

Síndromes mieloproliferativos/mielodisplásicos

COORDINADORAS: T. VALLESPI. *Barcelona*
A. DOMINGO. *Barcelona*

Resumen del simposio

La clasificación propuesta en el 2001 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para los tumores de tejidos hematopoyéticos significó una serie de cambios sustanciales en el diagnóstico y clasificación de los síndromes mielodisplásicos (SMD). Entre otros, considerar como leucemia aguda aquellos casos que presenten $\geq 20\%$ de blastos en médula ósea y subdividir la anemia refractaria con exceso de blastos (AREB) en 2 tipos, de acuerdo con el tanto por ciento de blastos en médula ósea: AREB-1 para los SMD con cifras entre 5-9% de blastos y AREB-2 para los SMD con blastos entre 10-19%. De aquí la relevancia diagnóstica y pronóstica de la correcta filiación de las células blásticas, cosa no siempre fácil.

El profesor Jean Goasguen, miembro del International Working Group on Myelodysplastic Syndromes Morphology (IWG on MDS) presentará en este simposio una serie de criterios morfológicos para identificar de forma más precisa y reproducible los blastos (agranulares y granulares) y promielocitos. El trabajo en que se ha basado consiste fundamentalmente en el análisis de una única foto digital resultado de 150 fotos tomadas consecutivamente de una extensión de médula ósea de un paciente con una leucemia aguda tipo M2 de la clasificación FAB. El resultado final es una imagen de 8.340×2.386 píxeles que se mostrará durante el simposio, en la que se han numerado 164 células. Tras exponer los criterios morfológicos utilizados y el grado de concordancia entre el grupo de expertos del IWG on MDS que han analizado las 164 células contenidas en la imagen, se realizará una sesión interactiva con los participantes en el simposio a fin de reforzar los criterios transmitidos y observar la concordancia entre los asistentes. La imagen digital puede visitarse previamente en el sitio: www.mds-foundation.org/goasguenfollowup.

Otra gran aportación de la clasificación de la OMS ha sido la identificación de enfermedades que comparten características propias de los SMD y de los síndromes mieloproliferativos (SMP). Como SMD/SMP se incluyen: la leucemia mielomonocítica crónica, la leucemia mieloide crónica atípica, la leucemia mielomonocítica juvenil y los SMD/SMP no clasificables, entre los que se encuentra como entidad provisional la anemia refractaria sideroblástica con hiperplaquetosis marcada (ARSA-TM) (plaquetas $\geq 600 \times 10^9/L$). Esta última es el objeto de la otra parte del simposio.

La doctora Lourdes Florensa, conocida por su gran experiencia en SMD y en trombocitemia esencial, comentará los criterios diagnósticos y las características de esta nueva entidad, así como los casos comunicados de la misma hasta la fecha. A su vez, el doctor José María Raya expondrá los resultados del estudio de 73 pacientes con ARSA-TM procedentes de 18 hospitales españoles. Entre sus aportaciones destaca la relación entre la presencia de la mutación del JAK2 V617 y el diagnóstico de ARSA-TM y las características que presentan este grupo de pacientes.

Confiamos en que este simposio resulte de interés para todos aquellos que se interesan en el diagnóstico de las enfermedades de la sangre y particularmente de las leucemias y SMD.

ANEMIA REFRACTARIA SIDEROBLÁSTICA ASOCIADA A MARCADA TROMBOCITOSIS. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS

L. FLORENSA BRICHS¹, J.M. RAYA SÁNCHEZ²

¹Laboratori de Citologia Hematològica. Escola de Citologia Hematològica Soledad Woessner-IMAS. Servei de Patologia. URNHE-PRBB-IMIM. Hospital del Mar. Barcelona. ²Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Universitario de Canarias. La Laguna. Tenerife

La anemia refractaria sideroblástica asociada a marcada trombocitosis (ARSA-TM) está considerada en la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS)¹ como una entidad provisional que forma parte de los síndromes mielodisplásicos/mieloproliferativos crónicos (SMD/SMPC). Los SMD/SMPC son enfermedades clonales de la célula madre hemopoyética que en su fase inicial comparten características propias de los síndromes mielodisplásicos y de los mieloproliferativos crónicos, con una mielodisplasia variable y una hematopoyesis efectiva¹. Como SMD/SMPC se reconocen cuatro entidades: la leucemia mielomonocítica crónica, la leucemia mioide crónica atípica, la leucemia mielomonocítica juvenil y los SMD/SMPC no clasificables, entre ellos la anemia refractaria sideroblástica asociada a marcada trombocitosis (ARSA-TM) (Tabla 1).

El aumento de la cifra de plaquetas por encima de los valores normales ($400 \times 10^9/L$) se observa en el 0,1% de todos los SMD y entre el 5 y el 20% de las anemias refractarias con sideroblastos en anillo (ARSA)^{2,5}. La ARSA con plaquetas $\geq 600 \times 10^9/L$ o ARSA-TM comparte características de un SMD (anemia refractaria sideroblástica) y de un SMPC (trombocitemia esencial), y en la clasificación de la OMS, en espera de nuevos conocimientos sobre ella, es considerada como una entidad provisional. La ARSA-TM se define por la coexistencia de una cifra persistente de plaquetas superior a $600 \times 10^9/L$ y $\geq 15\%$ sideroblastos en anillo en médula ósea¹.

