

# Estudios Citogenéticos y Mecanismos Moleculares en los Síndromes Mielodisplásicos

Carolina B. Belli<sup>1</sup>, Silvia Benasayag<sup>2</sup>, María I. Gallino<sup>2</sup>,  
Walter A. Correa<sup>2</sup>, Irene B. Larripa<sup>1</sup>

Departamento de Genética, Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano R Castex", Academia Nacional de Medicina<sup>1</sup>, Fundagen<sup>2</sup>. Buenos Aires. Argentina.

Correspondencia: Dra. Carolina Belli.

Pacheco de Melo 3081. CP 1425 Capital Federal. Argentina

Tel.: 54-11-4805-8803. Fax: 54-11-4803-9475. e-mail: cbelli@hematologia.anm.edu.ar



ACTUALIZACIÓN

Fecha de recepción: 05-12-2010

Fecha de aprobación: 15-12-2010

HEMATOLOGIA, Vol. 14 N° 3: 91-102  
Septiembre-Diciembre, 2010

## RESUMEN

Las alteraciones genéticas debidas a mutaciones, hallazgos cromosómicos balanceados o no, disomía uniparental adquirida, haploinsuficiencia y los fenómenos epigenéticos estarían involucrados al inicio y en la progresión de los SMD. Entre los genes implicados se encuentran el NRAS, FLT3, TP53, RUNX1, p15<sup>INK4b</sup>, TET2, ASXL1 y RPS14.

Un 30-59% de pacientes con SMD *de novo* presentan cariotipos alterados y este porcentaje se incrementa según el riesgo de los subtipos FAB o WHO. Las aberraciones citogenéticas más frecuentes son: -5/del(5q) [2%-11%], -7/del(7q) [2%-5%], +8 [3%-12%], del(20q) [2%-4%], -Y [2%-4%] y cariotipos complejos ( $\geq 3$  alteraciones) [10-20%].

Un 60-90% de los SMD secundarios presentan cariotipos anormales, un aumento de translocaciones y de cariotipos complejos [50%]. Las alteraciones en los cromosomas 5/7 [80%] se asocian con exposición a agentes alquilantes y los rearrreglos 11q23 o 21q22 con exposición a inhibidores de topoisomerasa II.

El cariotipo ayuda en el diagnóstico, pronóstico, tratamiento y seguimiento de los pacientes. La categorización del riesgo citogenético del IPSS ha sido comprobada aplicando las clasificaciones FAB y WHO, y validada en el WPSS. Aunque el grupo Intermedio es heterogéneo, el Consenso Internacional en Citogenética de los SMD sugiere la continuidad de su utilización hasta que se realice un nuevo estudio multicéntrico.

**Palabras claves:** Citogenética; Síndromes Mielodisplásicos; Genes, Pronóstico

## INTRODUCCIÓN

Los Síndromes Mielodisplásicos (SMD) comprenden un grupo heterogéneo de alteraciones hematológicas clonales caracterizados por una hematopoyesis inefectiva que resulta clínicamente en la presencia de citopenias en sangre periférica (SP) con una médula ósea (MO) normo a hiperclular con alteraciones displásicas. Los SMD pueden aparecer *de novo* o secundariamente al uso de agentes antineoplásicos o por contacto con químicos. Aproximadamente un 30% de los pacientes evolucionan a Leucemia Mieloide Aguda (LMA) con una pobre respuesta a la quimioterapia. Otro 30% fallece por complicaciones vinculadas a sus citopenias y, el resto, por causas no relacionadas<sup>1-10</sup>.

En la patogénesis de los SMD, al igual que en otros trastornos neoplásicos, se supone la existencia de múltiples lesiones sucesivas que conducen a la aparición y progresión del clon anormal (Figura 1). Los mecanismos precisos que determinan su iniciación son desconocidos. Ellos incluirían mutaciones en el ADN y su reparación defectiva que resultarían en inestabilidad genómica de las células hematopoyéticas troncales. Un segundo paso, aun no definido, podría conferir ventajas de crecimiento al clon neoplásico, el cual se expandiría en una hematopoyesis clonal que se refleja en los hallazgos morfológicos y clínicos de los SMD<sup>12-13</sup>.

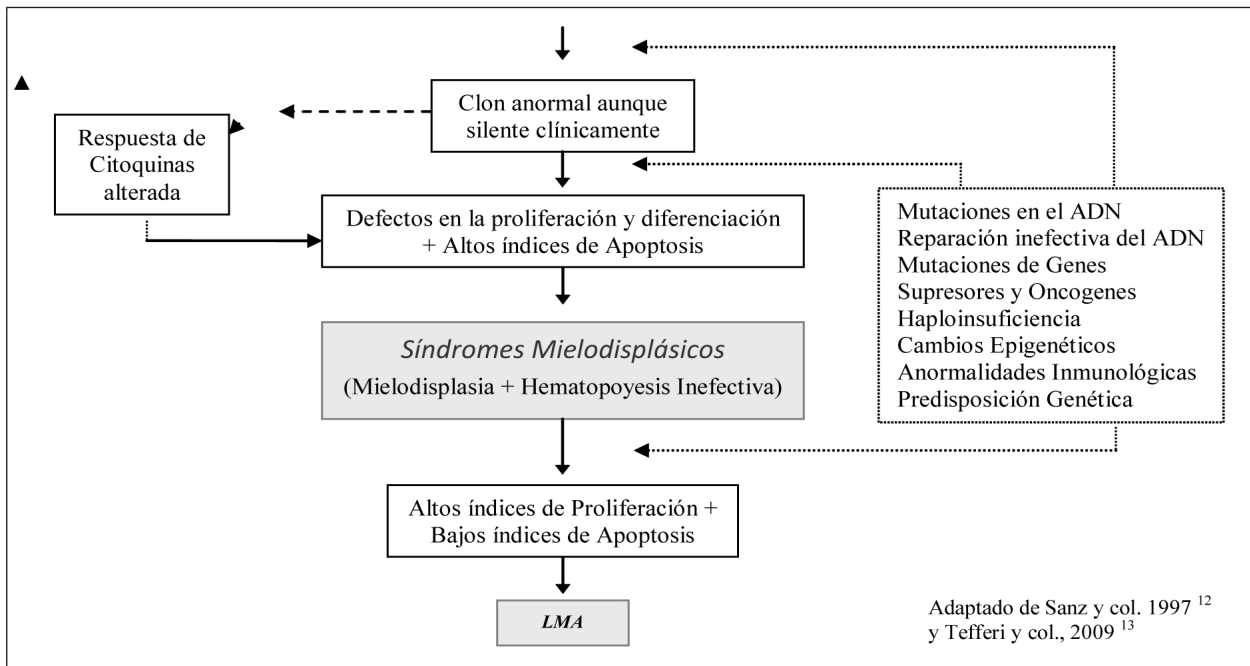


Fig.1.- Modelo hipotético de pasos que conducirían al desarrollo de los SMD

Los SMD se originan probablemente de una célula madre hematopoyética primitiva genéticamente transformada. La mutación inicial o las rutas moleculares son desconocidas. Sin embargo mutaciones secundarias, haploinsuficiencia, cambios epigenéticos, la respuesta del estroma medular y el sistema inmune también contribuyen al fenotipo de la enfermedad 12-13.

Las lesiones iniciales que promueven la aparición de los SMD y su posterior progresión leucémica pueden ser heredadas en pacientes con mutaciones en los genes AML1, NF1 o de reparación del ADN como en la Anemia de Fanconi<sup>14</sup>. Además, algunos polimorfismos en genes de reparación o del metabolismo de carcinógenos han sido asociados con su patogénesis. Sin embargo para la mayoría de los pacientes la causa es incierta y no puede generalizarse una predisposición genética<sup>15</sup>.

La proliferación celular inefectiva se ve acompañada de una extensiva muerte celular por apoptosis de los precursores mieloides, lo cual explicaría el contraste entre la hiperplasia medular y la presencia de citopenias en SP. Diversos hallazgos observados en las fases iniciales se relacionan con el proceso apoptótico, como el aumento de los niveles séricos de citoquinas pro-inflamatorias (TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ ) o el incremento de células que expresan caspasas 1 y 3<sup>16-17</sup>. Finalmente, daños genéticos posteriores podrían promover la progresión a estadios más avanzados, con incremento en la proliferación celular y disminución de los niveles de apoptosis (Figura 1)<sup>12-13</sup>.

