic and genetic features. *Leukemia*. 2016.
502. Mendler JH, Maharry K, Radmacher MD, et al. RUNX1 mutations are associated with poor outcome in younger and older patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia and with distinct gene and MicroRNA expression signatures. *J Clin Oncol*. 2012;30(25):3109-3118.
503. Schnittger S, Dicker F, Kern W, et al. RUNX1 mutations are frequent in de novo AML with noncomplex karyotype and confer an unfavorable prognosis. *Blood*. 2011;117(8):2348-2357.
504. Gaidzik VI, Bullinger L, Schlenk RF, et al. RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia: results from a comprehensive genetic and clinical analysis from the AML study group. *J Clin Oncol*. 2011;29(10):1364-1372.
505. Tang JL, Hou HA, Chen CY, et al. AML1/RUNX1 mutations in 470 adult patients with de novo acute myeloid leukemia: prognostic implication and interaction with other gene alterations. *Blood*. 2009;114(26):5352-5361.
506. Porwit A, Vardiman JW. Acute myeloid leukemia with expanded erythropoiesis. *Haematologica*. 2011;96(9):1241-1243.
507. Wang SA, Hasserjian RP. Acute Erythroleukemias, Acute Megakaryoblastic Leukemias, and Reactive Mimics: A Guide to a Number of Perplexing Entities. *Am J Clin Pathol*. 2015;144(1):44-60.
508. Churpek JE, Marquez R, Neistadt B, et al. Inherited mutations in cancer susceptibility genes are common among survivors of breast cancer who develop therapy-related leukemia. *Cancer*. 2016;122(2):304-311.
509. Yoshida K, Toki T, Okuno Y, et al. The landscape of somatic mutations in Down syndrome-related myeloid disorders. *Nat Genet*. 2013;45(11):1293-1299.
510. Shimizu H, Yokohama A, Hatsumi N, et al. Philadelphia chromosome-positive mixed phenotype acute leukemia in the imatinib era. *Eur J Haematol*. 2014;93(4):297-301.
511. Kawajiri C, Tanaka H, Hashimoto S, et al. Successful treatment of Philadelphia chromosome-positive mixed phenotype acute leukemia by appropriate alternation of second-generation tyrosine kinase inhibitors according to BCR-ABL1 mutation status. *Int J Hematol*. 2014;99(4):513-518.
512. Horny H.P AC, Arber D. et al. Mastocytosis. In: World Health Organization (WHO) Classification of Tumours. Pathology & Genetics. Tomours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. In: Swerdlow SH CE, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, ed. World Health Organization (WHO) Classification of Tumours Pathology & Genetics Tomours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues Lyon, France: In press; 2016.
513. Brockow K. Epidemiology, prognosis, and risk factors in mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2014;34(2):283-295.
514. Gülen T, Hägglund H, Dahlén B, Nilsson G. Mastocytosis: the puzzling clinical spectrum and challenging diagnostic aspects of an enigmatic disease. *Journal of Internal Medicine*. 2015.
515. Theoharides TC, Valent P, Akin C. Mast Cells, Mastocytosis, and Related Disorders. *N Engl J Med*. 2015;373(19):1885-1886.
516. Cohen SS, Skovbo S, Vestergaard H, et al. Epidemiology of systemic mastocytosis in Denmark. *British journal of haematology*. 2014;166(4):521-528.
517. Theoharides TC, Valent P, Akin C. Mast Cells, Mastocytosis, and Related Disorders. *The New England journal of medicine*. 2015;373(2):163-172.
518. Carvalhosa AB, Aouba A, Damaj G, et al. A French National Survey on Clotting Disorders in Mastocytosis. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(40):e1414.
519. Erben P, Schwaab J, Metzgeroth G, et al. The KIT D816V expressed allele burden for diagnosis and disease monitoring of systemic mastocytosis. *Ann Hematol*. 2014;93(1):81-88.
520. Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C, et al. KIT mutation in mast cells and other bone marrow hematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood*. 2006;108(7):2366-2372.
521. Horny HP MD, Bennett JM, Bain BJ, Akin C, Escribano L, et al. Mastocytosis. . Mastocytosis. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, editors. World Health Organization (WHO) classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and

- lymphoid tissues. 4th ed. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer (IARC); 2008. p. 54-63.; 2008.
522. Gotlib J, Pardanani A, Akin C, et al. International Working Group-Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment (IWG-MRT) & European Competence Network on Mastocytosis (ECNM) consensus response criteria in advanced systemic mastocytosis. *Blood*. 2013;121(13):2393-2401.
523. Schwaab J, Schnittger S, Sotlar K, et al. Comprehensive mutational profiling in advanced systemic mastocytosis. *Blood*. 2013;122(14):2460-2466.
524. Horny H.P Metcalfe D.D BJM, Bain B.J, Akin C, Escribano L et al. Mastocytosis, in WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. In: Swerdlow SH CE HN, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW ed. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Vol. 2. Lyon: IARC; 2008:54-63.
525. Valent P. Mastocytosis: a paradigmatic example of a rare disease with complex biology and pathology. *Am J Cancer Res*. 2013;3(2):159-172.
