

Diagnósticos Diferenciales de Síndromes de Falla de la Médula Ósea (sFMO).

Bone Marrow Failure Syndromes (Differential Diagnosis)

Leonardo Feldman

*Jefe del Servicio de Trasplante de Médula Ósea Fundación Favaloro (Bs. As.)
Profesor Escuela Superior de Ciencias de la Salud UNICEN*

lfeldman@speedy.com.ar // leonardofeldman2009@gmail.com



Fallos Medulares

HEMATOLOGÍA, Vol 19: 67 - 80
Número Extraordinario
XXII CONGRESO
Octubre 2015

Palabras clave: Síndromes de Falla Medular,
Anemia Aplásica,
Síndrome Mielodisplástico.

Keywords: Bone Marrow Failure,
Aplastic Anemia,
Myelodysplastic Syndrome.

Resumen

Los Síndromes de falla de la Medula Osea SFMO se caracterizan por una inadecuada producción de las células de la sangre. La insuficiencia de la MO puede ser adquirida o constitucional y puede afectar a una o a las tres líneas celulares resultando en pancitopenia. En la mayoría de los casos la MO muestra una deficiencia de los precursores relacionados a las células afectadas, pero los SFMO pueden ocurrir en MO relativamente celulares como consecuencia de una hematopoyesis inefectiva y puede estar asociada con anomalías citogenéticas. Para una adecuada hematopoyesis es necesaria una regulación genética y epigenética coordinada y un rol regulador del microambiente de la MO (MAMO). Mínimas alteraciones pueden producir fenotipos diferentes que se encuadran en los SFMO que incluyen: Síndromes

Mielodisplásticos celulares (SMD), hipocelular (SMDh) Anemia Aplásica (AA), SFMO heredados (SFMOh), Linfocitosis a Linfocitos Grandes Granulares (LGL), Aplasia Eritroide Pura (AEP), Hemoglobinuria Paroxística Nocturna (HPN) y Neoplasias Mieloproliferativas (NMP). Existiendo algún grado de superposición entre estos síndromes. Además, algunos pacientes presentan citopenias persistentes sin una explicación aparente, cuadro al que se ha dado en llamar Citopenia Idiopática de Significado no Determinado (ICUS). A pesar de la complejidad de las anomalías de la proliferación, la diferenciación, y la maduración, la sumatoria de los resultados de los estudios hematológicos convencionales, las alteraciones genéticas y la citometría de flujo, entre otros, pueden caracterizar a fenotipos que en la mayoría

de los casos son clasificables. Durante los últimos años la comprensión de los mecanismos moleculares que pueden producir los SFMO ha avanzado notablemente, incrementando las posibilidades de distinguir las diferentes patologías que se superponen desde el punto de vista clínico-hematológico, guiar la terapéutica y evaluar el pronóstico. Esta breve revisión resumirá el estado actual de los recursos diagnósticos para identificar los diferentes desórdenes relacionados a los SFMO.

A pesar de que algunos de los estudios moleculares que se describen no son utilizados en la práctica clínica y son principalmente usados para la investigación de la fisiopatología de estas enfermedades, es esperable que se incorporen en un futuro cercano.

Abstract

The bone marrow failure syndromes (BMFs) are characterized by inadequate blood cell production leading to low blood cell counts in the peripheral blood. Bone Marrow (BM) failure can be acquired or constitutional and may affect only a single lineage or all three blood cell lines resulting in pancytopenia. In most, the BM shows a simple deficiency of the related precursor cells but marrow failure can also occur with relatively cellular marrows, presumably as a result of ineffective hematopoiesis and can be associated with cytogenetic abnormalities. For normal hematopoiesis coordinated regulation of genetic and epigenetic mechanisms is needed. Although recently the role of the marrow microenvironment (MME) was established. If minor alteration occur

different phenotypes can be produced which can be categorized as BMFs, these include: the myelodysplastic syndromes (MDS; including hypocellular MDS (hMDS), aplastic anemia (AA), inherited BMF syndromes (IBMFs), large granular lymphocytosis (LGL), pure red cell aplasia (PRCA), paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH), and myeloproliferative neoplasms (MPNs). Each of these shows some degree of overlap; two disorders can coexist in the same patient. . Conversely, some patients have persistent blood cytopenias for which no explanation is apparent, so-called idiopathic cytopenias of undetermined significance (ICUS) with normal marrow morphology and lack a known MDS-associated somatic mutation or karyotypic abnormality. Despite the complexity of abnormal proliferation, differentiation, and maturation, the sum of the results of hematological studies, genetic alterations, flow cytometry, among others, can result in distinctive phenotypes, which in most cases are classifiable. In recent years the understanding of the molecular mechanisms that can produce BMFs has advanced considerably increasing the availability to distinguish among the different subtypes of the BMFs. The identification of genetic alterations that underlie marrow failure has expanded markedly especially for Myelodysplastic syndromes.(MDS). Molecular markers have begun to be used to guide therapy and assess prognosis of these and distinguish them from other BMFs, This brief review will summarize the current state of diagnostic resources to identify some of the different disorders related to BMFs.

La producción de los componentes celulares de la sangre es controlada por mecanismos biológicos complejos que incluyen, factores de crecimiento, interacción de citoquinas, el microambiente hematopoyético (NICH0), el sistema inmune, señales intra e intercelulares. Además factores metabólicos, genéticos y epigenéticos contribuyen a su regulación. El número de células es controlado por varios reguladores negativos y mecanismos de eliminación, entre otros, el envejecimiento natural de las células, citoquinas inhibitorias del crecimiento, eliminación inmune de las células envejecidas o dañadas (células

terminales) y mecanismos celulares intrínsecos de eliminación como la apoptosis. En estados patológicos estos sistemas regulatorios son menos activos o suprimidos y pueden causar o contribuir a las citopenias. Algunas de estas pueden ser producidas por causas fácilmente reconocidas con procedimientos diagnósticos relativamente sencillos, mientras que otras son un verdadero desafío para el hematólogo clínico. Tradicionalmente las citopenias se clasifican como: **A-**Relacionadas a deficiencias nutricionales u hormonales. **B-** por mediación inmune. **C-** Falla real de la médula Osea (MO). **D-** Citopenias idiopá-