Las alteraciones a nivel genético pueden influir en la función de algunos genes (pérdida o ganancia) debidas a mutaciones, alteraciones cromosómicas balanceadas o no, o fenómenos epigenéticos como

el silenciamiento de la expresión génica por hipermetilación aberrante que pueden afectar a genes relacionados con el ciclo celular o genes supresores de tumores (GST). Generalmente es necesaria la pérdida de función de ambos alelos de un GST para que su efecto leucemogénico se manifieste. Sin embargo, segmentos de disomía uniparental adquirida (lesión resultante en pérdida de heterocigocidad sin alterar el número de copias) podrían derivar en mutaciones en homocigocidad, como en el caso del JAK2<sup>18</sup>. Además, la haploinsuficiencia (cuando la proteína producida por una copia del gen normal es insuficiente) también tendría un papel patogénico<sup>19-20</sup>.

## HALLAZGOS CITOGENÉTICOS

La frecuencia de alteraciones cromosómicas clonales en los SMD *de novo* varía entre 30-59% aumentando hasta un 80% en los SMD secundarios (SMDs). Y, aunque los SMD no se encuentran asociados a ninguna alteración cromosómica en particular, existe una alta frecuencia de pérdidas cromosómicas totales o parciales, una menor de ganancias y una muy baja de translocaciones<sup>1-10</sup>. Las alteraciones son características de todo el grupo y no están asociadas a un subgrupo en particular. Sin embargo, la frecuencia de cariotipos anormales se incrementa a medida que

aumenta el riesgo según FAB u OMS, de un 30-50% en los subtipos AR y ARSA a un 60-70% en la AREBt o AREB-II<sup>7-10</sup>.

Las aberraciones citogenéticas más frecuentes son: -5/del(5q), -7/del(7q), +8, del(20q), y -Y. Las alteraciones de menor frecuencia incluyen inv(3), +9/del(9q), +11/del(11q), t(12p)/del(12p), -13/del(13q), i(17q)/t(17p)/del(17p), +21, idic(Xq) y diversas translocaciones balanceadas incluyendo t(11;16)(q23; p13.3), t(3;21)(q26.2;q22.1), t(1;3)(p36.3;q21.1), t(2;11)(p21;q23) y la t(6;9)(p23;q34)<sup>1-10, 20</sup>. Según la nueva clasificación de la OMS, la mayoría de las alteraciones antes mencionadas pueden ser consideradas como evidencia presuntiva de SMD en el contexto de una citopenia persistente de origen indeterminado con ausencia de hallazgos morfológicos definidos<sup>21</sup>.

### ALTERACIONES CITOGENÉTICAS RECURRENTES

Aproximadamente un 0-2% de los pacientes con SMD presentan **rearrreglos 3q** como la inv(3)(q21q26), la t(3;3)(q21;q26) y la t(3;5)(q25;q34). En la mayoría de los pacientes se observa dismegacariopoyesis (el 90% presenta micromegacariocitos) usualmente acompañada de displasia en el resto de los linajes, exceso de blastos y el 30-50% son SMDs. El recuento de plaquetas es normal o incrementado y poseen una pobre respuesta a la quimioterapia con una corta sobrevida (SV). El gen de la trombopoyetina (3q26) no se encuentra derregulado y el gen candidato es EVI1 (3q26.2) el cual está transcripcionalmente activado debido a la formación de diferentes genes de fusión o por disrupción del dominio de regulación<sup>22-23</sup>. La t(3;21)(q26;q22) se observa en pacientes con SMDs y, a diferencia del resto de los reordenamientos 3q, se asocia a SMD con exceso de blastos y trombocitopenia.

La **delección (5q)** se observa como única alteración con una frecuencia del 2-11% (respecto al total de pacientes), siendo de menor frecuencia en poblaciones asiáticas vs. las europeas<sup>1-10</sup>. La delección es intersticial y la banda 5q31 es el *locus* deleciónado en la mayoría de los casos. El punto de ruptura distal más frecuente es el 5q33 (70%) y los proximales son el 5q13 (50%) o el 5q15 (20%). La del(5)(q13q33) (40%) es la más frecuente y la asociada al Síndrome 5q<sup>-24</sup>.

Un tercio de los pacientes que portan una del(5q) presentan el Síndrome 5q-, asociado con bajo riesgo de progresión leucémica y larga sobrevida. El riesgo aumenta en pacientes con exceso de blastos en MO, en el sexo masculino, en los SMDs o cuando se ve acompañado de otras alteraciones citogenéticas<sup>25,26</sup>. Se observa que la media de SV disminuye de 80 meses a 47 y 7 meses cuando se le adicionan 1 o más alteraciones citogenéticas respectivamente<sup>10</sup>.

La región comúnmente deleciónada (RCD) en el 5q- mide 1,5-2,9 Mb y en ella se localizan 24 genes conocidos (otros 16 predecibles) entre los cuales se encuentra el gen SPARC. Esta proteína modula el crecimiento, forma y adhesión celular, induce apoptosis, puede inhibir la angiogénesis y su hemicigocidad podría conferir mayor adhesión al nicho. También se localiza el gen RPS14, requerido para la maduración de la subunidad ribosomal 40S<sup>27</sup>. El análisis de los perfiles de expresión de pacientes con Síndrome 5q- muestran defectos en la expresión de genes involucrados con la traducción ribosomal, sugiriendo que este síndrome representaría un desorden de biogénesis ribosomal aberrante<sup>28</sup>. Otros genes ubicados en esta región son: IL-17 $\beta$  y NDST1 (respuesta inmune e inflamatoria); CSF1R (FMS), CD74 (MIF-R) (receptores); CDX1 (factor de transcripción), MEGF1 y G3BP (genes supresores tumorales).

Los **reordenamientos 5q33** (PDGFR $\beta$ ) se presentan en un 1-2% de pacientes con Leucemia Mielomonocítica Crónica (LMMC). La t(5;12)(q33;p13) genera una proteína de fusión ETV6(TEL)-PDGFR $\beta$  con actividad tirosina quinasa (TK) constitutiva. El PDGFR $\beta$  también puede rearrreglarse con el HIP1 (7q11), H4 (10q33) o RAB5 (17p13)<sup>29</sup>. Estos pacientes presentan una forma atípica de LMMC con características mieloproliferativas, monocitosis moderada o ausente y eosinofilia. La OMS los reasigna, por sus características clínicas y la sensibilidad a Imatinib, a un nuevo subgrupo denominado "Neoplasias Mieloides/ Linfoides con eosinofilia"<sup>21</sup>.

Las **alteraciones -7/del(7q)** se observan como único hallazgo con una frecuencia del 2-5%<sup>1-10</sup>. Estos pacientes poseen una alta susceptibilidad a infecciones, pobre respuesta a la quimioterapia y corta SV.

Los resultados citogenéticos muestran dos regiones críticas localizadas en 7q22 y 7q32-q33<sup>30</sup>. La RCD en 7q22 varía de 650 kb hasta 2-3 Mb, está delimitada por los genes EPO y PAI-1 e incluye los genes que codifican para la asparraginasa sintetasa y el PIK3CG, entre otros<sup>30-32</sup>. El protooncogén MET (7q31), se perdería en forma hemicigota, sin embargo no se observan mutaciones del alelo restante<sup>33</sup>. Estudios recientes descartarían la presencia de un GST en esta región<sup>34</sup>. Se sugiere un modelo en el cual uno o varios genes podrían actuar solos o en cooperación con otros en la leucemogénesis y la resistencia al tratamiento.

En particular, las células CD34+ de los pacientes con -7 muestran incremento de mutaciones en el NRAS, AML1 e hipermetilación del gen p15<sup>INK4B</sup>; sobreexpresión de genes que inducen transformación leucémica y resistencia a la apoptosis, como BMI-1, HoxA9, BRCA2 y TC21, entre otros. Mientras que los genes que controlan el crecimiento y la diferenciación estarían menos expresados, como el RAD17, p21 y

miembros de la familia de las MAP quinasas<sup>35</sup>. EL G-CSF estimula preferentemente la proliferación de clones preexistentes con -7 los cuales poseen la isoforma IV del receptor. Esta isoforma produce una señal defectiva, vía JakStat anormal, para la diferenciación y la maduración celular<sup>36</sup>.

La **trisomía 8** se observa como única alteración con una frecuencia del 3-12%<sup>1-10</sup>. Estos pacientes poseen una expansión significativa de una o más subfamilias del Receptor T-Vβ en las células T-CD8. El 67% de los pacientes con SMD *de novo* y +8 aislada responden a terapias inmunomoduladoras con reversión de las citopenias, independencia transfusional, incremento de las células +8 y normalización del repertorio celular T, hallazgos compatibles con una patofisiología autoinmune de la +8 en los SMD<sup>37</sup>.