La ARSA-TM es una enfermedad rara muy poco frecuente que suele incidir en adultos de edad avanzada^{1,6-9}. En algunos casos se acompaña de una esplenomegalia moderada, y según las series publicadas puede presentarse en el 50% de los pacientes⁸.

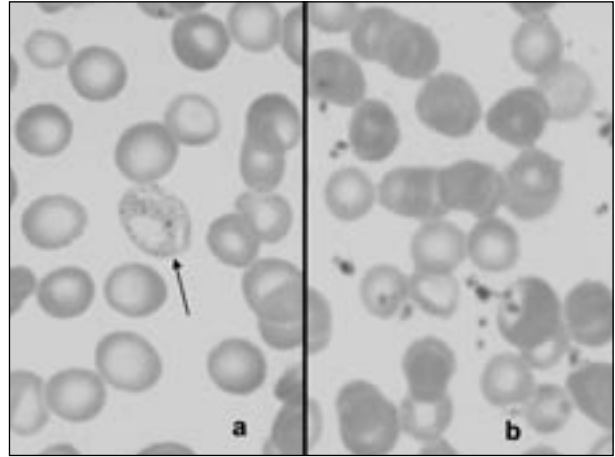


Figura 1. Frotis de sangre periférica de una ARSA-TM. a: hematíes con punteado basófilo grueso y alteración de la distribución de la hemoglobina (*ghost cells*) (flecha); b: presencia de aumento de plaquetas (May-Grünwald-Giemsa).

Los parámetros de sangre periférica más característicos de la ARSA-TM son una anemia normo o macrocítica y una trombocitosis superior a $600 \times 10^9/L$. La cifra de leucocitos suele ser normal, aunque se puede observar leucocitosis, con una cifra de monocitos inferior a $1 \times 10^9/L$. Es frecuente hallar un discreto aumento de granulocitos basófilos y en ocasiones circula alguna célula blástica (en una proporción inferior al 3%)⁵⁻⁹. Las anomalías morfológicas en la ARSA-TM son variadas, y muchas de ellas, características de la ARSA^{1,5-9}. Los eritrocitos suelen presentar anisocromasia o doble población de hematíes, una de normocrómica y otra con deficiente hemoglobinización. La presencia de poiquilocitos y de dacriocitos no es excepcional⁵, y cabe destacar, como dato característico, hematíes en los que coexiste un punteado basófilo grueso y una alteración de la distribución de la hemoglobina (*ghost cells*)^{5,10} (Figura 1). Los leucocitos y las plaquetas no ofrecen rasgos dismórficos o, en todo caso, son moderados y en una proporción inferior al 10% de los mismos. El aspirado medular suele ser hiper celular, con una intensa hiperplasia megacariocítica y aumento de la serie eritroide^{1,5-9} con predominio de los elementos basófilos y policromatófilos; esta circunstancia confiere al frotis, con una tinción panóptica, un aspecto “azul” por la basofilia citoplasmática de los eritroblastos semimaduros y maduros mal hemoglobinizados. Es habitual observar mastocitosis y, en ocasiones, histiocitos de tipo azul marino, lo que traduce el recambio celular aumentado de la médula ósea. Los megacariocitos presentan una morfología variable^{1,5-9} con predominio de elementos de gran talla que se suelen disponer en extensos cúmulos. Es frecuente que presenten trastornos de la maduración y abundantes núcleos, en ocasiones dispersos, semejantes a los observados en la trombocite-

Tabla 1. Clasificación de los síndromes mielodisplásicos/mieloproliferativos según la OMS

• Leucemia mielomonocítica crónica
• Leucemia mioide crónica atípica
• Leucemia mielomonocítica juvenil
• Síndrome mielodisplásico/mieloproliferativo no clasificable
– Anemia refractaria sideroblástica con marcada trombocitosis

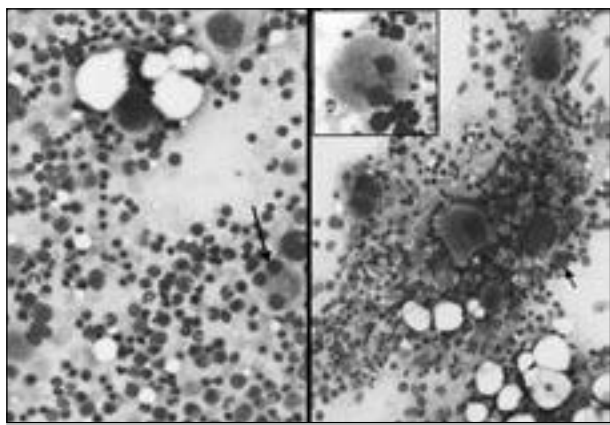


Figura 2. Frotis de médula ósea de una ARSA-TM. a) megacariocitos con núcleos dispersos; b) megacariocitos, alguno de gran talla, otros con núcleo dismórfico (recuadro). Se advierte un mastocito (flecha) (May-Grünwald-Giemsa).