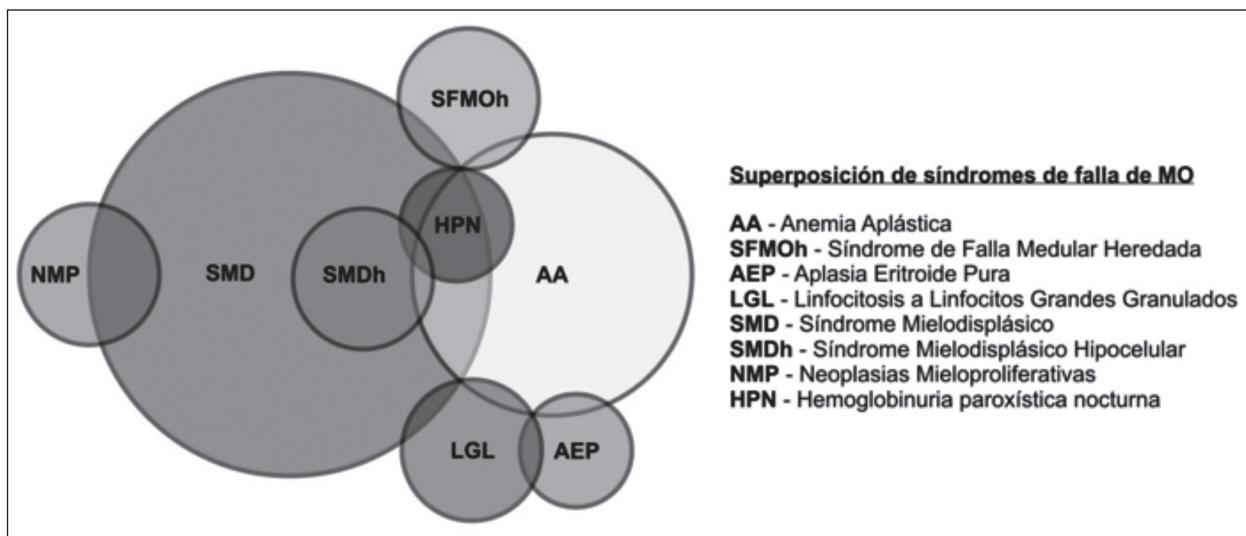
ticas (Idiopática Citopenia de Indeterminado Significado) (ICUS) (siglas en ingles), estas pueden presentar solo anemia ICUS-A, Neutropenia ICUS_N, o trombocitopenia ICUS-T. Las citopenias crónicas moderadas pueden estar asociadas a comorbilidades lo que hace más complejo el diagnóstico. En algunos casos, durante el seguimiento, lo que parecía ser una causa inflamatoria, oculta solapadamente un cuadro de Síndrome Mielodisplástico (SMD) (pre Fase). Recientemente se describe que las MO con displasia no llevan necesariamente a citopenias especialmente en adultos mayores, esta situación se ha denominado “Displasia Idiopática de significado no conocido o no determinado (IDUS) (Siglas del Ingles) algunos presentan citopenias mínimas y otros terminan en SMD. Además existe un grupo de pacientes con mutaciones clonales habitualmente relacionadas a SMD que clínica y hematológicamente no lo presentan o solo muestran citopenias mínimas y se los propone definir como “Clonal Hematopoyesis de Indeterminado Potencial”(CHIP) (Siglas en Ingles)⁽¹⁻²⁾.

Los Síndromes de Falla (Insuficiencia) de la función de la médula ósea (sFMO) o (BMFs) por las siglas en ingles son un grupo heterogéneo de distintos

desórdenes clínicos y patológicos asociados a estados citopénicos y falla de la hematopoyesis normal. Cada una de las enfermedades que se encuadran en este síndrome se superponen desde el punto de vista clínico en muchos aspectos, sin embargo, se producen por mecanismos fisiopatológicos diferentes pero pueden ser indistinguibles en una etapa temprana de su evolución. Los sFMO pueden ser adquiridos o heredados y tienen un riesgo significativo de morbilidad y mortalidad debido a su historia natural progresiva, evolución clonal, y terapia sub óptima que a su vez, puede producir complicaciones⁽¹⁻³⁾.

La terapia apropiada y el pronóstico dependen de un diagnóstico temprano y adecuado. Las enfermedades que más frecuentemente se categorizan como sFMO incluyen los **Síndromes Mielodisplásticos (SMD)** en especial el tipo hipocelular) (**SMDh**), la **-Anemia Aplásica (AA)**, los **SFMO heredados (SFMOh)**, **Linfocitosis con Linfocitos Grandes Granulados (LGL)**, **Aplasia Eritroide Pura (AEP)**, **Hemoglobinuria Paroxística Nocturna (HPN)** y **Neoplasias Mieloproliferativas (NMP)**- en la **Figura 1**. se muestra un esquema sugerido de las patologías referidas y grado de superposición.

Figura 1: superposición de los Síndromes de Falla Medular



Lo heterogéneo de estas patologías se manifiesta por el espectro de como ellas pueden ser categorizadas: **A-** por Medula Osea (MO) celular o hipocelular, **B-** por MO neoplásica, o biología no clonal, **C-** por etiología adquirida o heredada, **D-** por manifestarse en forma aguda o crónica y finalmente **E-** por un defecto primario versus un efecto tóxico sobre

la célula madre, dos desórdenes pueden coexistir en el mismo paciente y esto por supuesto complica el diagnóstico, por ejemplo, el síndrome de superposición SMD/NMP.

Particularmente las Anemias Refractarias o citopenias en una de las líneas o en las tres líneas en el contexto de una MO normo o hipercelular pueden

presentar un dilema diagnóstico muy difícil de resolver, el diagnóstico puede continuar siendo poco claro inclusive luego de evaluaciones repetidas de la MO. Frecuentemente varios de estos desordenes presentan una predisposición a enfermedades malignas especialmente a la Leucemia Mieloide Aguda LMA. Consecuentemente, la evaluación de los sFMO a menudo está dirigida a distinguir condiciones tratables, como SMD o HPN, de otras causas de insuficiencia de la médula con el fin de prescribir la terapia correcta. Este enfoque se debe a la percepción de que el SMD es equivalente a un tumor maligno y a la posible disponibilidad de medicamentos para el tratamiento paliativo de esta patología o la necesidad de la planificación futura para un tratamiento potencialmente curativo como el Trasplante de Células hematopoyéticas TCH. Llegar a un diagnóstico lo más acertado posible también es esencial para asegurar que los pacientes sin SMD eviten la toxicidad de las terapias para esta patología y que aquellos pacientes con bajo riesgo (potencialmente autolimitados) no deberían ser expuestos innecesariamente a un TCH apresurado. Por otra parte, si un paciente puede tener un curso más agresivo, la planificación temprana de un TCH y el estudio de la tipificación del antígeno leucocitario humano (HLA) pueden iniciarse sin demora. Ante la falta de convicción en el diagnóstico a muchos de estos pacientes se les atribuye un posible o probable SMD, aunque tal diagnóstico puede ser impreciso en ausencia de un aumento de blastos o anomalías del cariotipo que podrían definir la enfermedad.

En los últimos años se han desarrollado avances significativos en la identificación de anomalías moleculares en enfermedades relacionadas a la falla de la Médula Ósea. Esto es particularmente cierto en el SMD, para lo cual anomalías moleculares se han demostrado en aproximadamente 90% de los casos, por otro lado, debe recordarse que anomalías del cariotipo por estudios citogenéticos convencionales se encuentran en 40-70% de los SMD de novo y 80% de los casos secundarios. Distinguir los SMD de otros síndromes de FMO es un dilema clínico común, la aplicación adecuada y la interpretación de los enfoques de diagnóstico de última generación pueden garantizar un diagnóstico correcto y precoz de las condiciones de sFMO y las terapias posteriores más adecuadas.

Aunque los enfoques establecidos para la evalua-

ción de citopenias son a menudo diseñados para ser sensibles al diagnóstico de SMD⁽⁴⁾, esto puede ser un desafío para asegurar que los sFMO “benignos” también se seleccionen (triaged) y sean evaluados adecuadamente. Enfermedades tales como Linfocitosis o Leucemia a Linfocitos Grandes Granulares (LGL) o Aplasia Medular (AA), aunque no se consideran abiertamente malignas, pueden conferir una significativa morbilidad e incluso mortalidad si no se identifican apropiadamente y son tratadas como SMD.