Las células CD34 de pacientes con +8 expresan marcadores tempranos de apoptosis pero la evitan mediante up-regulación de proteínas antiapoptóticas como la survivina, c-myc y CD1<sup>38</sup>.

La **pérdida del 17p** (5%) puede darse como resultado de pérdidas totales, parciales, isocromosomas del brazo largo [i(17q)] o por translocaciones desbalanceadas y se observa, mayoritariamente, en los SMDs con exceso de blastos. Algunos autores sugieren la descripción del síndrome 17p- como una entidad morfológica-citogenética-molecular caracterizada por un tipo particular de disgranulopoyesis, con hipobululación tipo pseudo-Pelger Hüet y pequeñas vacuolas citoplasmáticas, e inactivación del TP53<sup>39,40</sup>. En estos pacientes se observa, mediante FISH, pérdida de un alelo de TP53 y el 70% presenta el alelo restante mutado<sup>39</sup>. El **i(17q)** se presenta como única alteración en el 1% de los pacientes con predominio de sexo masculino, anemia severa, neutrófilos hiposegmentados, micromegacariocitos aumentados y pobre pronóstico<sup>40</sup>.

La **delección (20q)** se observa como única alteración con una frecuencia del 2-4%<sup>1-10</sup>. La delección es intersticial involucrando una región de 1,7 Mb correspondiente a la banda 20q11.2-q12. Estudios en líneas celulares muestran que la RCD contiene al gen H-L(3)MBTL perteneciente al grupo Policom. Estas proteínas mantienen a los genes en estado transcripcional represivo, probablemente mediante modificaciones de la cromatina<sup>41</sup>. El 20q- se asocia con un aumento en la apoptosis de los precursores granulocíticos, presencia de citopenias periféricas y hallazgos displásicos en las líneas eritroides y megacariocíticas<sup>42</sup>.

Los **cariotipos complejos** ( $\geq 3$  alteraciones) se presentan con una frecuencia de alrededor del 15% y 50% en los SMD *de novo* y en los SMDs, respectivamente. Estos cariotipos involucran a los cromosomas 5 y 7 con una frecuencia aproximada del 50%<sup>7</sup>.

## VALOR PRONÓSTICO DEL CARIOTIPO EN LOS SMD DE NOVO

Numerosos trabajos demuestran que el cariotipo al momento del diagnóstico posee un importante valor pronóstico tanto para SV como para evolución a LMA<sup>1-10</sup>. Además, la realización de estudios citogenéticos seriados permite evaluar la respuesta a un tratamiento o detectar la presencia de alteraciones adicionales asociadas con progresión y corta SV<sup>43,44</sup>.

El sistema Lille (Tabla 1)<sup>1</sup> fue el primero en demostrar el valor pronóstico independiente del estudio citogenético e incorporarlo en un sistema de predicción. Este sistema considera de mal pronóstico la presencia de cariotipos complejos. Posteriormente, el sistema Lausanne-Boumorth<sup>2</sup> logra determinar que la presencia de  $\geq 2$  aberraciones también se encuentra asociada a corta SV.

En el año 1997, el Sistema Pronóstico Internacional (IPSS)<sup>3</sup> define 3 grupos de riesgo citogenético: Bajo, Intermedio y Alto (Tabla 1), con medianas de SV de 3,8, 2,4 y 0,8 años, respectivamente. Las alteraciones de mayor riesgo, peor pronóstico y alto índice de recaída luego de un trasplante de MO son los cariotipos complejos y -7/ del(7q). Mientras que, los casos con cariotipo normal o la presencia del 5q- o 20q- como única alteración constituyen un grupo de buen pronóstico con riesgo disminuido de progresión y larga SV. La pérdida del cromosoma Y, asociada con un pronóstico favorable, ha sido descrita en MO de dadores normales mayores al igual que en pacientes hematológicos de edad avanzada. Por lo tanto, su ausencia no indica una patología clonal. El grupo de riesgo citogenético Intermedio incluye la trisomía 8 y el resto de los hallazgos citogenéticos<sup>3</sup>. La categorización del riesgo citogenético del IPSS ha sido ampliamente comprobada en diferentes series<sup>1-10</sup>, aplicando tanto la clasificación FAB como la WHO, y validada en el sistema WPSS<sup>11</sup>.

El grupo de riesgo Intermedio es heterogéneo y, por lo tanto, se ha tratado de definir mejor el pronóstico de alteraciones de baja frecuencia incluidas en este subgrupo (Tabla 1). El Grupo Cooperativo de Citogenética Español logra definir 4 grupos de riesgo. Los autores proponen que la del(12p) y la del(11q) sean clasificadas como de bajo riesgo y el i(17q) como de muy mal pronóstico. Además, identifican 2 grupos de riesgo Intermedio con medianas de SV de 2,7 y 1,0 año, respectivamente<sup>7</sup>. Posteriormente, el grupo Germano-Austriaco, define otro sistema de riesgo citogenético identificando 4 grupos con medianas de SV de 55, 29, 15 y 9 meses para los grupos de riesgo Bajo, Intermedio-I, Intermedio-II y Alto, respectivamente<sup>10,45,46</sup>. Lo coincidente entre los sistemas publicados es que el cariotipo normal es de buen pronóstico y la presencia de  $>3$  alteraciones es el peor hallazgo. Las

TABLA 1.- Grupos de Riesgo definidos de acuerdo a los Grupos de Riesgo Citogenético

Sistemas pronósticos	Grupos de Riesgo Citogenético			
	Bajo	Intermedio		Alto
		Intermedio I	Intermedio II	
Lille 1 (Morel y col.,1993)	Cariotipo normal Cariotipos que involucran 1 o 2 cromosomas alterados			≥ 3 cromosomas alterados
Lausanne-Bournemouth <sup>2</sup> (Parlier y col., 1995)	Cariotipo normal 1 alteración citogenética			≥ 2 alteraciones citogenéticas
IPSS <sup>3</sup> (Greemberg y col., 1997)	Cariotipo normal -Y, del(5q), del(20q)	+8 1 o 2 alteraciones citogenéticas (otras)		≥ 3 alteraciones citogenéticas -7/del(7q)
Índice Pronóstico Citogenético (Pi) <sup>4</sup> (Pfeilstöcker y col., 1999)*	Cariotipo normal	1 punto	2 o 3 puntos	≥ 4 puntos
GCECGH <sup>7</sup> (Solé y col., 2005)	Cariotipo normal -Y, del(5q), del(20q) del(11q), del(12p)	+8 Rearreglos 3(q21q26), +9, +18, +19, t(11q), del(17p)	Restantes alteraciones citogenéticas	≥ 3 alteraciones citogenéticas -7/del(7q) i(17q)
WPSS <sup>11</sup> (Malcovati y col., 2007)	Cariotipo normal -Y, del(5q), del(20q)	+8 1 o 2 alteraciones citogenéticas (otras)		≥ 3 alteraciones citogenéticas -7/del(7q)
Grupo Germano-Austríaco <sup>10,45</sup> (Haase y col., 2007, 2008)	Cariotipo normal -Y, -X, del(5q), del(20q) +1/+1q, t(1q), t(7q), del(9q), del(12p), las anormalidades del cromosoma 15, t(17q) y +/-21	+8 del(11q)	= 3 alteraciones citogenéticas -7/del(7q)	≥ 3 alteraciones citogenéticas t(5q)
MD Anderson <sup>50</sup> (Kantarjian y col., 2008)	Cariotipo normal 1 o 2 alteraciones citogenéticas (otras)			≥ 3 alteraciones citogenéticas -7/del(7q)
Grupo Germano-Austríaco <sup>46</sup> (Haase y col., 2009)	Cariotipo normal -Y, del(5q), del(20q), del(11q), t(11)(q23), del(12p) y +21 2 alteraciones citogenéticas incluyendo al cromosoma 5	+8 +1q, Rearreglos 3q, t(7q), +19,-21 Otras anormalidades que no incluyan los cromosomas 5 o 7	-X -7/del(7q) simples o dobles = 3 alteraciones citogenéticas	> 3 alteraciones citogenéticas

\* 1 punto: cualquier alteración del cromosoma 5, alteraciones no complejas excluyendo los cromosomas 5, 7 y 8; 3 puntos: alteración en los cromosomas 7 u 8; 4 puntos: alteraciones complejas.

últimas publicaciones agregarían a la del(12p) como de buen pronóstico con medianas de SV cercanas a los 60 meses<sup>7, 10, 47</sup>.