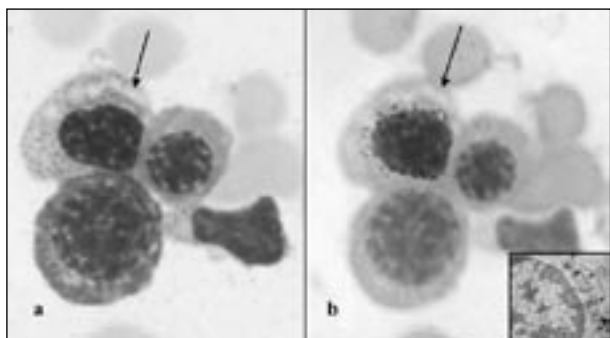


Figura 3. a) Eritroblasto de médula ósea de una ARSA-TM con distribución hemoglobínica anormal y punteado basófilo grueso (May-Grünwald-Giemsa); b) comprobación con tinción de Perls de que este eritroblasto es un sideroblasto en anillo, con gránulos de hemosiderina que se sitúan alrededor del núcleo. En el recuadro pequeño se muestra un detalle ultraestructural del depósito de micelas ferruginosas entre las crestas mitocondriales de un sideroblasto en anillo.

mia esencial (Figura 2). Se puede observar algún megacariocito monolobulado, pero en una proporción muy baja. El hallazgo de micromegacariocitos (megacariocitos de pequeño tamaño, hipolobulados y de citoplasma maduro) en la ARSA-TM es excepcional^{1,5-9}.

La diseritropoyesis suele tener una expresividad variada semejante a la de la ARSA^{1,5-9}. La característica morfológica definitoria es la presencia de sideroblastos en anillo observados con la tinción de Perls en una proporción $\geq 15\%$. Éstos se definen como unos eritroblastos que contienen 10 o más gránulos de hemosiderina que se sitúan alrededor del núcleo, al menos en un tercio o en la mitad del perímetro nuclear. La presencia de sideroblastos en anillo se puede sospechar con la tinción de May-Grünwald-Giemsa al observar eritroblastos donde coexisten una distribución hemoglobínica anormal y un punteado basófilo grueso (Figura 3).

Los sideroblastos en anillo tienen su correspondencia ultraestructural con el depósito de micelas ferru-

ginasas entre las crestas mitocondriales (Figura 3). El exceso de hierro en las mitocondrias se debe a un trastorno en la cadena respiratoria, hecho que conduce a una defectuosa reducción del hierro férrico a ferroso, esencial para la biosíntesis del hem¹¹. Mientras que en la anemia refractaria sideroblástica hereditaria ligada al cromosoma X existe una mutación del gen *ALAS2* responsable del depósito anómalo del Fe mitocondrial, en la ARSA no se conoce la base molecular de este fenómeno¹². Los sideroblastos en anillo suelen ir acompañados de sideroblastos patológicos de tipo III. La tinción de Perls sobre un aspirado medular o la tinción de Perls argéntica son los métodos ideales para observar los sideroblastos; en caso de ferropenia asociada se recomienda utilizar la reacción argéntica combinada con la de Perls¹³. La disgranulopoyesis suele ser moderada, aunque en ocasiones se pueden observar neutrófilos hiposegmentados.

La biopsia medular muestra una celularidad normal o abundante y destaca un aumento de megacariocitos de gran tamaño que se disponen en agregados de 3 a 6 o más elementos. En algunos casos se ha descrito fibrosis reticulínica moderada, dato más propio de los SMPC que de los SMD^{1,5-9}.

En la mayoría de ARSA-TM no se han observado alteraciones cromosómicas y no existe un marcador citogenético característico de esta enfermedad^{1,5}. En casos aislados se ha referido del(11q) y t(8;9)^{5,8}. Recientemente, varios grupos han comunicado casos de ARSA-TM asociados a la mutación de JAK2. La mutación puntual Val617F en el gen que codifica la tirosinquinasa *Janus kinase 2* (situado en el cromosoma 9) está presente en un gran número de pacientes con enfermedades mieloproliferativas crónicas Ph-negativas pero prácticamente ausente en los SMD. La disregulación de esta tirosinquinasa provoca la activación constitutiva de la vía celular JAK/STAT, lo que confiere a los precursores hematopoyéticos una ventaja proliferativa. La incidencia de esta mutación en los pacientes con ARST ha sido estimada entre un 31% y un 71%, según las series publicadas^{8,9,14-16}. Hasta el momento no se han podido demostrar diferencias clínicas o biológicas estadísticamente significativas en función de la presencia o ausencia de la mutación de JAK2 en esta entidad. La mutación de JAK2 es responsable del crecimiento endógeno de los progenitores mieloides *in vitro* en pacientes con SMPC. En el 85% de TE se registra un patrón de crecimiento *in vitro* de progenitores megacariocíticos y eritroides anómalo, denominado *endógeno*, que consiste en la formación de colonias en ausencia de factores de crecimiento. A diferencia de la TE, en las ARSA-TM no se detecta esta anomalía y su comportamiento *in vitro* se asemeja al de los SMD^{6,14,15,17} (experiencia personal).

El diagnóstico diferencial de la ARSA-TM exige descartar causas secundarias de sideroblastosis en anillo

Tabla 2. Diagnóstico de la anemia sideroblástica asociada a marcada trombocitosis