Los criterios de diagnóstico de los sFMO deberían distinguir estos trastornos de otras citopenias reactivas y displasia, así como de otros trastornos clonales de las células madre. Después de que causas no malignas de citopenias (por ejemplo, deficiencias de vitaminas) están excluidos, el enfoque de diagnóstico para la sospecha de sFMO comienza con los estudios morfológicos de la sangre periférica y la médula ósea. Es importante tener en cuenta que cuando el diagnóstico presenta dudas en algunos casos se requiere el examen repetido de la Médula Ósea a las pocas semanas, meses o inclusive años para establecer el diagnóstico correcto e identificar pacientes con progresión rápida de la enfermedad. Este examen inclusive debe ser repetido en cualquier momento en que el cuadro clínico presente cambios y si es posible repetir los test apropiados que pueden ser observados en distintas etapas de la evolución y servirán eventualmente para certificar un diagnóstico y en algunos casos cambiarlo. La **Tabla 1** delinea pruebas apropiadas en esta población de pacientes.

Las evaluaciones de diagnóstico de la enfermedad-específica Síndromes mielodisplásicos. (SMD)

Los SMD son un conjunto biológicamente y clínicamente heterogéneo de trastornos clonales de las células madre hematopoyéticas caracterizados por hematopoyesis ineficaz en las que pueden participar un linaje de células o más generalmente acompañado de citopenias en sangre periférica y tendencia variable a la transformación en Leucemia Mieloblástica.

Incidencia: en 4/100.000 personas anualmente, predomina en los adultos mayores y la edad media es 69 años.

Patofisiología:

1- Desorden clonal progresivo de la célula madre

Tabla 1: aproximación diagnóstica para falla de MO

Aproximación Diagnóstica para falla de MO	
Procedimiento de diagnóstico	Utilidad
Sangre periférica Recuento celular completo Recuento reticulocitos Transaminasas y bilirrubina Serología hepatitis Ensayos con aerosilin fluorescente para HPN Test de roturas cromosómicas Longitud de telómero Test de mutación somática	Diagnóstico Pronóstico Pronóstico Pronóstico Pronóstico Diagnóstico Diagnóstico Pronóstico
MO Aspiración y biopsia Citometría de flujo (CD34) Hibridización y fluorescencia in situ (FISH) Citogenético Ensayo de formulación de colonia	Diagnóstico Pronóstico / Diagnóstico Pronóstico / Diagnóstico Pronóstico / Diagnóstico Pronóstico
Historia de Paciente Duración de la Citopenia Medicaciones Transfusiones	Distingue enfermedad adquirida Descartar causas reversibles Sugiere fenotipo severo
Historia Familiar Anormalidades constitucionales	Para usar en pacientes jóvenes sospecha de SFMOh
Examen Físico Contextura física Anormalidades miembro superior, uñas y piel	Para usar en pacientes jóvenes sospecha de SFMOh

hematopoyética posiblemente debido a una combinación de predisposición genética y efectos del medio ambiente.

- II- la mutación temprana causa freno de la diferenciación y displasia con mutaciones tardías y expansión clonal.
- III-anormalidades citogenéticas recurrentes, sin embargo, la patogénesis para la progresión no está reconocida.
- IV-El gen MLL en 11q23 se encuentra sobre-regulado (con activación HOXA9) en un porcenta-

je significativo incluyendo aquellos pacientes con cariotipo normal.

- V- se describen anormalidades en el microambiente de la MO: Producción aberrante de Citoquinas con aumento de la actividad de las pro-apoptóticas TNF α , IL6, TGF- β y sobre expresión Fas Ligando en CD34+ y apoptosis por Caspasas, así como, alteraciones de los mecanismos oxidantes y de la adhesión celular.
- VI- Las células madre de MO tienen un bajo umbral de resistencia a la apoptosis por citoquinas TNF α ,

IFN α , y anticuerpos anti Fas y baja respuesta a factores de crecimiento hematopoyético,

- VII- La acumulación de lesiones genéticas (mutaciones: ras, FLT3, FMS, P53) se asocian con la progresión de la enfermedad.
- VIII- Inclusive sin citopenias los síntomas se pueden relacionar a alteración de la función de los granulocitos y plaquetas.
- IX. Disrupción del microambiente de la MO y cambios en el nicho de la célula madre hematopoyética, con alteración de las células mesenquimales, expansión de linfocitos T citotóxicos y reducción de los NK, además, incremento de VEGF.⁽⁵⁾

Para el diagnóstico; en la sangre periférica se observa en general macrocitosis, neutrófilos hipogranulados, la presencia de células pseudo-Pelger-Huet raramente se encuentra en AA pero a menudo se pueden observar en SMD, un número significativo de LGL puede hacer sospechar un síndrome de superposición T-LGL/SMD. Es obligatoria una biopsia con aspirado de médula ósea para evaluar la celularidad, la fibrosis, la displasia y la topografía, es característica la anormal localización de los precursores inmaduros (ALIPs) cercanos a las trabéculas óseas. La citometría de flujo y los estudios de citogenética también son fundamentales⁽⁴⁾. Un hallazgo de exceso de blastos ($\geq 5\%$), por ejemplo, da soporte al diagnóstico de los SMD o leucemia aguda en evolución. Si se observa la presencia de fibrosis extensa, puede ser más indicativo de una superposición de SMD con una NMP. Además, el grado de displasia es útil para distinguir la AA de SMDh. Por el contrario, la maduración eritroide megaloblastoide o atipia megacariocítica es de menor potencial diagnóstico en cualquiera de los diferentes trastornos de sFMO. Los estudios citogenéticos pueden identificar anomalías cromosómicas no aleatorias. Algunas de ellas, como por ejemplo, del(5q), monosomía 7, o inversión del 3 se consideran virtualmente diagnósticas de los SMD o LMA⁽⁶⁻⁷⁻⁸⁾. Deleción de Y, 20q, trisomía 8, translocaciones recurrentes e inversiones que impliquen el cromosoma 3q, entre otros, también tienen importancia pronóstica⁽⁴⁾. Incluso una vez que un diagnóstico MDS se ha establecido, se han reportado discrepancias morfológicas en los subtipos de SMD que puede ser tan alta como del 12% entre diferentes centros⁽⁹⁾.

El diagnóstico de SMD puede ser difícil en los pacientes con un cariotipo normal o citogenética no informativa especialmente en pacientes que no tienen marcadores morfológicos robustos como sideroblastos en anillo o un exceso de mieloblastos. Debido a que estos pacientes con posible SMD por lo general se presentan con citopenias moderadas, es poco probable la progresión rápida de la enfermedad y si se confirma un diagnóstico de SMD, no sería necesario la intervención terapéutica en las etapas iniciales, un diagnóstico precoz no implica la terapia urgente ni influye en la evolución, estos pacientes se pueden seguir con las pruebas de sangre periférica de rutina y los exámenes de médula ósea repetirlos, sólo en el caso de empeoramiento de los recuentos sanguíneos o no antes de los 6 meses del estudio inicial⁽⁴⁾.