Dada la baja frecuencia de algunas de las anormalidades citogenéticas encontradas y la discordancia entre los diferentes estudios, el valor pronóstico de algunos hallazgos es todavía desconocido. Por lo tanto, el Grupo de Trabajo Internacional en Citogenética de los SMD<sup>48</sup> sugiere la continuidad de la utilización de los grupos de riesgo definidos por IPSS, precisando normas para la enumeración de las aberraciones hasta que se realice un nuevo estudio multicéntrico que involucre un mayor número de pacientes. Estas normas aclaran que:

- A- Se debe contar como una alteración cada cambio numérico (incluyendo la -Y), cada translocación balanceada y cada cambio estructural simple o complejo.
- B- Cuando existen diferentes clones, se deben sumar todas las alteraciones pero contando cada cambio específico sólo una vez.
- C- Las alteraciones constitucionales no sumarían un riesgo adicional.
- D- La tetraploidía debe ser considerada como una única alteración, siempre y cuando ésta sea observada en más de un 20% de las células analizadas;
- E- Todas las alteraciones del cromosoma 7 son de mal pronóstico<sup>49</sup>.

## GENES INVOLUCRADOS EN LA PATOGENESIS

Aunque los mecanismos que conllevan a la iniciación y a la transformación leucémica en pacientes con SMD distan de ser conocidos, ciertas anormalidades cromosómicas y varias alteraciones moleculares, incluyendo la activación de protooncogenes y la inactivación de supresores de tumores, estarían implicadas. Algunas alteraciones citogenéticas como pérdidas o deleciones recurrentes sugieren la presencia de anti-oncogenes, sin embargo, la haploinsuficiencia sería el mecanismo de relevancia. Además, en pacientes con SMD y cariotipo normal, utilizando *microarrays*, han sido detectadas regiones de disomía uniparental adquirida que generalmente involucran *locis* asociados a deleciones<sup>18-19</sup>.

Algunas formas de SMD o LMA serían consecuencia de la colaboración de dos amplias clases de mutaciones: las de tipo I y de tipo II. Las mutaciones tipo I activan las señales de transducción, confieren ventaja proliferativa o de supervivencia sin afectar su capacidad de diferenciación. Estas mutaciones determinarían una activación constitutiva de diversas proteínas, muchas de ellas con actividad TK (mutaciones en el FLT3 y cKIT) u oncogenes (familia del

RAS). Las mutaciones o reordenamientos de tipo II impiden la diferenciación normal de las células hematopoyéticas y afectan casi siempre a factores de transcripción (RUNX1, CBF $\beta$  o RARA), miembros de la familia HOX o proteínas reguladoras de la transcripción como MLL y EP300<sup>51</sup>.

Entre los genes de relevancia en pacientes con SMD (Tabla 2) se encuentran los oncogenes NRAS, KRAS, FMS y FLT3; los genes supresores de tumor TP53, p15<sup>INK4b</sup>, NF1<sup>14</sup> y genes relacionados a mecanismos epigenéticos como el TET2 y ASXL1<sup>52-55</sup>.

El FLT3 y su ligando son importantes para la proliferación y diferenciación de los precursores hematopoyéticos tempranos. Las mutaciones somáticas que generan activación constitutiva del FLT3 son:

A- duplicaciones internas en tándem (DIT) del dominio yuxtamembrana variables en longitud, desde 3 a más de 400 nucleótidos del exón 14.

B- mutaciones puntuales del dominio TK en los codones D835-I836.

La DIT se asocia con dimerización y autofosforilación constitutiva del FLT3, activa señales intracelulares que incluyen las vías de STAT5, RAS y MAPK, alterando la diferenciación, proliferación y supervivencia celular 56-58.

TABLA 2.- Genes relacionados a SMD

Gen	Localización	Proteína/Función	Porcentaje de Mutaciones
ASXL1	20q11.21	<i>additional sex combs like 1</i> : proteína que regula la remodelación de la cromatina	11% (43% LMMC)
FLT3	13q12.2	<i>FMS like tyrosine kinase-3</i> : Receptor de membrana importante en la hematopoyesis temprana	2-3%
JAK2	9p24.1	<i>Janus kinase 2</i> : proteína con actividad tirosina kinasa asociada con el dominio intracelular de receptores citoquina	1-3% (50% ARSA <sup>t</sup> )
KIT	4q12	<i>v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene</i> <i>Infrecuentes homolog</i> : receptor del factor de crecimiento de las células mastoideas (MCF) con actividad tirosina-kinasa	Infrecuentes
MLL	11q23	<i>myeloid/lymphoid o mixed-lineage leukemia</i> : factor de transcripción de múltiples genes y actividad metiltransferasa.	Infrecuentes
NF1	17q11.2	<i>Neurofibrina 1</i> : supresor de tumor; proteína activadora de la acción GTPasa (GAP) del RAS. (LMMCj)	Infrecuentes
NRAS	1p13.2	<i>neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogen homolog</i> : Proteína G que actúa en la transducción de señales de múltiples receptores de citoquinas.	6-40% (30-40% LMMC 25-30% SMDs)
RB1	13q14.2	<i>retinoblastoma 1</i> : regulación ciclo celular, mantenimiento de la estructura cromatínica mediante la regulación de la metilación de histonas.	infrecuentes
RUNX1	21q22.3	<i>runt-related transcription factor 1</i> : factor transcripción (activador) de varios genes específicos de hematopoyesis.	10-17% (15-30% SMDs)
TET2	4q24	<i>Ten- eleven-translocation 2</i> : (por homología con TET1) rol potencial en los patrones de metilación de las islas CpG y en la regulación epigenética, gen supresor tumoral (?)	20% (42-50% LMMC)
TP53	17p13	<i>tumor protein p53</i> : supresor tumoral; factor de transcripción; frena el ciclo celular en estadio G1/S frente al daño o estres.	4-8% (25-30 SMDs)

LMMC: Leucemia Mielonocítica crónica; LMMCj: LMMC juvenil; ARSA<sup>t</sup>: Anemia Refractaria con Sideroblastos Anillados y trombocitosis; SMDs: Síndromes Mielodisplásicos secundarios

La presencia de estas mutaciones en los SMD es <5% y aumenta al 12% en fase leucémica. Se postulan como una lesión genética adquirida tardíamente en la patogénesis, se las asocia con corta SV y progresión leucémica<sup>56-59</sup>.

El FLT3 salvaje o mutado puede activarse por sobreexpresión de la proteína normal o de su ligando de manera autócrina o parácrina<sup>60</sup>. Los niveles del ligando se encuentran elevados en los estadios tempranos en respuesta a un número disminuido de progenitores o por desregulación de factores hematopoyéticos de crecimiento<sup>61</sup>.

**NRAS** y **KRAS** (12p12.1) son proteínas G pequeñas localizadas en el interior de la membrana celular que transmiten señales de receptores de citoquinas hematopoyéticas regulando la apoptosis, diferenciación y proliferación celular. Esta familia presenta mutaciones puntuales en los codones 12, 13 y 61 inhabilitando su actividad GTPasa intrínseca y logrando su activación constitutiva. El RAS salvaje también puede activarse por la hiperactividad de rutas como las de KIT, FLT3, por la fusión TEL/PDGFR $\beta$ , o por mutaciones de proteínas activantes de la acción GTPasa como del NF1<sup>62</sup>. Las proteínas RAS requieren modificaciones post-traduccionales que incluyen la adición de un residuo farnesilo que le permite la translocación a la membrana plasmática para ejercer su función. Varios inhibidores de la farnesil-transferasa, responsable de esta modificación, se encuentran en ensayos clínicos<sup>62-63</sup>.

Un 6-40% de los SMD presentan mutaciones, preferentemente, en el NRAS<sup>21,59</sup>. Las variaciones en los porcentajes pueden atribuirse a las diferentes metodologías utilizadas<sup>64</sup>. La adquisición estas mutaciones estaría asociada con progresión leucémica y peor pronóstico, ya que se observa un incremento significativo en el momento de la transformación<sup>57, 59, 65</sup>.

El gen **JAK2** posee un papel clave en la señal de transducción iniciada por múltiples receptores de factores de crecimiento y citoquinas requeridas en la hematopoyesis. Alrededor del 1-3 % de los pacientes con SMD presentan la mutación JAK2 V617F en el dominio pseudokinasa. La mutación resulta en una activación constitutiva con hiperactividad de su función TK, fosforilación de STAT5 y proliferación independiente de factores<sup>66</sup>. La mutación V617F ha sido encontrada en alrededor del 50% de los pacientes con ARSA con trombocitosis<sup>67</sup>. Este hallazgo, junto con el aumento en la frecuencia de mutaciones MPL W515 han determinado que estos pacientes sean reubicados en el subgrupo de "neoplasias mieloides/mieloproliferativas"<sup>21</sup>.