Criterios diagnósticos
· Cifra de plaquetas de $\geq 600 \times 10^9/L$ mantenida más de 6 meses
· Aumento de megacariocitos en médula ósea con formas gigantes
· $\geq 15\%$ sideroblastos en anillo en médula ósea
· Citogenética normal en médula ósea
Criterios de exclusión
· Causas secundarias de sideroblastosis en anillo: sustancias tóxicas (alcohol), medicamentosas (antituberculosos, entre otros)
· Causas secundarias de trombocitosis: inflamación, déficit de hierro, postesplenectomía, estados poshemorrágicos, etc.
· SMD que cursan con trombocitosis como el síndrome 5q ⁻ y alteraciones en 3q23
· SMPC con trombocitosis como la leucemia mieloide crónica y la mielofibrosis idiopática primaria

como sustancias tóxicas o medicamentosas (alcohol, tuberculostáticos, entre muchas otras); por otra parte, se deben descartar causas secundarias de trombocitosis como estados inflamatorios, déficit de hierro, postesplenectomía y otras causas de trombocitosis reactivas. Se debe realizar el diagnóstico diferencial con los SMD que cursan con trombocitosis como el “síndrome 5q⁻” y alteraciones en 3q23 y con SMPC con trombocitosis como la leucemia mieloide crónica y la mielofibrosis idiopática primaria. Por otra parte, los pacientes con ARSA-TM, así como el resto de SMD/SMPC, no deben presentar antecedentes de un SMPC que desarrolle mielodisplasia asociada a una transformación más agresiva de la enfermedad (Tabla 2). En la experiencia de algunos autores (sobre series muy reducidas de casos), la ARSA-TM presenta una supervivencia más favorable que las ARSA sin trombocitosis y semejante a la TE. La probabilidad de evolucionar a una leucemia aguda es muy baja^{5,18,19}. Persisten aún muchas controversias acerca de si la ARSA-TM corresponde a dos patologías simultáneas (ARSA y TE) o si más bien se trata de una sola enfermedad. El estudio sobre un amplio número de pacientes con ARSA-TM permitirá su caracterización y podrá ayudar a definir el pronóstico.

Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado en parte con la ayuda del FIS PI030345 y con la beca de investigación FEHH (Fundación Española de Hematología y Hemoterapia).

Bibliografía

- Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. WHO Classification. Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC Press. Lyon 2001.
- Garand R, Gardais J, Bizet M, Bremond JL, Accard F, Callat MP, de Bouchony ET, Goasguen JE. Heterogeneity of acquired sideroblastic anaemia (AISA). *Leuk Res* 1992; 16: 463-8.
- Gupta R, Abdalla SH, Bain BJ. Thrombocytosis with sideroblastic erythropoiesis: a mixed myeloproliferative myelodysplastic syndrome. *Leuk Lymphoma* 1999; 34: 615-9.
- Schmitt-Graeff A, Thiele J, Zuk I, Kvasnicka HM. Essential thrombocythemia with ringed sideroblasts: a heterogeneous spectrum of diseases, but not a distinct entity. *Haematologica* 2002; 87: 392-9.
- Shaw GR. Ringed sideroblasts with thrombocytosis: an uncommon mixed myelodysplastic/myeloproliferative disease of older adults. *Br J Haematol* 2005; 131: 180-4.
- Renneville A, Quesnel B, Charpentier A, Terriou L, Crinquette A, Lai JL, Cossement C, Lionne-Huyghe P, Rose C, Bateurs F, Preudhomme C. High occurrence of JAK2 V617 mutation in refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Leukemia* 2006; 20: 2067-70.
- Wang SA, Hasserjian RP, Loew JM, Sechman EV, Jones D, Hao S, Liu Q, Zhao W, Mehdi M, Galili N, Woda B, Raza A. Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis harbors JAK2 mutation and shows overlapping myeloproliferative and myelodysplastic features. *Leukemia* 2006; 20: 1641-4.
- Szpurka H, Tiu R, Murugesan G, Aboudola S, Hsi ED, Theil KS, Sekeres MA, Maciejewski JP. Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis (RARS-T), another myeloproliferative condition characterized by JAK2 V617F mutation. *Blood* 2006; 108: 2173-81.
- Gattermann N, Billiet J, Kronenwett R, Zipperer E, Germing U, Nollet F et al. High frequency of the JAK2 V617F mutation in patients with thrombocytosis (platelet count $> 600 \times 10^9/L$) and ringed sideroblasts more than 15% considered as MDS/MPD, unclassifiable. *Blood* 2007; 109: 1334-5.
- Acin P, Florensa L, Andreu LL, Woessner S. Cytoplasmic abnormalities of erythroblasts as a marker for ringed sideroblasts in myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol* 1995; 54: 276-8.
- Cazzola M, Invernizzi R, Bergamaschi G, Levi S, Corsi B, Travaglini E, et al. Mitochondrial ferritin expression in erythroid cells from patients with sideroblastic anemia. *Blood* 2003; 101: 1996-2000.
- Cotter PD, May A, Li L, Al-Sabah AI, Fitzsimons EJ, Cazzola M, Bishop DF. Four new mutations in the erythroid-specific 5-aminolevulinate synthase (ALAS2) gene causing X-linked sideroblastic anemia: increased pyridoxine responsiveness after removal of iron overload by phlebotomy and coinheritance of hereditary hemochromatosis. *Blood* 1999; 93: 1757-69.
- Woessner S, Florensa L. La citología óptica en el diagnóstico hematológico (5ª ed.). Madrid: Acción Médica-FEHH; 2006.
- Boissinot M, Garand R, Hamidou M, Hermouet S. The JAK2-V617F mutation and essential thrombocythemia features in a subset of patients with refractory anemia with ring sideroblasts (RARS). *Blood* 2006; 108: 1781-2.
- Remacha AF, Nomdedeu JF, Puget G, Estivill C, Sarda MP, Canals C et al. Occurrence of the JAK2 V617F mutation in the WHO provisional entity: myelodysplastic/myeloproliferative disease, unclassifiable-refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Haematologica* 2006; 91: 719-20.
- Steensma DP, Dewald GW, Lasho TL, Powell HL, McClure RF, Levine RL, et al. The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both “atypical” myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2005; 106: 1207-9.