526. Alvarez-Twose I, Bonadonna P, Matito A, et al. Systemic mastocytosis as a risk factor for severe Hymenoptera sting-induced anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(2):614-615.
527. Escribano L, Alvarez-Twose I, Sanchez-Munoz L, et al. Prognosis in adult indolent systemic mastocytosis: a long-term study of the Spanish Network on Mastocytosis in a series of 145 patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(3):514-521.
528. Alvarez-Twose I, Gonzalez de Olano D, Sanchez-Munoz L, et al. Clinical, biological, and molecular characteristics of clonal mast cell disorders presenting with systemic mast cell activation symptoms. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(6):1269-1278 e1262.
529. Bonadonna P, Zanotti R, Pagani M, et al. How much specific is the association between hymenoptera venom allergy and mastocytosis? *Allergy*. 2009;64(9):1379-1382.
530. Pardanani A, Akin C, Valent P. Pathogenesis, clinical features, and treatment advances in mastocytosis. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2006;19(3):595-615.
531. Aichberger KJ, Mayerhofer M, Gleixner KV, et al. Identification of MCL1 as a novel target in neoplastic mast cells in systemic mastocytosis: inhibition of mast cell survival by MCL1 antisense oligonucleotides and synergism with PKC412. *Blood*. 2007;109(7):3031-3041.
532. Bibi S, Langenfeld F, Jeanningros S, et al. Molecular defects in mastocytosis: KIT and beyond KIT. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2014;34(2):239-262.
533. Arock M, Sotlar K, Akin C, et al. KIT mutation analysis in mast cell neoplasms: recommendations of the European Competence Network on Mastocytosis. *Leukemia*. 2015;29(6):1223-1232.
534. Lasho T, Finke C, Zblewski D, et al. Concurrent activating KIT mutations in systemic mastocytosis. *Br J Haematol*. 2015.
535. Valent P, Akin C, Sperr WR, Horny HP, Metcalfe DD. Smouldering mastocytosis: a novel subtype of systemic mastocytosis with slow progression. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002;127(2):137-139.
536. Shah M, Holyoake TL, Jackson B, Drummond M. Smouldering systemic mastocytosis presenting with cryptic life-threatening crises: case report and literature review. *Scott Med J*. 2012;57(1):60.
537. Pardanani A. Systemic mastocytosis in adults: 2013 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol*. 2013;88(7):612-624.
538. Abdulla MH, Ruelas DS, Wolff B, et al. Drug discovery for schistosomiasis: hit and lead compounds identified in a library of known drugs by medium-throughput phenotypic screening. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3(7):e478.
539. Gangat N, Patnaik MM, Begna K, et al. Evaluation of revised IPSS cytogenetic risk stratification and prognostic impact of monosomal karyotype in 783 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Am J Hematol*. 2013;88(8):690-693.
540. Alvarez-Twose I, Gonzalez P, Morgado JM, et al. Complete response after imatinib mesylate therapy in a patient with well-differentiated systemic mastocytosis. *J Clin Oncol*. 2012;30(12):e126-129.
541. Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, Alvarez-Twose I, et al. KIT D816V mutated bone marrow mesenchymal stem cells in indolent systemic mastocytosis are associated with disease progression. *Blood*. 2015.
542. Adela Avila S, Penalzoza J, Gonzalez F, et al. Dysphagia, melanosis, gastrointestinal stromal tumors and a germinal mutation of the KIT gene in an Argentine family. *Acta Gastroenterol Latinoam*. 2014;44(1):9-15.

543. Speight RA, Nicolle A, Needham SJ, Verrill MW, Bryon J, Panter S. Rare, germline mutation of KIT with imatinib-resistant multiple GI stromal tumors and mastocytosis. *J Clin Oncol*. 2013;31(16):e245-247.
544. Hartmann K, Wardelmann E, Ma Y, et al. Novel germline mutation of KIT associated with familial gastrointestinal stromal tumors and mastocytosis. *Gastroenterology*. 2005;129(3):1042-1046.
545. Sotlar K, Colak S, Bache A, et al. Variable presence of KITD816V in clonal haematological non-mast cell lineage diseases associated with systemic mastocytosis (SM-AHNMD). *J Pathol*. 2010;220(5):586-595.
546. Travis WD, Li CY, Yam LT, Bergstralh EJ, Swee RG. Significance of systemic mast cell disease with associated hematologic disorders. *Cancer*. 1988;62(5):965-972.
547. Horny HP, Sotlar K, Sperr WR, Valent P. Systemic mastocytosis with associated clonal haematological non-mast cell lineage diseases: a histopathological challenge. *J Clin Pathol*. 2004;57(6):604-608.
548. Pardanani A, Lim KH, Lasho TL, et al. Prognostically relevant breakdown of 123 patients with systemic mastocytosis associated with other myeloid malignancies. *Blood*. 2009;114(18):3769-3772.
549. Lim KH, Tefferi A, Lasho TL, et al. Systemic mastocytosis in 342 consecutive adults: survival studies and prognostic factors. *Blood*. 2009;113(23):5727-5736.