La cuantificación de CD34 puede ayudar en el diagnóstico de los SMD, especialmente en los casos hipocelulares. Se puede realizar de dos maneras; con citometría de flujo multicolor de aspirados de médula ósea, usando una estrategia de (selección de poblaciones) gating secuencial con CD45, CD34, y CD71 (para identificar e incluir las células rojas nucleadas)⁽¹⁰⁾. Alternativamente, estudios de CD34 por inmunohistoquímica se puede realizar en la biopsia de médula ósea usando anticuerpos monoclonales disponibles comercialmente. Elevados recuentos en CD34 en la médula ósea son consistentes con SMD⁽¹⁰⁻¹¹⁾. Por último, nuevas herramientas diagnósticas pueden hacer el diagnóstico de SMD más preciso. Estos incluyen la detección de defectos moleculares recurrentes mediante el uso de estudio del genoma completo (Genoma-Wide) y Genotipificación por secuenciación paralela masiva⁽¹²⁻¹³⁾. Aún que no usadas en la práctica estas técnicas pueden proporcionar evidencia de anomalías clonales, dar información sobre el pronóstico, así como documentar una mutación que pueda ser seguida en el curso de la enfermedad y evaluar la terapia.

Anemia Aplásica (AA)

AA se define como pancitopenia con una médula ósea hipocelular en ausencia de un infiltrado anormal o fibrosis de la MO. Al igual que con los SMD, una biopsia de la médula ósea de buena calidad para evaluar la celularidad de la médula y la morfología es obligatoria. Las dudas sobre el diagnóstico de AA se justifica si una MO se observa como aplásica, pero la muestra es subcortical o de calidad subóptima.

ma. También hay que señalar que la celularidad en AA es muchas veces desigual y en parches, y en algunos casos esta distribución heterogénea puede estar presente y dificultar el diagnóstico. Desde el punto de vista de un aspirado, se requieren al menos la citometría de flujo y estudios citogenéticos. Los criterios de Camitta modificados⁽¹⁴⁾ se utilizan ampliamente para la determinación de la gravedad, definidos como moderada, severa o muy severa. Brevemente, los grados de severidad están basados en la celularidad de la médula ósea partiendo con menos de 30% y pancitopenia severa con al menos dos de los siguientes parámetros o criterios en los recuentos en la sangre periférica: recuento absoluto de neutrófilos $<0,5 \times 10^9 / L$, plaquetas $<20 \times 10^9 / L$, y recuento de reticulocitos corregido $<1\%$. Estudiar clones HPN también se consideran estándar en el momento del diagnóstico inicial. Estas pruebas deben ser realizadas por citometría de flujo multicolor⁽¹⁵⁾. Las pruebas para detectar la presencia de clones con HPN son de rutina en AA, tanto para excluir un diagnóstico de HPN o identificar una potencial evolución a esta patología, utilizando los criterios del International PNH Interest Group [16]. La definición de un clon positivo varía en la literatura. El umbral para un clon HPN-positivo debe ser 0,01% de las células deficientes en proteínas ancladas al glicosilfosfatidilinositol (GPI-AP; un sustituto fiable para la presencia de un clon HPN), idealmente, utilizando un sistema multiparamétrico con aerolisina fluorescente^(15,17). Las poblaciones de células deficientes en GPI-AP- (por lo general 0,1% -15%) también se pueden encontrar en la mayoría de los pacientes con AA adquirida [18] y en tantos como el 40% de los pacientes con SMD en el momento del diagnóstico⁽¹⁹⁾. Estos no son necesariamente clonales y pueden no cumplir con el umbral de positividad como se describe. Aunque las guías directrices del National Comprehensive Cancer Network sugieren que la presencia de un clon HPN se debe evaluar en pacientes con SMD⁽²⁰⁾, no es necesario evaluarlo en todos los pacientes con SMD si el diagnóstico es claro. Los pacientes con un clon HPN pequeño que no presenta hemólisis ni tienen trombosis no deberían ser tratados para HPN. Los clones HPN deberían ser seguidos en el tiempo en AA porque su expansión puede ser una manifestación de la evolución clonal en AA después de la terapia con inmunosupresión (IST).

Leucemia a Linfocitos

Grandes Granulares (LGL) Siglas en inglés

LGL es un trastorno linfóide clonal que representa un espectro de distintas enfermedades linfoproliferativas caracterizadas por linfocitosis periférica concomitante con otras citopenias. LGL representa una expansión clonal tanto de los linfocitos T citotóxicos maduros CD3-positivos o -CD3 negativo Natural Killer. LGL es una enfermedad primariamente de adultos ambos tipos de linfocitos tienen función citotóxica. La leucemia a LGL se diagnostica en un espectro clínico de citopenias, linfocitosis, esplenomegalia y condiciones autoinmunes como la Artritis Reumatoidea (AR). Los pacientes con síndrome de Felty y LGL con AR portan una frecuencia similar del alelo HLA-DR4 entre el 80-90%. Aunque LGL puede asociarse con otras entidades como AA o MDS, es una entidad clínica distinta con una marcha diagnóstica específica⁽²¹⁾. Esta comprende la evaluación diagnóstica por citometría de flujo de la sangre periférica (no la médula ósea) con el fenotipo CD3+, dim CD5+, CD8+, CD16+ y CD57+, CD28- en más de 500/microlitro de LGL. Un criterio mayor para el diagnóstico de T-LGL es la detección clonal del reordenamiento del gen del TCR con un fenotipo típico alfa-Beta en las células T. Además, hasta el 40% de los pacientes con LGL tendrá una mutación somática STAT3. La presencia de la mutación sugiere que la señalización STAT3 aberrante subyace en la patogénesis de la enfermedad⁽²²⁾. El hallazgo más frecuente es la neutropenia, la que ocurre en el 70-80% de los pacientes y la que resultaría por alteración de la producción en la MO a través de mecanismos mediados por células y destrucción de neutrófilos por la vía humoral. Se puede observar una mínima a moderada esplenomegalia pero el grado de esta no se correlaciona con la severidad de la neutropenia. Algunas líneas de evidencia sugieren que la expansión clonal de los LGL sería inducida por Antígenos relacionados a retrovirus como el Human T-Lymphotropic Virus type 1-II (HTLV-I-II) y Bovine leukemia virus (BLV)

Hemoglobinuria paroxística nocturna HPN

La HPN es una enfermedad clonal de células madre hematopoyéticas con características que incluyen la anemia hemolítica, insuficiencia de la médula, y trombosis causada por un déficit en fosfatidilinositolglucosiltransferasa (Codificado por el Gen

PIG-A). Estos pacientes tienen una mutación adquirida del gen PIGA en X (p22.1). HPN clásica, según lo definido por la International PNH Interest Group⁽¹⁶⁾, requiere un diagnóstico por citometría de Flujo en sangre periférica⁽¹⁵⁾. Los test para la ausencia de proteínas tipo III en la superficie celular muestran que no solo los glóbulos rojos pierden CD59 y CD55 si no igualmente los linfocitos, monocitos y neutrófilos pierden CD56 y CD57 ambas unidas a través del anclaje a GPI. Otros estudios de laboratorio de utilidad diagnóstica incluyen LDH elevada y aumento en el recuento de reticulocitos. Dada la presencia de hemólisis, una prueba de Coombs negativa también es útil. La evaluación de la médula ósea también debe realizarse y puede mostrar una forma hiperclonal dependiendo del estado evolutivo en la HPN clásica.