17. Florensa L, Besses C, Woessner S, Sole F, Acin P, Pedro C, Sans-et al. Endogenous megakaryocyte and erythroid colony formation from blood in essential thrombocythaemia. *Leukemia* 1995; 9: 271-3.
18. Streeter RR, Presant CA, Reinhard E. Prognostic significance of thrombocytosis in idiopathic sideroblastic anemia. *Blood* 1977; 50: 427-32.
19. Cheng DS, Kushner JP, Wintrobe MM. Idiopathic refractory sideroblastic anemia: incidence and risk factors for leukemic transformation. *Cancer* 1979; 44: 724-31.

ANEMIA REFRACTARIA CON SIDEROBLASTOS EN ANILLO ASOCIADA A TROMBOCITOSIS: RESULTADOS DE UN ESTUDIO NACIONAL

J.M. RAYA SÁNCHEZ, L. FLORENSA BRICHES;
GRUPO ESPAÑOL DE CITOLOGÍA HEMATOLÓGICA

¹Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Universitario de Canarias. La Laguna. Tenerife.

²Laboratori de Citologia Hematològica. Escola de Citologia Hematològica Soledad Woessner-IMAS. Servei de Patologia. URNHE-PRBB-IMIM. Hospital del Mar. Barcelona

Introducción

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en su clasificación de los tumores de tejidos hematopoyéticos y linfoides publicada en 2001, y más concretamente en el capítulo dedicado a enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas inclasificables, menciona una entidad provisional que denomina “anemia refractaria con sideroblastos en anillo asociada a trombocitosis marcada” (ARSA-TM)¹. Al diagnóstico de ARSA (por tanto, más de un 15% de sideroblastos en anillo en médula ósea) debe unirse la existencia de una trombocitosis en sangre, con una cifra de plaquetas superior a $600 \times 10^9/L$. En estos pacientes coexistirían características tanto de enfermedad mieloproliferativa como de síndrome mielodisplásico. El panel de expertos consideraba que el término “inclasificable” era necesario hasta que estudios futuros determinaran si se trata de una enfermedad con entidad propia, un subtipo de ARSA o la coincidencia de dos enfermedades hematológicas. En aquel momento no existía evidencia de alteraciones genéticas moleculares o citogenéticas específicas para esta entidad, y sólo se indicaba como preceptiva la demostración de la ausencia del cromosoma Filadelfia y del gen de fusión *BCR/ABL* en estos pacientes, así como descartar un síndrome 5q- y la existencia de anomalías del cromosoma 3q21q26. El Grupo Español de Citología Hematológica (GECH) se propuso hace dos años re-

unir una casuística lo más amplia posible de aquellos casos diagnosticados de ARSA en los que se constata una trombocitosis asociada, con el objetivo de analizar sus características clínicas y analíticas. Nuestro grupo ha presentado resultados parciales en diferentes congresos nacionales e internacionales^{2,3}.

Pacientes y métodos

Se han estudiado de forma retrospectiva un total de 73 pacientes diagnosticados de ARSA en los que además se constató trombocitosis concomitante (ARSA-T), provenientes de 18 hospitales españoles (véase apartado de Centros participantes). No se incluyeron en el presente estudio los casos con claro diagnóstico inicial de trombocitemia esencial, sin anemia asociada aunque en algún momento de su evolución pudieran presentar una cifra del sideroblastos en anillo superior al 15%. De los 73 casos analizados, 34 cumplían los criterios mencionados de la OMS en cuanto a la existencia de una trombocitosis “marcada” (superior a $600 \times 10^9/L$, ARSA-TM) y 39 presentaban una trombocitosis “no marcada” ($400-600 \times 10^9/L$, ARSA-TnM).

Los datos recogidos incluyeron: edad al diagnóstico; sexo; motivo de consulta; presencia o no de esplenomegalia; hemograma completo (con especial atención a cifra de leucocitos, basófilos, hemoglobina, plaquetas y VCM); presencia o no de mielema en sangre; índice de fosfatasa alcalina granulocitaria (FAG); parámetros bioquímicos (ácido úrico, lactato-deshidrogenasa [LDH], ferritina, vitamina B₁₂); aspirado de médula ósea (porcentaje de sideroblastos en anillo, porcentaje de sideroblastos de tipo III, porcentaje de blastos, estudio de la presencia y grado de displasia, hierro medular del sistema mononuclear fagocítico); biopsia de médula ósea (en los casos en que se había realizado, anotando el grado de celularidad, cantidad de megacariocitos y grado de fibrosis reticulínica); análisis cariotípico, presencia o no de la mutación JAK2 V617F, complicaciones asociadas (neoplasias no hematológicas, evolución a leucemia aguda, problemas trombóticos o hemorrágicos, evolución a mielofibrosis); actitud terapéutica (observación, fármacos citorreductores, antiagregantes orales, soporte transfusional regular); tiempo transcurrido desde el diagnóstico, y supervivencia hasta el *exitus* en caso de desenlace fatal. El estudio de la mutación JAK2 V617F se realizó mediante PCR aleoespecífica en tiempo real con sonda Taqman específica para la forma mutada y para la forma no mutada. En los pacientes vivos se procedió al análisis a partir de granulocitos de sangre, y en fallecidos mediante extracción de ADN realizada a partir de frotis de aspirado medular.