550. Pardanani A, Lim K-HH, Lasho TL, et al. Prognostically relevant breakdown of 123 patients with systemic mastocytosis associated with other myeloid malignancies. *Blood*. 2009;114(18):3769-3772.
551. Fritsche-Polanz R, Fritz M, Huber A, et al. High frequency of concomitant mastocytosis in patients with acute myeloid leukemia exhibiting the transforming KIT mutation D816V. *Mol Oncol*. 2010;4(4):335-346.
552. Jawhar M, Schwaab J, Schnittger S, et al. Additional mutations in SRSF2, ASXL1 and/or RUNX1 identify a high-risk group of patients with KIT D816V(+) advanced systemic mastocytosis. *Leukemia*. 2016;30(1):136-143.
553. Soucie E, Hanssens K, Mercher T, et al. In aggressive forms of mastocytosis, TET2 loss cooperates with c-KITD816V to transform mast cells. *Blood*. 2012;120(24):4846-4849.
554. Damaj G, Joris M, Chandesris O, et al. ASXL1 but not TET2 mutations adversely impact overall survival of patients suffering systemic mastocytosis with associated clonal hematologic non-mast-cell diseases. *PLoS one*. 2014;9(1).
555. Traina F, Visconte V, Jankowska AM, et al. Single Nucleotide Polymorphism Array Lesions, TET2, DNMT3A, ASXL1 and CBL Mutations Are Present in Systemic Mastocytosis. *PLoS ONE*. 2012;7(8).
556. Valent P AC, Hartmann K, Nilsson G, Reiter A, Herminie O, Sotlar K, Sperr W, Escribano L, Orfao A, Metcalfe D, et al. Updates in the classification and treatment of mast cell disorders: historical overview, current status and outlook into the future. *In press*. 2016.
557. Akin C, Valent P. Diagnostic criteria and classification of mastocytosis in 2014. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2014;34(2):207-218.
558. Alvarez-Twose I, Jara-Acevedo M, Morgado JM, et al. Clinical, immunophenotypic, and molecular characteristics of well-differentiated systemic mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(1):168-178 e161.
559. Alvarez-Twose I, Jara-Acevedo M, Morgado JM, et al. Clinical, immunophenotypic, and molecular characteristics of well-differentiated systemic mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2015.
560. Morgado JM, Perbellini O, Johnson RC, et al. CD30 expression by bone marrow mast cells from different diagnostic variants of systemic mastocytosis. *Histopathology*. 2013;63(6):780-787.
561. Pardanani A. Systemic mastocytosis in adults: 2015 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol*. 2015;90(3):250-262.
562. Arock M, Akin C, Hermine O, Valent P. Current treatment options in patients with mastocytosis: status in 2015 and future perspectives. *Eur J Haematol*. 2015.
563. Verstovsek S. Advanced systemic mastocytosis: the impact of KIT mutations in diagnosis, treatment, and progression. *Eur J Haematol*. 2013;90(2):89-98.
564. Sotlar K. [Therapeutically relevant mutations in the receptor tyrosine kinase KIT in mastocytosis]. *Verh Dtsch Ges Pathol*. 2007;91:169-176.
565. Schwaab J, Schnittger S, Sotlar K, et al. Comprehensive mutational profiling in advanced systemic mastocytosis. *Blood*. 2013;122(14):2460-2466.

566. Pardanani A, Baek JY, Li CY, Butterfield JH, Tefferi A. Systemic mast cell disease without associated hematologic disorder: a combined retrospective and prospective study. *Mayo Clin Proc.* 2002;77(11):1169-1175.
567. Mayado A, Teodosio C, Garcia-Montero AC, et al. Increased IL6 plasma levels in indolent systemic mastocytosis patients are associated with high risk of disease progression. *Leukemia.* 2016;30(1):124-130.
568. Yamasaki M. A preliminary note on the intramedullary hematopoiesis. *Tohoku J Exp Med.* 1950;52(3-4):222.
569. Cartwright GE, Wintrobe MM. Hematopoiesis. *Annu Rev Physiol.* 1949;11:335-354.
570. Jacobson LO, Simmons EL, Marks EK, Eldredge JH. Recovery from radiation injury. *Science.* 1951;113(2940):510-511.
571. Koh CP, Ng CE, Nah GS, et al. Hematopoietic stem cell enhancer: a powerful tool in stem cell biology. *Histol Histopathol.* 2015;30(6):661-672.
572. Passegue E, Wagers AJ. Regulating quiescence: new insights into hematopoietic stem cell biology. *Dev Cell.* 2006;10(4):415-417.
573. Bonde J, Hess DA, Nolte JA. Recent advances in hematopoietic stem cell biology. *Curr Opin Hematol.* 2004;11(6):392-398.
574. Takano H, Ema H, Sudo K, Nakauchi H. Asymmetric division and lineage commitment at the level of hematopoietic stem cells: inference from differentiation in daughter cell and granddaughter cell pairs. *J Exp Med.* 2004;199(3):295-302.