Aplasia eritrocitaria pura (AEP)

AEP es un síndrome caracterizado por anemia severa normocítica, reticulocitopenia, y la ausencia de eritroblastos de una médula ósea por lo demás normal. Este diagnóstico es difícil de hacer sin una biopsia de médula ósea y con frecuencia es de exclusión. Las causas pueden ser varias, desde un proceso autoinmune (en algunos casos asociado a timoma <10%), infección viral, agentes tóxicos-drogas, en SMD (5q síndrome), LGL y congénitas por defecto primario de la célula madre (DBA). Las formas adquiridas pueden ser agudas o crónicas las primeras se asocian con parvovirus B19 cuyo blanco es el antígeno de membrana P en los precursores eritroides suprimiendo temporalmente la producción de los Glóbulos Rojos (GR) especialmente en individuos con alto turnover de GR, otro grupo de alto riesgo son los inmunosuprimidos (VIH, Trasplantes, Síndromes linfoproliferativos, Lupus, entre otros) en estos puede ser persistente y de alto riesgo.

Otras pruebas que pueden ser utilizadas para distinguir SMD de otras condiciones sFMO

Polimorfismo de nucleótido simple

(SNP, del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*).

Es una variación en un solo sitio en el ADN, es el tipo más frecuente de variación en el genoma se ha convertido en una herramienta importante en la identificación de anomalías cromosómicas no detectadas por citogenética convencional de estudios de metafase (MC) en los trastornos de sFMO como SMD y NMP, puede enriquecer la evaluación diagnóstica de MDS, especialmente en casos de un cariotipo normal o médula ósea (seca) sin obtener una muestra adecuada en la que se pueda realizar un estudio del Cariotipo, o en casos de cariotipos no informativos. La presencia y el número de nuevas lesiones detectadas por SNP-A- son predictores independientes de la supervivencia global y libre de eventos en comparación con otros esquemas de estratificación⁽¹³⁾.

Pruebas genéticas moleculares

Como con SNP-As, se pueden realizar estudios genómicos en sangre periférica y pueden ser útiles para distinguir los pacientes con sospecha de SMD de otros trastornos de sFMO. Más del 90% de las células de médula ósea tienen mutaciones somáticas clonales al momento del diagnóstico de SMD⁽²³⁾. Se han identificado más de 30 mutaciones somáticas recurrentes asociadas con SMD e implican diversos mecanismos biológicos. En algunos casos la hematopoyesis clonal se puede diagnosticar a través del ensayo Human Androgen Receptor Assay- HUMARA, sin embargo este es solo aplicable a mujeres y es positivo en varios estados clonales⁽¹⁾. Las mutaciones somáticas en SMD se pueden clasificar por subtipo (Tabla 2)^(24, 25).

Tabla 2: Resumen de Mutaciones Somáticas en SMD⁽⁴⁹⁾

Genes	Casos %	Efecto Sobrevida	Comentarios
Moléculas de Señalización			
BRAF	<1	↓	Asociadas con 10% - 15 % a los síndromes mieloproliferativos.
MPL	<1	↔	
PTEN	<1	↔	
CKDN2A	<1	↔	
GNAS	<1	↔	
PTPN11	<1	↔	Pueden afectar el uso de inhibidores de tyrosine kinase.
c-KIT	1	↔	
KRAS	2	↔	
CBL	1	↓	Asociados con LMMC también presente en 10% SMD de alto riesgo.
JAK2	3	↔	Frecuentemente en anemia refractaria con sideroblastos en anillos - trombocitosis.
FLT3	3	↔	Factor de pobre pronóstico en 30% LMA.
NRAS	10	↑	Significado pronóstico independiente para SMD de bajo riesgo.

Reguladores Epigenéticos			
ATRX1	<1	**	
UTX	1	**	
EZH2	6-10	↓	También observado en MF.
DNT3A	10	↓	Significado pronóstico independiente en SMD y también en MF.
IDH1/2	12	↓	
ASXL1	10 - 15	↓	Significado pronóstico independiente en SMD prevalente en 30% de casos con MF.
TET2	19 - 24	↓	Frecuentemente en LMMC y 10-15% MPN.
Factores de Transcripción			
WT1	<1	**	
PHF6	<1	**	
CUX1	1-2	**	
BCOR	1-2	**	
ETV6	3	↓	Significado pronóstico independiente.
RUNX1	10 - 15	↓	Significado pronóstico independiente.
Empalme RNA			
SF1	1	**	
SF3A1	1	**	
ZRSR2	6	**	
U2AF1	8	↓	
SRSF2	15	↓	
SF3B1	15 - 24	↑	Observado en 75% de pacientes con citopenias refractarias, sideroblastos con anillos y displasia multilineaje.
Otros			
STAG2	2 - 3	**	
NPM1	3	**	
Tp53	10 - 14	↓	Significado pronóstico independiente.

Estos incluyen los factores de transcripción⁽²⁶⁾, reguladores epigenéticos⁽²⁷⁾, moléculas de señalización⁽²⁵⁻²⁸⁾, y los factores de empalme de precursor de ARNm Pre ARNm⁽²⁹⁻³⁰⁾. Más del 70% de los pacientes con SMD presentan mutaciones somáticas o anomalías citogenéticas clonales, y más de 50% de los pacientes son portadores de al menos una mutación somática⁽²⁴⁾. Las mutaciones somáticas en SF3B1, TP53, TET2 y ASXL1 son los cambios identificados más comúnmente. El panel de mutaciones se está empezando a utilizar para predecir el fenotipo clínico y la supervivencia independientemente de otras variables tales como el International Prognostic Scoring System (IPSS)⁽³¹⁾. Este último panel está empezando a ser utilizado en estudios clínicos.

La aplicación de estas técnicas para Distinguir SMD de otros sFMO

En la **figura 2** se muestra un algoritmo propuesto para la utilización de estas pruebas en pacientes con citopenia.

Distinguir citopenias: heredadas vs adquiridas

En los pacientes que presentan citopenias a una edad temprana (<30 años) debe valorarse la posibilidad de citopenias heredadas en contraposición de las adquiridas. Las AA y entidades heredadas (sFMOH) pueden ser difíciles de distinguir porque ambas se presentan con pancitopenia y la médula ósea hipocelular. La historia de un hemograma previamente normal es únicamente útil para identi-

ficar trastornos adquiridos, mientras que las anomalías físicas o antecedentes familiares pueden sugerir que sean necesarias más investigaciones sobre las anomalías constitucionales. Debido a que también puede haber una superposición en el fenotipo, la genotipificación puede ser fundamental en establecer un diagnóstico. Los sFMOh pueden ser causados por mutaciones germinales que dan lugar a una defectuosa o nula reparación del ADN dañado (por ejemplo, la anemia de Fanconi), telómeros anormalmente cortos (por ejemplo, disqueratosis congénita [DKC]), ribosomopatías (por ejemplo, el síndrome de Shwachman-Bodian-Diamond), anomalías en el gen de la trombopoyetina (trombocitopenia amegacariocítica), u otras causas menos frecuentes⁽³²⁾.