En el análisis estadístico, las variables cuantitativas se expresan con medias y desviaciones típicas (DT). Las

Tabla 1. Características principales de los pacientes en función de la cifra de plaquetas al diagnóstico (ARSA-TM vs. ARSA-TnM)

	ARSA-TM (n = 34)	ARSA-TnM (n = 39)	Valor de p
Edad (años)	73,5 ± 8,9	72,1 ± 11,4	N.S.
Sexo (V:M)	21:13	21:18	N.S.
Plaquetas (× 10 ⁹ /L)	893 ± 289	478 ± 54	< 0,0001
Leucocitos (× 10 ⁹ /L)	9,2 ± 3,6	6,6 ± 2,1	0,001
Hemoglobina (g/L)	104,4 ± 18,8	100,3 ± 14,3	0,07
VCM (fL)	98,5 ± 7,1	103,9 ± 5,9	0,002
Basófilos (× 10 ⁹ /L)	0,102 ± 0,093	0,068 ± 0,077	N.S.
Blastos (%) - MO	1,0 ± 1,2	1,0 ± 1,1	N.S.
Sideroblastos de tipo III (%) - MO	25 ± 20	23 ± 19	N.S.
Sideroblastos en anillo (%) - MO	44 ± 20	50 ± 17	N.S.
Ácido úrico	5,7 ± 2,4	5,5 ± 1,5	N.S.
LDH (U/L)	417 ± 216	353 ± 132	N.S.
Ferritina	653 ± 948	349 ± 237	N.S.
Vitamina B ₁₂	771 ± 671	698 ± 441	N.S.
Esplenomegalia	8/30 (27%)	2/31 (6%)	0,035
Anomalías cariotípicas	4/23	3/29	N.S.
Mutación JAK2 presente	14/21 (67%)	3/23 (13%)	0,001
Hiperplasia megacariocítica	14/18 (78%)	4/9 (45%)	0,09
Fibrosis medular	7/13 (54%)	2/10 (20%)	0,09
Dependencia transfusional	7/28 (25%)	10/35 (29%)	N.S.

Datos expresados como media ± desviación típica (variables cuantitativas) o como frecuencias-porcentajes (variables cualitativas). N.S.: no significativa; MO: médula ósea.

variables categóricas se expresan con frecuencias porcentajes. Las comparaciones de proporciones entre grupos se llevaron a cabo con las pruebas de χ^2 o exacta de Fisher, según procediera. Las comparaciones de rangos entre grupos para las variables categóricas se llevaron a cabo con la prueba de Mann-Whitney. Las comparaciones de tiempos de supervivencia entre los grupos se realizaron con un análisis de regresión de Cox.

Resultados

La edad media del total de pacientes estudiados fue de 72,7 años (DT: 10,3 [29-89]), y la muestra estaba constituida por 42 varones y 21 mujeres. El motivo de consulta fue, mayoritariamente y a partes iguales, un hallazgo casual (43,3%) o el estudio de un síndrome anémico (43,3%) y, más raramente, un síndrome constitucional (8,3%), un evento trombótico (3,3%) o un episodio hemorrágico (1,7%). El seguimiento medio de los pacientes ha sido de 45,4 ± 35,9 meses (1-174 meses), y en el momento de cerrar el estudio habían fallecido 23 (31,5%).

Al comparar el grupo de pacientes con ARSA-TM con aquellos con ARSA-TnM (Tabla 1), vemos que no exis-

ten diferencias significativas en cuanto a la edad (73,4 ± 8,9 vs. 72,2 ± 11,5) ni el sexo (21 varones y 13 mujeres en el primer grupo frente a 21 varones y 18 mujeres en el segundo). En los pacientes con ARSA-TM, el motivo de consulta más frecuente fue el hallazgo casual (46,4%), mientras que en los afectos de ARSA-TnM predominó el síndrome anémico (50%). Desde un punto de vista de las características clínicas y biológicas del grupo con trombocitosis marcada, éste presentó una mayor incidencia de esplenomegalia (p = 0,035) y una cifra de leucocitos significativamente superior (p = 0,001), mientras que los pacientes con ARSA-TnM presentaron un VCM más elevado, en rango de macrocitosis (p = 0,002), y una tendencia a cifras de hemoglobina más bajas (p = 0,07). El índice de FAG dio valores elevados más frecuentemente en los casos de trombocitosis marcada (58,3%), y generalmente dentro del rango de normalidad en los pacientes con ARSA-TnM (56,3%) (p = 0,031). No existieron diferencias entre ambos grupos relativas al recuento de basófilos en sangre; porcentajes de blastos, de sideroblastos de tipo III y de sideroblastos en anillo, en aspirado medular; ni en las concentraciones séricas de ácido úrico, LDH, ferritina y vitamina B₁₂. La biopsia de médula ósea (si bien fue realizada sólo en 27 pacientes, es decir, en un 37% de los casos) puso de manifiesto una

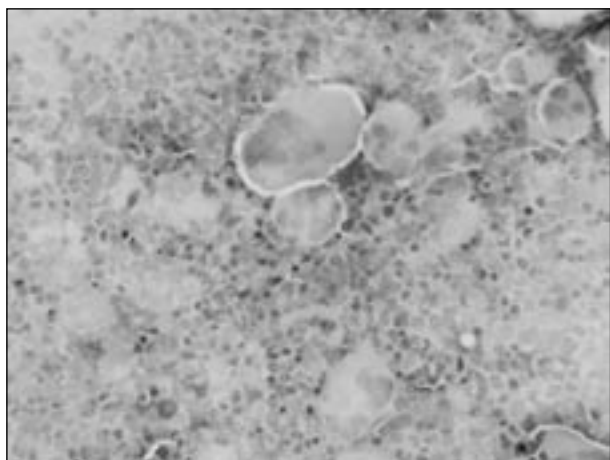


Figura 1. Aspirado de médula ósea con tinción de Perl's en el que se aprecia un aumento llamativo del hierro medular ($\times 200$).