575. Stewart CR. Asymmetric replication and cellular differentiation. *J Theor Biol.* 1972;36(3):639-640.
576. Giebel B, Bruns I. Self-renewal versus differentiation in hematopoietic stem and progenitor cells: a focus on asymmetric cell divisions. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2008;3(1):9-16.
577. Lai JL, Fenaux P. [Cytogenetics and myelodysplastic syndromes (MDS)]. *Nouv Rev Fr Hematol.* 1991;33(2):160-162.
578. Lang F, Wojcik B, Rieger MA. Stem Cell Hierarchy and Clonal Evolution in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Stem Cells Int.* 2015;2015:137164.
579. Tefferi A. Myeloproliferative neoplasms: thrombophilic clonal stem cell diseases. *Cancer Treat Res.* 2009;148:157-179.
580. Calabrese P, Tavaré S, Shibata D. Pretumor progression: clonal evolution of human stem cell populations. *Am J Pathol.* 2004;164(4):1337-1346.
581. Bergamaschi G. Clonal nature of hematopoietic stem cell disorders. *Haematologica.* 2004;89(1):5-6.
582. Li Z, Fehse B, Schiedlmeier B, et al. Persisting multilineage transgene expression in the clonal progeny of a hematopoietic stem cell. *Leukemia.* 2002;16(9):1655-1663.
583. McCulloch EA. Stem cell renewal and determination during clonal expansion in normal and leukaemic haemopoiesis. *Cell Prolif.* 1993;26(5):399-425.
584. Lemischka IR. The haematopoietic stem cell and its clonal progeny: mechanisms regulating the hierarchy of primitive haematopoietic cells. *Cancer Surv.* 1992;15:3-18.
585. Smith LG, Weissman IL, Heimfeld S. Clonal analysis of hematopoietic stem-cell differentiation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(7):2788-2792.
586. Janssen JW, Buschle M, Layton M, et al. Clonal analysis of myelodysplastic syndromes: evidence of multipotent stem cell origin. *Blood.* 1989;73(1):248-254.
587. Boggs DR. Clonal diseases of the myeloid stem cell systems. *Haematol Blood Transfus.* 1979;23:191-197.
588. Greenberg PL, Attar E, Bennett JM, et al. Myelodysplastic syndromes: clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 2013;11(7):838-874.
589. Repp R, Schaekel U, Helm G, et al. Immunophenotyping is an independent factor for risk stratification in AML. *Cytometry B Clin Cytom.* 2003;53(1):11-19.
590. Neame PB, Soamboonsrup P, Browman GP, et al. Classifying acute leukemia by immunophenotyping: a combined FAB-immunologic classification of AML. *Blood.* 1986;68(6):1355-1362.
591. Reith AD, Rottapel R, Giddens E, Brady C, Forrester L, Bernstein A. W mutant mice with mild or severe developmental defects contain distinct point mutations in the kinase domain of the c-kit receptor. *Genes Dev.* 1990;4(3):390-400.

592. Orfao A, Garcia-Montero AC, Sanchez L, Escribano L, Rema. Recent advances in the understanding of mastocytosis: the role of KIT mutations. *Br J Haematol*. 2007;138(1):12-30.
593. Pegoraro L, Avanzi G, Lista P. Growth and differentiation factors in human hematopoiesis. *Haematologica*. 1988;73(6):525-543.
594. Dorshkind K. Not a split decision for human hematopoiesis. *Nat Immunol*. 2010;11(7):569-570.
595. Longo DL, Harrison TR. Harrison's hematology and oncology. New York: McGraw-Hill Medical; 2010.
596. Kaushansky K, Williams WJ. Williams hematology (ed 8th ed). New York etc.: McGraw-Hill Medical; 2010.
597. Tembhare PR, Yuan CM, Venzon D, et al. Flow cytometric differentiation of abnormal and normal plasma cells in the bone marrow in patients with multiple myeloma and its precursor diseases. *Leuk Res*. 2014;38(3):371-376.
598. Mirabelli P, Di Noto R, Lo Pardo C, et al. Extended flow cytometry characterization of normal bone marrow progenitor cells by simultaneous detection of aldehyde dehydrogenase and early hematopoietic antigens: implication for erythroid differentiation studies. *BMC Physiol*. 2008;8:13.
599. Blanc C, Legac E, Binet JL, Michel A, Debre P, Merle-Beral H. Characterization of normal human bone marrow by flow cytometry. *Nouv Rev Fr Hematol*. 1991;33(3):231-235.
600. Garg M, Nagata Y, Kanojia D, et al. Profiling of somatic mutations of acute myeloid leukemia, FLT3-ITD subgroup at diagnosis and relapse. *Blood*. 2015.
601. Chun K, Hagemeijer A, Iqbal A, Slovak ML. 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*. 2010;34(2):160-165.
602. Salamanchuk Z, Jakobczyk M, Nowak W, Skotnicki AB. Complex cytogenetics in a case of probably work related MDS/AML. *Leuk Res*. 2004;28(12):1357-1361.
603. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*. 2008;111(8):3941-3967.