Los genes **RUNX1** (CBF $\alpha$ 2/AML1) y **CBF $\beta$**  (16q22) son esenciales para la hematopoyesis normal. El RUNX1 incluye un dominio de unión al ADN y

de heterodimerización con el CBF $\beta$ , y un dominio carboxi-terminal de activación transcripcional. El complejo CBF regula la expresión de genes específicos de la hematopoyesis como diversas citoquinas y sus receptores. La disrupción del complejo por translocaciones balanceadas ha sido implicada en la leucemogénesis, sobre todo, en los subtipos LMA M2 [t(8;21)(q22;q22)] y M4eo [inv(16)(p13q22)]<sup>68</sup>.

También existen diferentes mecanismos de inactivación del gen RUNX1 a través de mutaciones puntuales. Mutaciones heredables en este gen se asocian a un desorden plaquetario familiar autosómico dominante caracterizado por plaquetopenia, defectos en la función plaquetaria y riesgo de desarrollar SMD/LMA<sup>69</sup>. El desarrollo de SMD/LMA precisaría de un segundo evento como presencia de anomalías citogenéticas. Estas mutaciones, también pueden ser adquiridas observándose en el 17% de los pacientes con SMD más avanzados y en el 16-40% de pacientes con SMDs/LMAs a tratamiento con agentes alquilantes, asociadas a -7/del(7q)<sup>70</sup>.

Los reordenamientos del gen **MLL** se observan preferentemente en las leucemias agudas. El extremo amino-terminal del MLL se fusiona al extremo carboxi-terminal del *partner* (más de 40 genes) generándose una proteína quimérica aberrante clave en la leucemogénesis<sup>71</sup>. Además, en el MLL han sido detectadas DIT asociadas a +11<sup>56</sup>. Si bien, estas reordenamientos son poco frecuentes en los SMD *de novo*, su frecuencia aumenta en los SMDs/LMAs.

EL **TP53** es un GST referido como "el guardián del genoma": frena el ciclo celular en la transición G1/S o la apoptosis en respuesta a injuria al ADN u otras formas de estrés. TP53 funciona como un factor de transcripción integrando numerosas señales que controlan la proliferación, el arresto celular, cambios en el metabolismo, la reparación del ADN, la senescencia y la apoptosis al interactuar con más de 100 genes: ATM, ATR, Chk1, MAPKs, entre otros. A su vez, TP53 crea una retroalimentación positiva sobre MDM2 (E3-ubiquitina-ligasa) que activa su degradación por el proteosoma. En el caso de que se activara la apoptosis, TP53 disminuiría la expresión de BCL-2 (anti-apoptótica) e incrementaría la expresión de BAX y FAS (pro-apoptóticas)<sup>72-73</sup>.

Más del 50% de los tumores poseen la vía del TP53 anormal. Una de las causas directas es la presencia de mutaciones, en los exones 5-8, que alteran su unión a sitios específicos. La frecuencia de mutaciones de TP53 en los SMD *de novo* es del 4-8%; se incrementa en estadios avanzados o en los SMDs, en los que se encuentra asociada a -5/del(5q), cariotipos complejos y pronóstico desfavorable<sup>74</sup>.

La familia del TET incluye los genes TET1, TET2 y TET3 con regiones altamente conservadas. El TET1

fue identificado como un "partner" de fusión del MLL en la t(10;11)(q22;q23) y codifica para una enzima que convierte 5-metilcitosina a 5-hidroximetilcitosina, teniendo así, un rol potencial en los patrones de metilación y en la regulación epigenética<sup>75</sup>. Aunque la función fisiológica del TET2 aun no ha sido identificada, sus mutaciones se detectan en el 19% de pacientes con desórdenes mieloides asociadas a un evento iniciador de la leucemogénesis<sup>53</sup>. En la mitad de los casos ambos alelos se hayan mutados con pérdida de función, por lo tanto, se sugiere función de GST. Aunque, la función protectora del alelo salvaje remanente en heterocigocidad no sería suficiente<sup>76</sup>.

Las mutaciones en TET2 ocurren en el 20% de los pacientes con SMD, en el 42-50% LMMC<sup>55,77</sup> y en LMAs con características mielomonocíticas y proliferativas<sup>53-54</sup>. Estas mutaciones parecerían estar asociadas a buen pronóstico en los SMD<sup>54</sup> y a pronóstico adverso en la LMMC<sup>55</sup>.

El gen **ASLX1** codifica para una proteína perteneciente al grupo policomb las cuales actúan formando complejos multiproteicos requeridos para mantener el estado represivo de genes homeostáticos durante el desarrollo, probablemente mediante metilación de histonas. Mutaciones en ASLX1 fueron identificadas en el 11% de pacientes con SMD y en 43% de pacientes con LMMC<sup>52</sup>.

## ALTERACIONES EPIGENÉTICAS

En el inicio y progresión de las SMD también intervienen fenómenos epigenéticos que originan alteraciones transmisibles en el patrón de expresión génica sin cambios en la secuencia primaria de nucleótidos del ADN. Entre los mecanismos epigenéticos mejor estudiados se destacan la metilación del ADN y la acetilación/desacetilación de histonas. La desregulación de estos mecanismos conduciría a la transcripción aberrante de genes involucrados en el crecimiento, proliferación, diferenciación y apoptosis celular. Sin embargo, a diferencia de las aberraciones genéticas que ocurren en el cáncer, los cambios epigenéticos son potencialmente reversibles<sup>78</sup>.

Las modificaciones post-traduccionales del tallo N-terminal de las histonas (acetilación, metilación, fosforilación y ubiquitinación) que constituyen el "código histona" son fundamentales en la regulación de la expresión génica. En particular, la desacetilación de las histonas catalizada por las desacetilasas de las histonas confiere a la cromatina una conformación fuertemente represora de la transcripción y contribuye al silenciamiento génico<sup>79-80</sup>.

La metilación se caracteriza por la adición de un grupo -CH<sub>3</sub> a residuos de citosina específicos. Las regiones promotoras de ciertos genes supresores de

tumores claves son targets frecuentes de metilación, entre ellos: P15, P16, SOCS-1, CDH1 (E-catherin), DAP- Kinasa, MDR1 y otros<sup>78-82</sup>. Al igual que en otras formas de cáncer, el patrón de metilación normal está invertido en los SMD, mostrando una hipometilación global del genoma con hipermetilación aberrante de islas CpG en las regiones promotoras de algunos genes. Este proceso ha sido detectado también en estadios tempranos, aunque se asocia con la progresión de la enfermedad y resistencia a quimioterapia<sup>79</sup>.

El gen **p15<sup>INK4B</sup> (CDKN2B)** (9p21) y su homólogo funcional **p16<sup>INK4A</sup> (CDKN2A)** codifican proteínas que regulan el ciclo celular evitando la progresión de la fase G1 a la fase de síntesis al inhibir las quinasas dependientes de ciclina (CDK) 4 y 6. La expresión de p15<sup>INK4B</sup> aumenta durante la diferenciación granulocítica y megacariocítica normal. La inactivación de p15<sup>INK4B</sup> y p16<sup>INK4A</sup> por delección y/o mutación fueron descritas en numerosos tipos de cáncer, sugiriendo su potencial papel como GST. Sin embargo, estos hallazgos son poco frecuentes en las neoplasias de estirpe mieloides. En contraste, la hipermetilación aberrante de p15<sup>INK4B</sup> es un hallazgo frecuente en los SMD, especialmente en las formas con exceso de blastos (AREB y AREB-t). Estos pacientes presentan una menor sobrevida y mayor riesgo de progresión<sup>81, 83</sup>. El estado de metilación del p15<sup>INK4B</sup> no se correlacionaría con alteraciones citogenéticas en los SMD *de novo*, aunque sí con la del(7q) en los SMDs<sup>81, 84</sup>. Si bien, los intentos por establecer una relación entre el estado de metilación de algunos de estos genes y la respuesta clínica a los agentes hipometilantes han resultado infructuosos, en los pacientes tratados con 5-aza-2'-desoxicitidina se ha observado que el aumento de la expresión p15<sup>INK4B</sup> se asociaría con respuesta clínica<sup>80, 85</sup>.