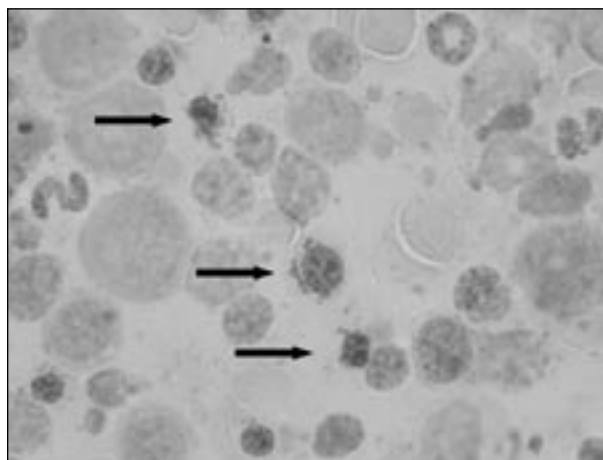


Figura 2. Aspirado de médula ósea con tinción de Perl's en el que se aprecia la presencia de sideroblastos "en anillo" ($\times 1.000$).

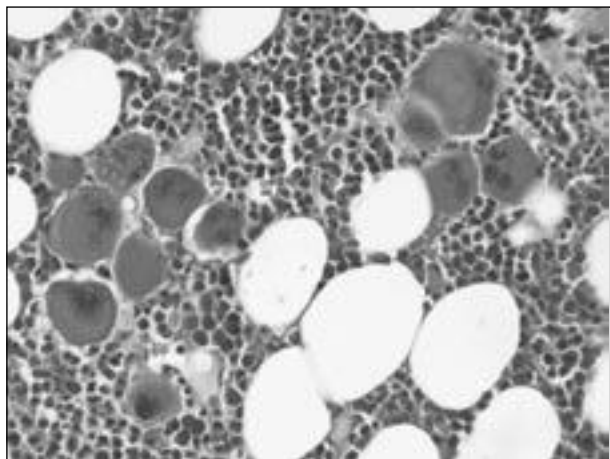


Figura 3. Biopsia de médula ósea con agregados de megacariocitos (hematoxilina-eosina, $\times 200$).

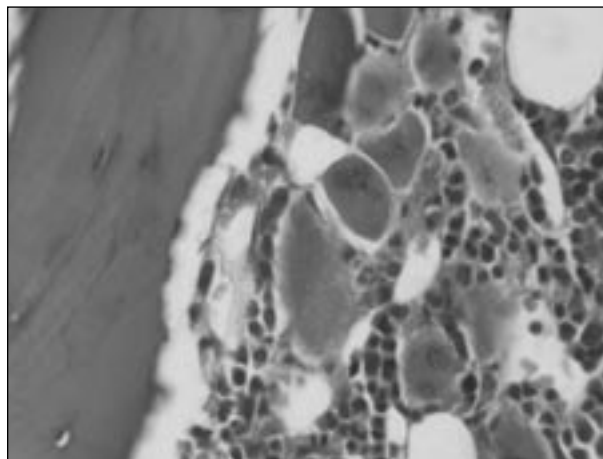


Figura 4. Biopsia de médula ósea con un agregado (*cluster*) de megacariocitos (hematoxilina-eosina, $\times 400$).

tendencia a una mayor hiperplasia megacariocítica y a un mayor grado de fibrosis, en el grupo con trombocitosis marcada ($p = 0,09$ en ambos casos), mientras que la hiperplasia fue la norma en ambos grupos de enfermos (más del 80% de las biopsias). Las Figuras 1-4 muestran algunas imágenes de aspirado y biopsia medulares ilustrativas de la ARSA-T.

La prevalencia de alteraciones cariotípicas fue similar en ambos grupos (17,4% vs. 10,3%, respectivamente). Ningún paciente mostró positividad para BCR/ABL ni la presencia de la anomalía citogenética 5q-. Se pudieron obtener resultados del estudio de la mutación JAK2 V617F en 44 casos de los 73 pacientes estudiados (60%). En el grupo con ARSA-TM la mutación estuvo presente en el 67% de los casos (14/21), mientras que en el grupo con ARSA-TnM sólo en un 13% (3/23), siendo esta diferencia altamente significativa ($p = 0,001$).