604. Orfao A, Schmitz G, Brando B, et al. Clinically useful information provided by the flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies: current status and future directions. *Clin Chem*. 1999;45(10):1708-1717.
605. Foon KA, Todd RF, 3rd. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood*. 1986;68(1):1-31.
606. Foon KA, Gale RP. Immunologic classification of lymphoma and lymphoid leukemia. *Blood Rev*. 1987;1(2):77-88.
607. Porwit A, Rajab A. Flow cytometry immunophenotyping in integrated diagnostics of patients with newly diagnosed cytopenia: one tube 10-color 14-antibody screening panel and 3-tube extensive panel for detection of MDS-related features. *Int J Lab Hematol*. 2015;37 Suppl 1:133-143.
608. Sandes AF, Yamamoto M, Matarraz S, et al. Altered immunophenotypic features of peripheral blood platelets in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2012;97(6):895-902.
609. Antony-Debre I, Duployez N, Bucci M, et al. Somatic mutations associated with leukemic progression of familial platelet disorder with predisposition to acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2015.
610. Akiyama M, Yamaoka M, Mikami-Terao Y, et al. Somatic mosaic mutations of IDH1 and NPM1 associated with cup-like acute myeloid leukemia in a patient with Maffucci syndrome. *Int J Hematol*. 2015.
611. Park S, Koh Y, Yoon SS. Effects of somatic mutations are associated with SNP in the progression of individual acute myeloid leukemia patient: the two-hit theory explains inherited predisposition to pathogenesis. *Genomics Inform*. 2013;11(1):34-37.
612. Fried I, Bodner C, Pichler MM, et al. Frequency, onset and clinical impact of somatic DNMT3A mutations in therapy-related and secondary acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2012;97(2):246-250.
613. Cremers EM, Alhan C, Westers TM, Ossenkoppele GJ, van de Loosdrecht AA. Immunophenotyping for diagnosis and prognosis in MDS: ready for general application? *Best Pract Res Clin Haematol*. 2015;28(1):14-21.
614. Sanz MA, Sempere A. Immunophenotyping of AML and MDS and detection of residual disease. *Baillieres Clin Haematol*. 1996;9(1):35-55.

615. Swerts K, Van Roy N, Benoit Y, Laureys G, Philippe J. DRAQ5: improved flow cytometric DNA content analysis and minimal residual disease detection in childhood malignancies. *Clin Chim Acta*. 2007;379(1-2):154-157.
616. San Miguel JF, Garcia-Sanz R, Gonzalez M, et al. A new staging system for multiple myeloma based on the number of S-phase plasma cells. *Blood*. 1995;85(2):448-455.
617. Primo D, Flores J, Quijano S, et al. Impact of BCR/ABL gene expression on the proliferative rate of different subpopulations of haematopoietic cells in chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2006;135(1):43-51.
618. Pui CH, Crist WM, Look AT. Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1990;76(8):1449-1463.
619. Orfao A, Ciudad J, Gonzalez M, et al. Prognostic value of S-phase white blood cell count in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 1992;6(1):47-51.
620. Quijano S, Lopez A, Rasillo A, et al. Association between the proliferative rate of neoplastic B cells, their maturation stage, and underlying cytogenetic abnormalities in B-cell chronic lymphoproliferative disorders: analysis of a series of 432 patients. *Blood*. 2008;111(10):5130-5141.
621. Testa U, Riccioni R, Militi S, et al. Elevated expression of IL-3Ralpha in acute myelogenous leukemia is associated with enhanced blast proliferation, increased cellularity, and poor prognosis. *Blood*. 2002;100(8):2980-2988.
622. Zheng H, Zhao X, Geng L. [Relationship between the bone marrow cell proliferation and the prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 1999;20(1):7-9.
623. Mattern J, Sauerbrey A, Volm M. p53 protein detected by two different antibodies: relationship to proliferation and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Anticancer Res*. 1995;15(3):1043-1047.
624. Lowenberg B, van Putten WL, Touw IP, Delwel R, Santini V. Autonomous proliferation of leukemic cells in vitro as a determinant of prognosis in adult acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1993;328(9):614-619.
625. Pardanani A, Finke C, Lasho TL, et al. IPSS-independent prognostic value of plasma CXCL10, IL-7 and IL-6 levels in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2012;26(4):693-699.
626. Patnaik MM, Caramazza D, Gangat N, Hanson CA, Pardanani A, Tefferi A. Age and platelet count are IPSS-independent prognostic factors in young patients with primary myelofibrosis and complement IPSS in predicting very long or very short survival. *Eur J Haematol*. 2010;84(2):105-108.
627. Lee JH, Lee JH, Lim SN, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for myelodysplastic syndrome: prognostic significance of pre-transplant IPSS score and comorbidity. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45(3):450-457.
628. Nevill TJ, Shepherd JD, Sutherland HJ, et al. IPSS poor-risk karyotype as a predictor of outcome for patients with myelodysplastic syndrome following myeloablative stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15(2):205-213.