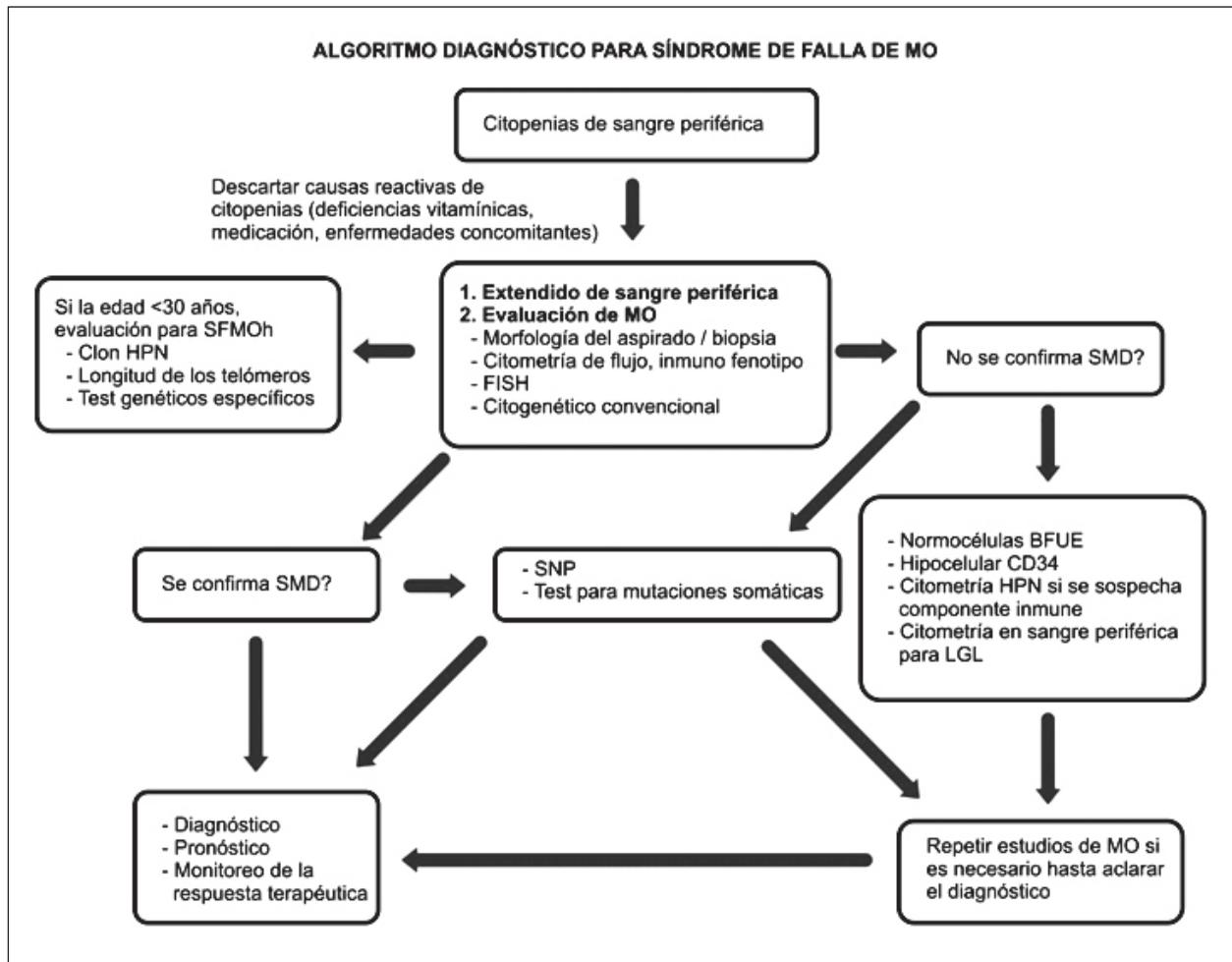
Ante la presencia de un clon NPH se debería pensar que este es un marcador de enfermedad adquirida, no hereditaria, y se puede utilizar tempranamente en el algoritmo diagnóstico para evitar la determinación del genotipo⁽³³⁾.

La longitud de los telómeros es un complemento importante para el diagnóstico de sFMOH, específicamente DKC. Telómeros cortos, sin embargo, se pueden encontrar en otras enfermedades⁽³⁴⁾. La definición de «corto» no se ha establecido, y el método utilizado para determinar la longitud no se ha estandarizado. Debajo de la primer percentil se considera como acortamiento crítico de los telómeros⁽³⁴⁾. Los métodos para determinar la longitud del telómero han incluido la reacción en cadena de la polimerasa PCR y citometría de flujo de la fluorescencia de

hibridación in situ (FISH). Se ha observado que pacientes con AA adquirida pueden presentar acortamiento de los telómeros⁽³⁴⁻³⁵⁻³⁶⁾, pero su papel en el diagnóstico de AA adquirida, no está claro. La longitud del telómero no es un predictor de la respuesta a la IST. Los telómeros también se han investigado

en SMD⁽³⁷⁾. La longitud de los telómeros es menor en pacientes con SMD ($p < 0,001$). La DKC es la única patología de SFMO- que debería ser diagnosticada si la longitud de los telómeros se encuentra por debajo del primer percentil.

Figura 2: Algoritmo Diagnóstico para SFMO⁽⁴⁹⁾.



Distinguir Trastornos hipocelulares: AA y Síndrome Mielodisplástico hipocelular (hSMD).

Aunque la mayoría de los pacientes con MDS tienen una celularidad normal o aumentada de la médula ósea al momento del diagnóstico, entre el 5% -20% se presentará con médulas hipocelulares (hSMD)⁽³⁷⁻³⁸⁾. Los pacientes con hSMD pueden ser inicialmente difíciles de distinguir de los de AA verdadera, dada la baja celularidad en la médula ósea. Aunque la displasia eritroide es una característica de SMD, puede también estar presente en AA⁽³⁷⁾. Las anomalías citogenéticas clonales son generalmente consideradas

de valor diagnóstico para SMD, pero estos defectos se encuentran típicamente en sólo la mitad de todos los casos de SMD, y los análisis citogenéticos pueden ser menos fiables cuando la médula ósea es hipocelular. Por otra parte, los estudios morfológicos pueden presentar dificultades para la realización debido a la posibilidad de inadecuado material de diagnóstico a partir de muestras hipoplásicas. A pesar de la dificultad de distinguir un hSMD de AA, un diagnóstico preciso tiene implicaciones clínicas importantes porque los pacientes con hSMD tienen mayor riesgo de progresión neoplásica, y el tratamiento de los dos trastornos pueden

diferir. Las células progenitoras hematopoyéticas CD34 + son fundamentales para la patogénesis de ambos SMD y AA y puede ser una buena herramienta para diferenciar los dos trastornos⁽³⁷⁾. Las células CD34 + comprenden normalmente 1% -2% (rango: 0,5% -5%) de la celularidad de la médula ósea, pero se encuentran disminuidas significativamente en la AA, ya que son el blanco de la destrucción autoinmune⁽³⁹⁾. Por el contrario, las células CD34 + parecen ser las células de las que se origina los SMD-⁽³⁸⁾ y pueden estar aumentadas como resultado de la expansión clonal neoplásica. La diferencia cuantitativa en las células CD34 + de la médula ósea entre hSMD y AA sugieren que este parámetro puede ser utilizado para distinguir entre estos dos trastornos. Los pacientes con números de CD34+ bajos parecen ser sensibles a la Terapia inmunosupresora (IST)⁽⁴⁰⁾. Polimorfismo de nucleótido simple (SNP-As) también se puede usar para distinguir AA y hSMD. El estudio combinado del Cariotipo con MC y SNP-A mejoró la detección de lesiones cromosómicas de: 19% de los casos de AA y el 54% en los casos de hMDS⁽⁴¹⁾.