Otros genes como CDH1, DAP-Kinasa, RIL, MAGE1, MDR1 y SOCS1 se encuentran afectados de manera similar en los SMD. Se sugiere la existencia de una desregulación generalizada en los mecanismos normales de metilación que predisponen a hipermetilación aberrante de múltiples genes<sup>78, 82</sup>.

## ALTERACIONES CITOGÉNÉTICAS Y MOLECULARES EN LOS SMDS

Un 60-90% de los pacientes presentan cariotipos alterados, con aumento en la frecuencia de translocaciones, cariotipos complejos y el 80 % de los pacientes presentan alteraciones que involucran los cromosomas 5 y/o 7<sup>86-88</sup>. Las alteraciones citogenéticas encontradas en los SMDs no difieren de las encontradas en las LMAs. Sin embargo, estos hallazgos pueden asociarse con algunos agentes antineoplásicos bien caracterizados. Por más de 2 décadas y sentando



bases para la clasificación de la OMS, la presencia de -5/del(5q) y -7/del(7q) han sido asociadas con exposición a agentes alquilantes (con/ sin radioterapia). Mientras que, los rearrreglos que involucran las regiones 11q23 (MLL) y 21q22 (RUNX1/AML1) se asocian con exposición a inhibidores de topoisomerasa II<sup>89</sup>.

Nuevas evidencias sugerirían, al menos, 8 vías diferentes relacionadas a etiología y características biológicas específicas para los SMDS/LMAs<sup>87</sup>. El camino I, asociado al uso de agentes alquilantes y a mal pronóstico, se observan alteraciones del cromosoma 7 que pueden estar acompañadas de la t(3;21), mutaciones en el NRAS o hipermetilación del p15. El camino II, también asociado al uso de agentes alquilantes y de muy mal pronóstico, incluye las alteraciones del cromosoma 5 que usualmente se ven acompañadas de otras alteraciones citogenéticas y/o por mutaciones del TP53. En el camino III se encuentran las alteraciones balanceadas que involucran al gen MLL, asociadas al uso de epipodófilotoxinas, corto período de latencia y, si bien responden a quimioterapia intensiva, presentan rápidas recaídas. El camino IV se encuentra representado por los reordenamientos que involucran al RUNX1 y CBF $\beta$ , también asociados al uso de inhibidores de la topoisomerasa II, mayoritariamente antraciclinas. Estos pacientes, generalmente, poseen buena respuesta al tratamiento y larga supervivencia. El Camino V se encuentra representado por los pacientes con t<sup>15,17</sup> secundarios al uso de inhibidores de la topoisomerasa II como la mitoxantrona, el bimotoxano y antraciclinas, los cuales responden favorablemente a quimioterapia intensiva más ácido retinoico. El camino VI involucra los reordenamientos en NUP98 (11p15) asociados con terapias con antraciclinas y/o etopósido. El camino VII incluye 10-15% de pacientes con cariotipos normales y alta frecuencia de duplicaciones del FLT3 o del MLL, asociados a pobre respuesta a la quimioterapia. Un último camino VIII, involucraría otras alteraciones de muy baja frecuencia<sup>87</sup>. En casos raros relacionados a la exposición de agentes químicos, como el benceno, las anomalías reportadas son similares a las observadas luego de la exposición a agentes alquilantes.

#### EXPERIENCIA DEL GRUPO DE ESTUDIO DE SMD

El relevamiento de los resultados de los estudios citogenéticos de los 253 pacientes del proyecto piloto (01/07-06/09), presentado en el último congreso de la SAH, mostró que las alteraciones citogenéticas encontradas y los cromosomas mayormente involucrados en nuestra población se corresponden con la

literatura y que la frecuencia de cariotipos alterados, translocaciones y cariotipos complejos (CC) se incrementa en los SMDS<sup>90</sup>.

Los datos analizados reflejan que el estudio citogenético fue realizado en 239 (95%) pacientes, de los cuales 217 (91%) fueron evaluables.

El 29% de los 189 pacientes con SMD *de novo* presentaron cariotipos anormales, siendo 4% CC. Las alteraciones citogenéticas más frecuentes fueron: -Y, 5q-, -7/7q- y +8. Se observó una mayor frecuencia de pérdidas totales o parciales (49%). Los cariotipos agrupados según el IPSS (83% Bajo, 8% Intermedio y 7% Pobre) mostraron diferencias significativas para predecir supervivencia (p=0.0175). Además, se observó que el porcentaje de cariotipos anormales aumenta según el riesgo según los subtipos OMS y FAB.

El 56% de los 25 pacientes con SMDS mostraron cariotipos alterados, incluyendo 24% de CC. Las aberraciones citogenéticas más frecuentes fueron la -5/5q- y -7/7q-. Se observó una mayor frecuencia de pérdidas totales o parciales (47%) y un aumento en el número de translocaciones (17%). Aunque los cariotipos no se asociaron con tratamiento previo, los pacientes con antecedentes oncohematológicos presentaron  $\geq 2$  alteraciones. Además, el 5q-, +8 y 20q- aislados se observaron sólo en los SMD *de novo*, y la del (11) sólo en los SMDS.

#### CONCLUSIONES

La proliferación, diferenciación y supervivencia celular están reguladas mediante hormonas, factores de crecimiento y diversas citoquinas cuyos receptores celulares se comunican con el núcleo mediante caminos de señalización. Alteraciones en el genoma y epigenoma que afectan la expresión o la función de estos genes se encuentran implicadas en el desarrollo y progresión de los SMD.

Si bien es clara la asociación entre algunas mutaciones heredables y la predisposición a SMD/LMA, la mayoría de los SMD son idiopáticos. Las alteraciones genéticas debidas a mutaciones, hallazgos cromosómicos balanceados o no, disomía uniparental adquirida, haploinsuficiencia y los fenómenos epigenéticos, además respuestas alteradas de citoquinas relacionadas con el sistema inmune y el estroma medular, estarían involucrados al inicio y en la progresión de los SMD.

El análisis citogenético posee un rol definido en el diagnóstico, pronóstico, tratamiento y seguimiento de los pacientes. Además, ha permitido delinear regiones de alteraciones recurrentes señalando genes candidatos potenciales en la leucemogénesis. Y, si bien, los avances en la biotecnología han ayudado a dilucidar algunos de los mecanismos involucra-

dos en esta compleja enfermedad, los SMD aún no han podido ser encuadrados en un marco uniforme. Dada la heterogeneidad histológica, citogenética y molecular, la enfermedad en sus diferentes formas, probablemente constituya un grupo de entidades distintas molecularmente, con grados variables de hematopoyesis inefectiva y susceptibilidad a transformación leucémica.

**Agradecimientos:** Se le agradece a la Sociedad Argentina de Hematología, al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y la Fundación "Alberto J. Roemmers".

## ABSTRACT

### Cytogenetic studies and molecular mechanisms in Myelodysplastic Syndromes

Genetic alterations due to mutations, balanced or unbalanced chromosomal rearrangements, acquired uniparental disomy, haploinsufficiency and epigenetic findings are related to the development and progression of MDS. Among others, NRAS, FLT3, TP53, RUNX1, p15<sup>INK4b</sup>, TET2, ASXL1 y RPS14 are frequently altered in MDS.

Approximately, 30-59% of patients with *de novo* MDS shows abnormal karyotypes and these percentages are increased in more advanced subtypes according to FAB and WHO classifications. The most frequently aberrations are: -5/del(5q) [2%-11%], -7/del(7q) [2%-5%], +8 [3%-12%], del(20q) [2%-4%], -Y [2%-4%] and complex karyotypes ( $\geq 3$  alterations) [10-20%].

Around 60-90% of secondary MDS exhibits altered cytogenetic results with an increase of translocations and complex karyotypes [50%]. Abnormalities in chromosomes 5 and 7 [80%] have been associated with exposition to alkylating agents and 11q23 or 21q22 with topoisomerase II inhibitors.

Karyotype has become an important tool for diagnosis, prognosis, treatment and monitoring of MDS patients. Cytogenetic categories of risk according to IPSS have been recognized using either FAB or WHO classifications and afterward adopted by the WPSS system. Although the Intermediate group is heterogeneous, the International Working Group on MDS Cytogenetics suggests continuing with its use until a new multicentric study will be performed.