629. Park MJ, Kim HJ, Kim SH, et al. Is International Prognostic Scoring System (IPSS) still standard in predicting prognosis in patients with myelodysplastic syndrome? External validation of the WHO Classification-Based Prognostic Scoring System (WPSS) and comparison with IPSS. *Eur J Haematol*. 2008;81(5):364-373.
630. Kao JM, McMillan A, Greenberg PL. International MDS risk analysis workshop (IMRAW)/IPSS reanalyzed: impact of cytopenias on clinical outcomes in myelodysplastic syndromes. *Am J Hematol*. 2008;83(10):765-770.
631. Germing U, Hildebrandt B, Pfeilstocker M, et al. Refinement of the international prognostic scoring system (IPSS) by including LDH as an additional prognostic variable to improve risk assessment in patients with primary myelodysplastic syndromes (MDS). *Leukemia*. 2005;19(12):2223-2231.
632. Yu MH, Liu SH, Shao YQ, Hao YS, Xiao ZJ. [Karyotypic and IPSS grouping of primary myelodysplastic syndromes patients: a comparison between FAB- and WHO-classification]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 2004;25(8):482-485.
633. Hasle H, Baumann I, Bergstrasser E, et al. The International Prognostic Scoring System (IPSS) for childhood myelodysplastic syndrome (MDS) and juvenile myelomonocytic leukemia (JMML). *Leukemia*. 2004;18(12):2008-2014.
634. Cazzola M. Risk assessment in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2011;96(3):349-352.

635. Nazha A, Seastone DP, Keng M, et al. The Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R) is not predictive of survival in patients with secondary myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma*. 2015;1-3.
636. Sekeres MA, Swern AS, Fenaux P, et al. Validation of the IPSS-R in lenalidomide-treated, lower-risk myelodysplastic syndrome patients with del(5q). *Blood Cancer J*. 2014;4:e242.
637. Neukirchen J, Lauseker M, Blum S, et al. Validation of the revised international prognostic scoring system (IPSS-R) in patients with myelodysplastic syndrome: a multicenter study. *Leuk Res*. 2014;38(1):57-64.
638. Lei Y, Xu X, Yang J, et al. [A comparable analysis of IPSS and IPSS-R for evaluating prognosis of myelodysplastic syndrome]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 2014;35(12):1090-1094.
639. Zeidan AM, Smith BD, Komrokji RS, Gore SD. Prognostication in myelodysplastic syndromes: beyond the International Prognostic Scoring System (IPSS). *Am J Med*. 2013;126(4):e25.
640. 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(21):2671-2677.
641. Jabbour E, Takahashi K, Wang X, et al. Acquisition of cytogenetic abnormalities in patients with IPSS defined lower-risk myelodysplastic syndrome is associated with poor prognosis and transformation to acute myelogenous leukemia. *Am J Hematol*. 2013;88(10):831-837.
642. Breccia M, Salaroli A, Loglisci G, Alimena G. Revised IPSS (IPSS-R) stratification and outcome of MDS patients treated with azacitidine. *Ann Hematol*. 2013;92(3):411-412.
643. Alessandrino EP, Della Porta MG, Bacigalupo A, et al. WHO classification and WPSS predict posttransplantation outcome in patients with myelodysplastic syndrome: a study from the Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo (GITMO). *Blood*. 2008;112(3):895-902.
644. Zeidan AM, Lee JW, Prebet T, et al. Platelet count doubling after the first cycle of azacitidine therapy predicts eventual response and survival in patients with myelodysplastic syndromes and oligoblastic acute myeloid leukaemia but does not add to prognostic utility of the revised IPSS. *Br J Haematol*. 2014;167(1):62-68.
645. Agool A, Schot BW, Jager PL, Vellenga E. 18F-FLT PET in hematologic disorders: a novel technique to analyze the bone marrow compartment. *J Nucl Med*. 2006;47(10):1592-1598.
646. Economopoulou C, Pappa V, Papageorgiou S, et al. Cell cycle and apoptosis regulatory gene expression in the bone marrow of patients with de novo myelodysplastic syndromes (MDS). *Ann Hematol*. 2010;89(4):349-358.
647. Hofmann WK, Takeuchi S, Takeuchi N, Thiel E, Hoelzer D, Koefler HP. Comparative analysis of hypermethylation of cell cycle control and DNA-mismatch repair genes in low-density and CD34+ bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndrome. *Leuk Res*. 2006;30(11):1347-1353.
648. Valencia A, Cervera J, Such E, et al. Aberrant methylation of tumor suppressor genes in patients with refractory anemia with ring sideroblasts. *Leuk Res*. 2011;35(4):479-483.
649. Teofili L, Rutella S, Chiusolo P, et al. Expression of p15INK4B in normal hematopoiesis. *Exp Hematol*. 1998;26(12):1133-1139.
650. Pellagatti A, Cazzola M, Giagounidis A, et al. Deregulated gene expression pathways in myelodysplastic syndrome hematopoietic stem cells. *Leukemia*. 2010;24(4):756-764.
651. Vasikova A, Belickova M, Budinska E, Cermak J. A distinct expression of various gene subsets in CD34+ cells from patients with early and advanced myelodysplastic syndrome. *Leuk Res*. 2010;34(12):1566-1572.