Distinguir Trastornos celulares:

SMD de LGL y AEP y Citopenias por Inflamación

Los pacientes con citopenias y celularidad normal o hipercelulares en MO, pero sin aumento de blastos o anomalías citogenéticas presentan el diagnóstico diferencial más amplio y complejo en el espectro de los cuadros de insuficiencia de la MO. Estos incluyen AEP, LGL, supresión de la médula asociada con la inflamación sistémica, citopenias autoinmunes o sFMO clonales como SMD y HPN. Aunque la HPN clásica se descarta fácilmente con una prueba negativa para el clon HPN, las dificultades se pueden presentar para la diferenciación entre los SMD, AEP, LGL, y enfermedades inflamatorias o autoinmunes.

Aunque todavía realizados predominantemente en el entorno de la investigación, los ensayos de formación de colonias se pueden realizar en el aspirado de MO o la sangre periférica⁽⁴²⁾. Las colonias se enumeran por microscopía después de 12 a 14 días de incubación. Basada en la apariencia morfológica y tamaño y de acuerdo con criterios publicados, las colonias se clasifican como «unidad formadora de colonias de granulocitos, eritrocitos, monocitos, megacariocitos»; «Burst forming unit erythroid»

(BFU-E). Estos pueden ser usados para el diagnóstico⁽⁴²⁾ de enfermedades tales como AEP así como para predecir la respuesta a la terapia inmunosupresora (IST) en esta enfermedad. Es una herramienta útil para excluir el diagnóstico de SMD porque el crecimiento por encima del valor normal de 30 BFU-E por 10^5 células mononucleares de MO es muy específico para descartar SMD^(42, 1). También pueden tener importancia pronóstica en SMD, bajo crecimiento corresponde a un peor pronóstico. El crecimiento por encima del valor normal de BFU-E con un promedio de 40 BFU-E por 10^5 células mononucleares excluye MDS y se asocia con la respuesta a IST⁽⁴²⁾. Displasia, mutaciones somáticas y anormalidades del cariotipo convencional por cariotipo de metafase o SNP-A son útiles si están presentes para distinguir SMD de los otros síndromes. Existen limitaciones a este último enfoque porque hay pacientes con Mutaciones somáticas clonales en genes frecuentemente mutados en enfermedades hematológicas malignas que no tienen SMD ni citopenias. Recientemente se propone definirlos como **clonal hematopoyesis de indeterminado potencial CHIP**. Estos pacientes pueden tener anomalías genéticas sin enfermedad aparente y la progresión a la malignidad se desconoce teniendo semejanza a las gamopatías de origen no determinado. Por otro lado hay pacientes con citopenias persistentes sin una explicación aparente y se las define como “**citopenias idiopáticas de origen no determinado**” ICUS (siglas en ingles) sin alteraciones morfológicas en MO ni anormalidades del cariotipo ni mutaciones somáticas, alguno de estos se asocian a comorbilidades inflamatorias crónicas, como insuficiencia renal con deficiencia de EPO en adultos mayores pero deben ser evaluados periódicamente pues algunos son diagnosticados subsecuentemente como SMD o LMA^(1, 2).

Distinguir las enfermedades sensibles a la terapia inmunosupresora

Es importante distinguir las enfermedades con posible respuesta al tratamiento inmunosupresor (IST) de los SMD clásicos ya que las primeras serán menos sensible al tratamiento estándar de SMD por ejemplo, con agentes hipometilantes y otras terapias. Sin embargo, los hSMD son una excepción importante, ya que se cree que posiblemente sean más sensibles a las IST, y usar IST tempranamente en pacientes sin tratamiento previo sería razonable⁽⁴³⁾.

Algunos marcadores de la respuesta inmune en SMD (así como AA) incluyen células HPN, positividad del Antígeno leucocitario Humano (HLA)-DR15 (DR2)⁽⁴⁴⁾, y la expresión en las células madre de la MO del receptor del factor de necrosis tumoral⁽⁴⁵⁾. Específicamente, las células HPN se asocian con fisiopatología inmune⁽⁴⁶⁾. Hasta el 70% de los pacientes con AA adquirida tienen un pequeño clon HPN al momento del diagnóstico⁽⁴⁷⁾. La deficiencia de proteínas ancladas a GPI-AP (células HPN) en la superficie de las células madre mutadas las hace relativamente resistente al ataque inmune⁽⁴⁷⁾. Esto se cree que es la base para la alta incidencia de clones HPN en AA.⁽⁴⁸⁾ Las citopenias asociada a LGL son más propensas a responder a la IST.

Distinguir mutaciones somáticas en SMD

Diferentes genes recurrentemente mutados se han identificado en SMD. El número total de mutaciones presentes en un paciente con SMD tiene valor pronóstico importante independiente de los factores pronósticos corrientemente utilizados en la práctica clínica^(31, 25). En particular, los genes más frecuentemente mutados, incluyen mutaciones en ASXL1, SRSF2, RUNX1 y TP53, y se asocian con peores resultados y la disminución de la supervivencia libre de leucemia⁽²⁴⁾. Solamente el paciente con SMD y una anomalía clonal y una mutación en ETV6 o TP53 es al que se debe considerar para una terapia muy agresiva para enfermedad de alto riesgo.

Conclusión

La distinción de SMD de otros síndromes cuando una sola línea celular está comprometida o se presenta una MO hipocelular puede ser un reto, para el hematólogo clínico. Las nuevas evaluaciones de la médula ósea y los análisis genómicos pueden ayudar a hacer distinciones clínicas y actualmente se utilizan con mayor frecuencia⁽⁴⁹⁾. Los estudios con determinaciones clásicas son todavía muy útiles para distinguir estos trastornos de SFMO que se superponen clínicamente. Aunque algunas de las metodologías de estudios más recientes (SNP y pruebas genéticas moleculares) aún no se han incorporado formalmente en los sistemas de estratificación del score de riesgo actualmente aceptados, estas pruebas probablemente lo serán en un futuro próximo.

Declaración de conflictos de interés:

El autor declara no poseer conflictos de interés.