**Key words:** Cytogenetics; Myelodysplastic Syndromes; Genes, Prognosis.

## BIBLIOGRAFÍA

- Morel P, Hebban M, Lai JL y col. Cytogenetic analysis has strong independent prognostic value in the novo myelodysplastic syndromes and can be incorporated in a new scoring system: a report on 408 cases. **Leukemia** 1993; 7: 1315-23.
- Parlier V, van Melle G, Beris PH y col. Prediction of 18-Month Survival in Patients with Primary Myelodysplastic Syndrome. A regression Model and Scoring System Based on the Combination of chromosome Findings and Bournemouth Score. **Cancer Genet Cytogenet** 1995; 81:1 58-65.
- Greenberg P, Cox C, LeBeau MM y col. International Scoring System for evaluating Prognosis in Myelodysplastic Syndromes. **Blood** 1997; 89:2079-88. (erratum, **Blood** 1998; 91: 1100)
- Pfeilstöcker M, Reisner R, Nösslinger T y col. Cross-validation of prognostic scores in myelodysplastic syndromes on 386 patients from a single institution confirms importance of cytogenetics. **Br J Haematol** 1999; 106: 455-63.
- de Souza Fernández T, Ornellas MD, Otero de Carvalho L y col. Chromosomal alterations associated with evolution from myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia. **Leuk Res** 2000; 24: 839-48.
- Belli C, Acevedo S, Bengió R y col. Detection of Risk Groups in Myelodysplastic Syndrome. A multicenter study. **Haematologica** 2002; 87: 9-16.
- Solé F, Luño E, Sanzo C y col. Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. **Haematologica** 2005; 90: 1168-78.
- Lee J, Lee J, Shin Y y col. Application of different prognostic scoring systems and comparison of FAB and WHO classification in Korean patients with myelodysplastic syndrome. **Leukemia** 2003; 17: 305-13.
- Irons R, Wang Xiaolin, y col. Prevalence of MDS subtypes in Shanghai, China: A comparison of the World Health Organization and French American British Classifications. **Leuk Res** 2006; 30: 769-75.
- Haase D, Germing U, Schanz J y col. 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: 4385-95.
- Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, y col. Time-Dependent Prognostic Scoring System for Predicting Survival and Leukemic Evolution in Myelodysplastic Syndromes. **J Clin Oncol** 2007; 25: 3503-10.
- Sanz GF, Sanz MA, Vallespi T. Etiopathogenesis, prognosis and therapy of myelodysplastic syndromes. **Hematol Cell Ther** 1997; 39: 277-94.
- Tefferi A y Vardiman J. Myelodysplastic Syndromes. **N Engl J Med** 2009; 361: 1872-85.
- Heaney M y Golde G. Myelodysplasia. **N Engl J Med** 1999; 340: 1649-60.
- Larson R, Wang Y, Banerjee M y col. Prevalence of the inactivating 609C-->T polymorphism in the NAD(P)H: quinone oxidoreductase (NQO1) gene in patients with primary and therapy-related myeloid leukemia. **Blood** 1999; 94: 803-7.
- Marcondes M, Mhyre A, Stirewalt D, Kim S, Dinarello C, Deeg J. Dysregulation of IL-32 in myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia modulates apoptosis and impairs NK function. **PNAS** 2008; 105: 2865-70.
- Boudard D, Sordet O, Vasselon C y col. Expression and activity of caspases 1 and 3 in myelodysplastic syndromes. **Leukemia** 2000; 14: 2045-51.
- Gondek L, Tiu R, O'Keefe C, Sekeres M, Theil K, Maciejewski J. Chromosomal lesions and uniparental disomy detected by SNP arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-derived AML. **Blood** 2008; 111: 1534-42.
- Wang L, Fidler C, Nadig N y col. Genome-wide analysis of copy number changes and loss of heterozygosity in myelodysplastic syndrome with del(5q) using high-density single nucleotide polymorphism arrays. **Haematologica** 2008; 93: 994-1000.
- Benasayag S y Gallino M. Bases Citogenéticas para la práctica Hematológica "De lo Supuesto a lo Expuesto en la Nomenclatura Citogenética". **Hematología Argentina** 2010; 14: 58-68.
- Vardiman J, Thiele J, Arber D y col. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood** 2009; 114: 937-51.

22. Testoni N, Borsaru G, Martinelli G y col. 3q21 and 3q26 cytogenetic abnormalities in acute myeloblastic leukemia: biological and clinical features. **Haematologica** 1999; 84: 690-4.
23. Martinelli G, Ottaviani E, Buonamici S y col. Association of 3q21q26 syndrome with different RPN1/EVI1 fusion transcripts. **Haematologica** 2003; 88: 1221-1228.
24. Pedersen B, Jensen I. Clinical and prognostic implications of chromosome 5q deletions: 96 high resolution studied patients. **Leukemia** 1991; 5: 556-73.
25. Van der Berghe H, Vermaeln K, Mecucci C y col. The 5q-anomaly. **Cancer Genet Cytogenet** 1985; 17: 189-255.
26. Larripa I, Acevedo S, Palau V y col. Leukaemic transformation in patients with 5q- and additional abnormalities. **Haematologica** 1991; 76: 363-7.
27. Boulwood J, Fidler C, Strickson A y col. Narrowing and genomic annotation of the commonly deleted region of the 5q- syndrome. **Blood** 2002; 99: 4638-41.
28. Pellagatti A, Hellström-Lindberg E, Giagounidis A y col. Haploinsufficiency of RPS14 in 5q- syndrome is associated with deregulation of ribosomal- and translation-related genes. **Br J Haematol** 2008; 142: 57-64.
29. Ross T, Bernard O, Berger R, Gilliland DG. Fusion of Huntingtin Interacting Protein 1 to Platelet-Derived Growth Factor b Receptor (PDGFbR) in Chronic Myelomonocytic Leukemia With t(5;7)(q33;q11.2). **Blood** 1998; 91: 4419-26.
30. Le Beau M, Espinosa R, Davis E, Eisenbart J, Larson R, Green E. Cytogenetic and molecular delineation of a region of chromosome 7 commonly deleted in malignant myeloid diseases. **Blood** 1996; 88: 1930-5.
31. Kere J, Ruutu T, Davies K y col. Chromosome 7 long arm deletion in myeloid disorders: A narrow breakpoint region in 7q22 defined by molecular mapping. **Blood** 1989; 73: 230.
32. Kratz C, Emerling B, Bonifas J, Wang W, Green E, Le Beau M, Shannon K. Genomic structure of the PIK3CG gene on chromosome band 7q22 and evaluation as a candidate myeloid tumor suppressor. **Blood** 2002; 99: 372-4.
33. Fischer K, Fröhling S, Scherer S y col. Molecular Cytogenetic Delineation of Deletions and Translocations Involving Chromosome Band 7q22 in Myeloid Leukemias. **Blood** 1997; 89: 2036-41.
34. Wong J, Zhang Y, Lieuw K y col. Use of chromosome engineering to model a segmental deletion of chromosome band 7q22 found in myeloid malignancies. **Blood** 2010; 115: 4524-4532.
35. Chen G, Zeng W, Miyazato A y col. Distinctive gene expression profiles of CD34 cells from patients with myelodysplastic syndrome characterized by specific chromosomal abnormalities. **Blood** 2004; 104: 4210-8.
36. Sloan E, Yong A, Ramkissoon S y col. Granulocyte colony-stimulating factor preferentially stimulates proliferation of monosomy 7 cells bearing the isoform IV receptor. **PNAS** 2006; 103: 14483-8.
37. Sloan EM, Mainwaring L, Fuhrer M y col. Preferential suppression of trisomy 8 compared with normal hematopoietic cell growth by autologous lymphocytes in patients with trisomy 8 myelodysplastic syndrome. **Blood** 2005; 106: 841-51.
38. Sloan EM, Pfannes L, Chen G y col. CD34 cells from patients with trisomy 8 myelodysplastic syndrome (MDS) express early apoptotic markers but avoid programmed cell death by up-regulation of antiapoptotic proteins. **Blood** 2007; 109: 2399-405.
39. Soenen V, Preudhomme C, Roumier C, Daudignon A, Lai J, Fenaux P. 17p Deletion in Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome. Analysis of Breakpoints and Deleted Segments by Fluorescence In Situ. **Blood** 1998; 91: 1008-15.
40. Xiao Z, Liu S, Yu M, Xu Z, Hao Y. Isochromosome 17q in patients with Myelodysplastic Syndrome: six new cases. **Haematologica** 2003; 88: 714-5.
41. MacGrogan D, Alvarez S, DeBlasio T, Jhanwar SC, Nimer SD. Identification of candidate genes on chromosome band 20q12 by physical mapping of translocation breakpoints found in myeloid leukemia cell lines. **Oncogene** 2001; 20: 4150-60.
42. 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: 235-42.
43. Wang H, Wang XQ, Xu XP, Lin GW. Cytogenetic evolution correlates with poor prognosis in myelodysplastic syndrome. **Cancer Genet Cytogenet** 2010; 196: 159-66.
44. Bernasconi P, Klersy C, Boni M y col. Does cytogenetic evolution have any prognostic relevance in myelodysplastic syndromes? A study on 153 patients from a single institution. **Ann Hematol** 2010; 89: 545-51.
45. Haase D. Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. **Ann Hematol** 2008; 87: 515-26.
46. Haase D, Schanz J, Tuechler H y col. Updated cytogenetic risk features in MDS - present state. **Leukemia Res** 2009; 33: S9-S10.
47. Pozdnyakova O, Miron PM, Tang G y col. Cytogenetic abnormalities in a series of 1,029 patients with primary myelodysplastic syndromes: a report from the US with a focus on some undefined single chromosomal abnormalities. **Cancer** 2008; 113: 3331-40.
48. Slovak M y Dewald G. International Working Group on MDS cytogenetics: October 2007 meeting report. **Leuk Res** 2008; 32: 1329-32.
49. Chun K, Hagemeyer 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: 160-5.
50. Kantarjian H, O'Brien S, Ravandi F y col. Proposal for a New Risk Model in Myelodysplastic Syndrome That Accounts for Events Not Considered in the Original International Prognostic Scoring System. **Cancer** 2008; 113: 1351-61.
51. Deguchi K, Gilliland DG. Cooperativity between mutations in tyrosine kinases and in hematopoietic transcription factors in AML. **Leukemia** 2002; 16: 740-4.
52. Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adélaïde J y col. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. **Br J Haematol** 2009; 145: 788-800.
53. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V y col. Mutation in TET2 in Myeloid Cancers. **N Engl J Med** 2009; 360: 2289-301.
54. Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Cheok M y col. TET2 mutation is an independent favorable prognostic factor in myelodysplastic syndromes (MDSs) **Blood** 2009; 114: 3285-91.
55. Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Cuidad M y col. TET2 gene mutation is a frequent and adverse event in chronic myelomonocytic leukemia. **Haematologica** 2009; 94: 1676-81.
56. Steudel C, Wermke M, Schaich M y col. Comparative analysis of MLL partial tandem duplication mutation in 956 adult patients with acute myeloid leukemia. **Genes Chrom Cancer** 2003; 37: 237-51.
57. Shih L, Huang C, Wang P y col. Acquisition of FLT3 or N-ras mutations is frequently associated with progression of myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia. **Leukemia** 2004; 18: 466-75.
58. Georgiou G, Karali V, Zouvelou C y col. Serial determination of FLT3 mutations in myelodysplastic syndrome patients at