652. Mossner M, Hopfer O, Nowak D, et al. Detection of differential mitotic cell age in bone marrow CD34(+) cells from patients with myelodysplastic syndrome and acute leukemia by analysis of an epigenetic molecular clock DNA signature. *Exp Hematol*. 2010;38(8):661-665.
653. Hofmann WK, de Vos S, Komor M, Hoelzer D, Wachsman W, Koefler HP. Characterization of gene expression of CD34+ cells from normal and myelodysplastic bone marrow. *Blood*. 2002;100(10):3553-3560.
654. Gueller S, Komor M, Nowak D, et al. Identification of defects in the transcriptional program during lineage-specific in vitro differentiation of CD34(+) cells selected from patients with both low- and high-risk myelodysplastic syndrome. *Exp Hematol*. 2010;38(9):718-732, 732 e711-716.

655. Yang L, Qian Y, Eksioglu E, Epling-Burnette PK, Wei S. The inflammatory microenvironment in MDS. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72(10):1959-1966.
656. Marcondes AM, Ramakrishnan A, Deeg HJ. Myeloid Malignancies and the Marrow Microenvironment: Some Recent Studies in Patients with MDS. *Curr Cancer Ther Rev.* 2009;5(4):310-314.
657. Ramakrishnan A, Awaya N, Bryant E, Torok-Storb B. The stromal component of the marrow microenvironment is not derived from the malignant clone in MDS. *Blood.* 2006;108(2):772-773.
658. Gahn B, Haase D, Unterhalt M, et al. De novo AML with dysplastic hematopoiesis: cytogenetic and prognostic significance. *Leukemia.* 1996;10(6):946-951.
659. Lowenberg B. Diagnosis and prognosis in acute myeloid leukemia--the art of distinction. *N Engl J Med.* 2008;358(18):1960-1962.
660. Baldus CD, Mrozek K, Marcucci G, Bloomfield CD. Clinical outcome of de novo acute myeloid leukaemia patients with normal cytogenetics is affected by molecular genetic alterations: a concise review. *Br J Haematol.* 2007;137(5):387-400.
661. Mrozek K, Bloomfield CD. Chromosome aberrations, gene mutations and expression changes, and prognosis in adult acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2006:169-177.
662. Mrozek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman SP, Bloomfield CD. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood.* 2007;109(2):431-448.
663. Larson RA. Is secondary leukemia an independent poor prognostic factor in acute myeloid leukemia? *Best Pract Res Clin Haematol.* 2007;20(1):29-37.
664. Arber DA, Slovak ML, Popplewell L, Bedell V, Ikle D, Rowley JD. Therapy-related acute myeloid leukemia/myelodysplasia with balanced 21q22 translocations. *Am J Clin Pathol.* 2002;117(2):306-313.
665. Estey E, Dohner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet.* 2006;368(9550):1894-1907.
666. Leone G, Mele L, Pulsoni A, Equitani F, Pagano L. The incidence of secondary leukemias. *Haematologica.* 1999;84(10):937-945.
667. Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 1999;341(14):1051-1062.
668. Mauritzson N, Albin M, Rylander L, et al. Pooled analysis of clinical and cytogenetic features in treatment-related and de novo adult acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes based on a consecutive series of 761 patients analyzed 1976-1993 and on 5098 unselected cases reported in the literature 1974-2001. *Leukemia.* 2002;16(12):2366-2378.
669. Milosevic JD, Puda A, Malcovati L, et al. Clinical significance of genetic aberrations in secondary acute myeloid leukemia. *Am J Hematol.* 2012;87(11):1010-1016.
670. Tefferi A, Thiele J, Vardiman JW. The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms: order out of chaos. *Cancer.* 2009;115(17):3842-3847.
671. Arber DB, RD.; Orazi, A.; Bain, BJ.; Porwit, A.; Vardiman, JW.; Le Beau, MM.; Greenberg, PL. Acute myeloid leukaemia with myelodysplasia-related changes. In: Swerdlow SC, E.; Harris, NL.; Jaffe, ES.; Pileri, SA.; Stein, H.; Thiele, J.; Vardiman, JW, ed. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon:: IARC;; 2008:124-126.
672. Arber DA, Stein AS, Carter NH, Ikle D, Forman SJ, Slovak ML. Prognostic impact of acute myeloid leukemia classification. Importance of detection of recurring cytogenetic abnormalities and multilineage dysplasia on survival. *Am J Clin Pathol.* 2003;119(5):672-680.
673. Leith CP, Kopecky KJ, Godwin J, et al. Acute myeloid leukemia in the elderly: assessment of multidrug resistance (MDR1) and cytogenetics distinguishes biologic subgroups with remarkably distinct responses to standard chemotherapy. A Southwest Oncology Group study. *Blood.* 1997;89(9):3323-3329.
674. Miyazaki Y, Kuriyama K, Miyawaki S, et al. Cytogenetic heterogeneity of acute myeloid leukaemia (AML) with trilineage dysplasia: Japan Adult Leukaemia Study Group-AML 92 study. *Br J Haematol.* 2003;120(1):56-62.