Bibliografía

1. Valent P. Low blood counts: Immune mediated idiopathic or myelodysplasia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012; 485–491.
2. Steensma D.P. Bejar R., Jaiswal S. et al Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood* 2015, 126: 9-16.
3. Alter BP. Diagnosis, genetics, and management of inherited bone marrow failure syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007; 29–39.
4. Malcovati L, Hellstrom-Lindberg E, Bowen Detal. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: Recommendations from the European Leukemia Net. *Blood* 2013; 122:2943–2964.
5. Balderman S. and Calvi L. Biology of BM Failure Syndromes: Role of Microenvironment and Niches. *Hematology* 2014, 71-76.
6. Haase D, Germing U, Schanz J etal. 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 110:4385–4395.
7. Sole F, Luño E, Sanzo C et al. Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2005; 90:1168–1178.
8. Schanz J, Steidl C, Fonatsch C et al. Coalesced multicentric analysis of 2,351 patients with myelodysplastic syndromes indicates an under estimation of poor-risk cytogenetics of myelodysplastic syndromes in the International Prognostic Scoring System. *J Clin Oncol* 2011; 29:1963–1970.
9. Naqvi K, Jabbour E, Bueso-Ramos C et al. Implications of discrepancy in morphologic diagnosis of myelodysplastic syndrome between referral and tertiary care centers. *Blood* 2011; 118:4690–4693.

10. Stetler-Stevenson M, Arthur DC, Jabbour N et al. Diagnostic utility of flow cytometric immuno-phenotyping in myelodysplastic syndrome. *Blood* 2001; 98:979–987.
11. 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 Leukemia Net Working Group. *Leuk Lymphoma* 2013; 54:472–475.
12. Maciejewski JP, Mufti GJ. Whole genome scanning as a cytogenetic tool in hematologic malignancies. *Blood* 2008; 112:965–974.
13. Tiu RV, Gondek LP, OKeefe CL et al. Prognostic impact of SNP array karyotyping in myelodysplastic syndromes and related myeloid malignancies. *Blood* 2011 117: 4552-4560.
14. Camitta BM, Thomas ED, Nathan DG et al. Severe aplastic anemia: A prospective study of the effect of early marrow transplantation on acute mortality. *Blood* 1976; 48:63–70.
15. Borowitz MJ, Craig FE, Digiuseppe JA et al. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2010;78:211–230.
16. Parker C, Omine M, Richards S et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2005; 106:3699–3709.
17. Brodsky RA, Mukhina GL, Li S et al. Improved detection and characterization of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using fluorescent aerolysin Am J Clin Pathol 2000;114:459–466.
18. Sugimori C, Chuhjo T, Feng X et al. Minor population of CD55-CD59- blood cells predicts response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with aplastic anemia. *Blood* 2006; 107:1308–1314.
19. Sloand EM, Wu CO, Greenberg P et al. Factors affecting response and survival in patients with myelodysplasia treated with immune suppressive therapy. *J Clin Oncol* 2008; 26:2505–2511.
20. Greenberg PL, Attar E, Bennett JM et al. Myelodysplastic syndromes: Clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 2013; 11:838–874.
21. Lamy T, Loughran TP Jr. How I treat LGL leukemia. *Blood* 2011; 117:2764–2774.
22. Koskela HL, Eldfors S, Ellonen P et al. Somatic STAT3 mutations in large granular lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2012; 366:1905–1913.
23. Walter MJ, Shen D, Ding L et al. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2012;366:1090–1098.
24. Bejar R, Stevenson KE, Caughey BA et al. Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 2012; 30:3376–3382.
25. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood* 2013; 122:3616–3627.
26. Akagi T, Ogawa S, Dugas M et al. Frequent genomic abnormalities in acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome with normal karyotype. *Haematologica* 2009; 94:213–223.
27. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med* 2009; 360:2289–2301.
28. Bacher U, Haferlach T, Kern W et al. A comparative study of molecular mutations in 381 patients with myelodysplastic syndrome and in 4130 patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2007; 92:744–752.
29. Malcovati L, Papaemmanuil E, Bowen DT et al. Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2011; 118:6239–6246.
30. Thol F, Kade S, Schlarmann C et al. Frequency and prognostic impact of mutations in SRSF2, U2AF1, and ZRSR2 in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood* 2012; 119:3578–3584.

31. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* 2011; 364:2496–2506.
32. Shimamura A, Alter BP. Pathophysiology and management of inherited bone marrow failure syndromes. *Blood Rev* 2010; 24:101–122.
33. DeZern A E, Symons HJ, Resar LS et al. Detection of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones to exclude inherited bone marrow failure syndromes. *Eur J Haematol* 2014; 92:467–470.
34. Du HY, Pumbo E, Ivanovich J et al. TERC and TERT gene mutations in patients with bone marrow failure and the significance of telomere length measurements. *Blood* 2009; 113:309–316.
35. Brummendorf TH, Maciejewski JP, Mak J et al. Telomere length in leukocyte subpopulations of patients with aplastic anemia. *Blood* 2001; 97:895–900.
36. Calado R T, Young N S. Telomere diseases. *N. Engl J Med* 2009;361:2353–2365.
37. Barrett J, Sauntharajah Y, Molldrem J. Myelodysplastic syndrome and aplastic anemia: Distinct entities or diseases linked by a common pathophysiology? *Semin Hematol* 2000; 37:15–29.
38. Bennett JM, Orazi A. Diagnostic criteria to distinguish hypocellular acute myeloid leukemia from hypocellular myelodysplastic syndromes and aplastic anemia: Recommendations for a standardized approach. *Haematologica* 2009; 94:264–268.
39. Young NS, Maciejewski J. The pathophysiology of acquired aplastic anemia. *N Engl J Med* 1997; 336:1365–1372.
40. Matsui WH, Brodsky RA, Smith BD et al. Quantitative analysis of bone marrow CD34 cells in aplastic anemia and hypoplastic myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2006; 20:458–462.
41. Afable MG II, Wlodarski M, Makishima H et al. SNP array-based karyotyping: Differences and similarities between aplastic anemia and hypocellular myelodysplastic syndromes. *Blood* 2011; 117:6876–6884.
42. DeZern AE, Pu J, McDevitt MA et al. Burst-forming unit-erythroid assays to distinguish cellular bone marrow failure disorders *Exp Hematol* 2013;41:808–816.-
43. Barrett AJ, Sloand E. Autoimmune mechanisms in the pathophysiology of myelodysplastic syndromes and their clinical relevance. *Haematologica* 2009;94:449–451.
44. Sauntharajah Y, Nakamura R, Nam JM et al. HLA-DR15 (DR2) is overrepresented in myelodysplastic syndrome and aplastic anemia and predicts a response to immunosuppression in myelodysplastic syndrome. *Blood* 2002; 100:1570–1574
45. Kasahara S, Hara T, Itoh H et al. Hypoplastic myelodysplastic syndromes can be distinguished from acquired aplastic anaemia by bone marrow stem cell expression of the tumor necrosis factor receptor. *Br J Haematol* 2002; 118:181–188.
46. Wang H, Chuhjo T, Yasue S et al. Clinical significance of a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells in bone marrow failure syndrome. *Blood* 2002; 100:3897–3902.
47. Young NS, Abkowitz JL, Luzzatto L. New insights into the pathophysiology of acquired cytopenias. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2000; 18–38
48. Sloand E, Kim S, Maciejewski JP et al. Intracellular interferon-gamma in circulating and marrow T cells detected by flow cytometry and the response to immunosuppressive therapy in patients with aplastic anemia. *Blood* 2002; 100:1185–1191.
49. DeZern A. E. and Sekeres M. A. - The Challenging World of Cytopenias: Distinguishing Myelodysplastic Syndromes From Other Disorders of Marrow Failure. *The Oncologist* 2014;19:735-745