- diagnosis, follow up or acute myeloid leukaemia transformation: incidence and their prognostic significance. **Br J Haematol** 2006; 134: 302-6.
59. Bacher U, Haferlach T, Kern W, Haferlach C, Schnittger S. A comparative study of molecular mutations in 381 patients with myelodysplastic syndrome and in 4130 patients with acute myeloid leukemia. **Haematologica** 2007; 92: 744-52.
  60. Zeng R, Levis M, Piloto O y col. FLT3 ligand causes autocrine signaling in acute myeloid leukemia cells. **Blood** 2004; 103: 267-74.
  61. Zwierzina H, Anderson JE, Rollinger-Holzinger I y col. Endogenous FLT-3 ligand serum levels are associated with disease stage in patients with myelodysplastic syndromes. **Leukemia** 1999; 13: 553-7.
  62. Malumbres M y Barbacid M. Ras oncogenes: the first 30 years. **Natl Reviews** 2002; 3:7-13.
  63. Kurzrock R, Albitar M, Cortes J y col. Phase II study of R115777, a farnesyl transferase inhibitor, in myelodysplastic syndrome. **J Clin Oncol** 2004; 22: 1287-92.
  64. Belli C, Bowen D, De Brasi C, Larripa I. A single, multiplex analysis for all relevant activating NRAS gene mutations using heteroduplex generators. **Br J Haematol** 2004; 126: 602-5.
  65. Reuter C, Morgan M, Bergmann L. Targeting the Ras signaling pathway: A rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies? **Blood** 2000; 96: 1655-69.
  66. Steensma D, Dewald G, Lasho T y col. The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both "atypical" myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. **Blood** 2005; 106: 1207-9.
  67. Schmitt-Graeff A, Teo S, Olschewski M y col. JAK2V617F mutation status identifies subtypes of refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. **Haematologica** 2008; 93: 34-40.
  68. Huntly B, Gilliland D. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer stem-cell research. **Nat Rev Cancer** 2005; 5: 311-21.
  69. Heller P, Glembofsky A, Gandhi M y col. Low Mpl receptor expression in a pedigree with familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia and a novel AML1 mutation. **Blood** 2005; 105: 4664-70.
  70. Christiansen D, Andersen M, Pedersen-Bjergaard J. Mutations of AML1 are common in therapy-related myelodysplasia following therapy with alkylating agents and are significantly associated with deletion or loss of chromosome arm 7q and with subsequent leukemic transformation. **Blood** 2004; 104: 1474-81.
  71. Meyer C, Schneider B, Reichel M y col. Diagnostic tool for the identification of MLL rearrangements including unknown partner genes. **Proc Natl Acad Sci USA** 2005; 102: 449-54.
  72. Sun Y. p53 and its downstream proteins as molecular targets of cancer. **Mol Carcinog** 2006; 45: 409-15.
  73. Zhang J y Chen X. Posttranscriptional Regulation of p53 and Its Targets by RNABinding Proteins. **Curr Mol Med** 2008; 8: 845-9.
  74. Christiansen D, Andersen M, Pedersen-Bjergaard J. Mutations with loss of heterozygosity of p53 are common in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia after exposure to alkylating agents and significantly associated with deletion or loss of 5q, a complex karyotype, and a poor prognosis. **J Clin Oncol** 2001; 19: 1405-13.
  75. Tahiliani M, Koh K, Shen Y y col. Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. **Science** 2009; 324: 930-4.
  76. Jankowska A, Szpurka H, Tiu R y col. Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. **Blood** 2009; 113: 6403-10.
  77. Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C y col. Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. **Blood** 2009; 114: 144-7.
  78. El-Osta A. On the use of DNA methylation inhibitors and the reversal of transcriptional silencing **Blood** 2003; 101:1656.
  79. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nature** 2002; 3: 415-28.
  80. Gore S, Baylin S, Sugar E y col. Combined DNA Methyltransferase and Histone Deacetylase Inhibition in the Treatment of Myeloid Neoplasms. **Cancer Res** 2006; 66: 6361-9.
  81. Uchida T, Kinoshita T, Nagai H y col. Hypermethylation of the p15INK4B Gene in Myelodysplastic Syndromes. **Blood** 1998; 90: 1403-9.
  82. Voso M, Scardocci A, Guidi F y col. Aberrant methylation of DAP-kinase in therapy-related acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. **Blood** 2004; 103: 698-700.
  83. Quesnel B, Guillem G, Vereecque R y col. Methylation of the p15INK4b Gene in Myelodysplastic Syndromes Is Frequent and Acquired During Disease Progression. **Blood** 1998; 91: 2985-90.
  84. Christiansen D, Andersen M, Pedersen-Bjergaard J. Methylation of p15INK4B is common, is associated with deletion of genes on chromosome arm 7q and predicts a poor prognosis in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukaemia. **Leukemia** 2003; 17: 1813-9.
  85. Daskalakis M, Nguyen T, Nguyen C y col. Demethylation of a hypermethylated P15/INK4B gene in patients with myelodysplastic syndrome by 5-Aza-2-deoxycytidine (decitabine) treatment. **Blood** 2002; 100: 2957-64.
  86. Pedersen-Bjergaard J, Philip P. Two different classes of therapy related and the novo acute myeloid leukemia? **Cancer Genet Cytogenet** 1991; 55: 119-24.
  87. Pedersen-Bjergaard J, Andersen M, Christiansen D, Nerlov C. Genetic pathways in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia **Blood** 2002; 99: 1909-12.
  88. Smith SM, Le Beau MM, Huo D y col. Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: the University of Chicago series. **Blood** 2003; 102: 43-52.
  89. Jaffe ES, Harris NL, Stein H y col. (EDs): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press: **Lyon** 2001.
  90. Belli C, Rojas F, Schlultz N y col. Análisis de los resultados citogenéticos de pacientes con Síndrome Mielodisplásico (SMD) de novo y secundarios. Grupo de estudio de SMD de la Sociedad Argentina de Hematología (SAH)". **Hematología** 2009; 13: 161.