675. Yanada M, Suzuki M, Kawashima K, et al. Long-term outcomes for unselected patients with acute myeloid leukemia categorized according to the World Health Organization classification: a single-center experience. *Eur J Haematol.* 2005;74(5):418-423.
676. Miesner M, Haferlach C, Bacher U, et al. Multilineage dysplasia (MLD) in acute myeloid leukemia (AML) correlates with MDS-related cytogenetic abnormalities and a prior history of MDS or MDS/MPN but has no independent prognostic relevance: a comparison of 408 cases classified as "AML not otherwise

- specified" (AML-NOS) or "AML with myelodysplasia-related changes" (AML-MRC). *Blood*. 2010;116(15):2742-2751.
677. Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood*. 2002;100(13):4325-4336.
678. Chen Z, Morgan R, Berger CS, Pearce-Birge L, Stone JF, Sandberg AA. Identification of masked and variant Ph (complex type) translocations in CML and classic Ph in AML and ALL by fluorescence in situ hybridization with the use of bcr/abl cosmid probes. *Cancer Genet Cytogenet*. 1993;70(2):103-107.
679. Claxton DF, Marlton P, Siciliano MJ. Molecular genetics of inversion 16 leukemia: implications for leukemogenesis. *Cancer Treat Res*. 1996;84:1-18.
680. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*. 2010;116(3):354-365.
681. Grimwade D, Walker H, Oliver F, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood*. 1998;92(7):2322-2333.
682. Hamaguchi H, Suzukawa K, Nagata K, Yamamoto K, Yagasaki F, Morishita K. Establishment of a novel human myeloid leukaemia cell line (HNT-34) with t(3;3)(q21;q26), t(9;22)(q34;q11) and the expression of EVI1 gene, P210 and P190 BCR/ABL chimaeric transcripts from a patient with AML after MDS with 3q21q26 syndrome. *Br J Haematol*. 1997;98(2):399-407.
683. Marlton P, Keating M, Kantarjian H, et al. Cytogenetic and clinical correlates in AML patients with abnormalities of chromosome 16. *Leukemia*. 1995;9(6):965-971.
684. Speck NA, Gilliland DG. Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(7):502-513.
685. Tefferi A, Vardiman JW. The diagnostic interface between histology and molecular tests in myeloproliferative disorders. *Curr Opin Hematol*. 2007;14(2):115-122.
686. Yang Y, Huang Q, Lu Y, Li X, Huang S. Reactivating PP2A by FTY720 as a novel therapy for AML with C-KIT tyrosine kinase domain mutation. *J Cell Biochem*. 2012;113(4):1314-1322.
687. Appelbaum FR, Kopecky KJ, Tallman MS, et al. The clinical spectrum of adult acute myeloid leukaemia associated with core binding factor translocations. *Br J Haematol*. 2006;135(2):165-173.
688. Westers TM, Ireland R, Kern W, et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: a report from an international consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leukemia*. Vol. 26; 2012:1730-1741.
689. Arock M, Sotlar K, Akin C, et al. KIT mutation analysis in mast cell neoplasms: recommendations of the European Competence Network on Mastocytosis. *Leukemia*. 2015.
690. Jawhar M, Schwaab J, Schnittger S, et al. Molecular profiling of myeloid progenitor cells in multi-mutated advanced systemic mastocytosis identifies KIT D816V as a distinct and late event. *Leukemia*. 2015;29(5):1115-1122.
691. Kelly L, Clark J, Gilliland DG. Comprehensive genotypic analysis of leukemia: clinical and therapeutic implications. *Curr Opin Oncol*. 2002;14(1):10-18.
692. Kelly LM, Gilliland DG. Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2002;3:179-198.
693. Preisler HD. Evolution of secondary hematologic disorders: preMDS-->MDS-->sAML. *Cancer Treat Res*. 2001;108:185-230.
694. van de Loosdrecht AA, Alhan C, Bene MC, et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from the first European LeukemiaNet working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2009;94(8):1124-1134.
695. van de Loosdrecht AA, Westers TM. Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: ready for translation into clinical practice. *Leuk Res*. 2011;35(7):850-852.
696. van de Loosdrecht AA, Ireland R, Kern W, et al. Rationale for the clinical application of flow cytometry in patients with myelodysplastic syndromes: position paper of an International Consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leuk Lymphoma*. 2012.

697. Teodosio C, Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, et al. Mast cells from different molecular and prognostic subtypes of systemic mastocytosis display distinct immunophenotypes. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(3):719-726, 726 e711-726 e714.
698. Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sanchez-Munoz L, et al. Detection of the KIT D816V mutation in peripheral blood of systemic mastocytosis: diagnostic implications. *Mod Pathol*. 2015;28(8):1138-1149.
699. Yanagihori H, Oyama N, Nakamura K, Kaneko F. c-kit Mutations in patients with childhood-onset mastocytosis and genotype-phenotype correlation. *J Mol Diagn*. 2005;7(2):252-257.