Desde un punto de vista de las eventuales complicaciones que pudieran aparecer en el curso de la enferme-

dad, tampoco se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes. Así, la transformación a leucemia aguda ocurrió en un paciente con ARSA-TM y en dos con ARSA-TnM; la aparición de neoplasias no hematológicas en el curso de la enfermedad aconteció en tres pacientes en el grupo ARSA-TM frente a dos casos en el grupo ARSA-TnM; la evolución a mielofibrosis se registró en dos casos de ARSA-TM, frente a uno del grupo de ARSA-TnM. Tampoco existieron diferencias en cuanto a la aparición de complicaciones trombóticas (1 de 26 pacientes con ARSA-TM frente a 2 de 30 con ARSA-TnM) ni hemorrágicas (4 episodios de 27 frente a 2 de 29, respectivamente). Cuando se analiza la actitud terapéutica adoptada, en ambos grupos de pacientes predominó la abstención, si bien en un 31% de los casos con trombocitosis marcada se pautó hidroxiurea en algún momento, frente a sólo el 14,7% de los afectados de ARSA-TnM. La antiagregación oral se pautó al 34,6% de los pacientes

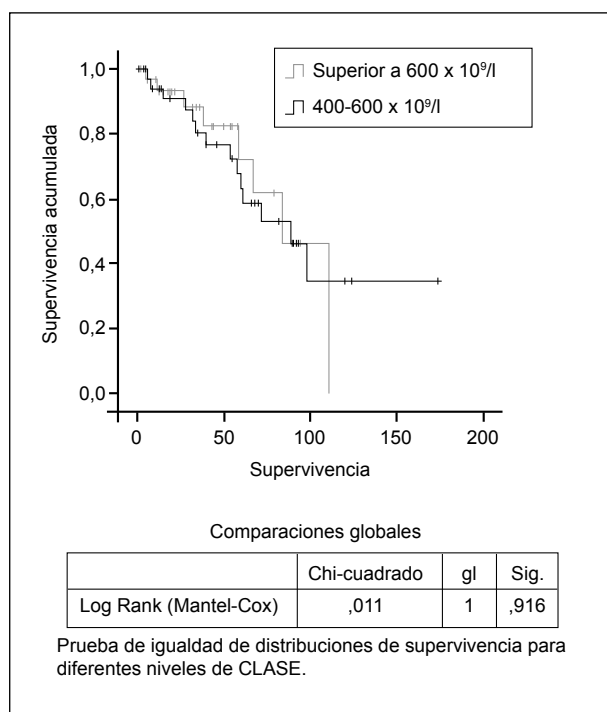


Figura 5. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia diferenciando los pacientes con ARSA-TM frente a aquellos con ARSA-TnM.

con ARSA-TM, frente al 20% de casos con trombocitosis no marcada. No existieron diferencias en cuanto a los requerimientos transfusionales de los enfermos, adoptándose la transfusión de concentrados de hemáties como práctica regular en un 25% de los casos de ARSA-TM y en un 28,6% de casos con ARSA-TnM. Por último, las comparaciones de tiempos de supervivencia entre los dos grupos de enfermos no mostraron diferencias significativas (Figura 5).

Cuando agrupamos al conjunto de todos los pacientes con ARSA-T en función de si eran o no portadores de la mutación JAK2 V617F (Tabla 2), comprobamos que aquellos con la mutación JAK2 mostraron una cifra mayor de leucocitos ($p = 0,019$), y una tendencia a una mayor frecuencia de esplenomegalia ($p = 0,079$), a un mayor concentración de basófilos en sangre ($p = 0,063$), y a una mayor concentración plasmática de LDH ($p = 0,092$). Por el contrario, los pacientes con ARSA-T sin la mutación JAK2 V617F presentaron una cifra significativamente inferior de hemoglobina al diagnóstico ($p = 0,034$) y un VCM más elevado ($p = 0,019$). No se encontraron diferencias relacionadas con la edad, sexo, índice FAG, frecuencia de alteraciones cariotípicas, o incidencia de complicaciones evolutivas (neoplasias no hematológicas, transformación

Tabla 2. Características principales de los pacientes con ARSA asociada a trombocitosis (ARSA-T) en función de la presencia o no de la mutación JAK2 V617F

	ARSA-T con mutación JAK2 V617F (n = 17)	ARSA-T sin mutación JAK2 V617F (n = 27)	Valor de p
Edad (años)	72,9 ± 11,1	74,2 ± 8,9	N.S.
Sexo (V:M)	11:6	17:10	N.S.
Plaquetas ($\times 10^9/L$)	845 ± 278	567 ± 222	0,0001
Leucocitos ($\times 10^9/L$)	9,2 ± 3,5	6,7 ± 2,2	0,019
Hemoglobina (g/L)	109,2 ± 16,6	97,5 ± 16,7	0,034
VCM (fL)	97,3 ± 8,7	103,4 ± 5,6	0,019
Basófilos ($\times 10^9/L$)	0,108 ± 0,082	58,4 ± 60,5	0,06
Blastos (%) - MO	0,9 ± 1,2	1,3 ± 1,2	N.S.
Sideroblastos de tipo III (%) - MO	31 ± 27	29 ± 23	N.S.
Sideroblastos en anillo (%) - MO	48 ± 21	47 ± 19	N.S.
Ácido úrico	5,3 ± 2,4	5,6 ± 1,8	N.S.
LDH (U/L)	429 ± 191	318 ± 110	0,09
Ferritina	656 ± 674	590 ± 1032	N.S.
Vitamina B ₁₂	579 ± 391	680 ± 599	N.S.
Esplenomegalia	4/14 (29%)	1/20 (5%)	0,07
Anomalías cariotípicas	2/15 (13%)	2/20 (10%)	N.S.
Hiperplasia megacariocítica	7/8 (87%)	2/3 (67%)	N.S.
Fibrosis medular	5/7 (71%)	0/3 (0%)	0,08
Dependencia transfusional	1/14 (7%)	8/24 (33%)	0,07

Datos expresados como media ± desviación típica (variables cuantitativas) o como frecuencias-porcentajes (variables cualitativas). N.S.: no significativa; MO: médula ósea.

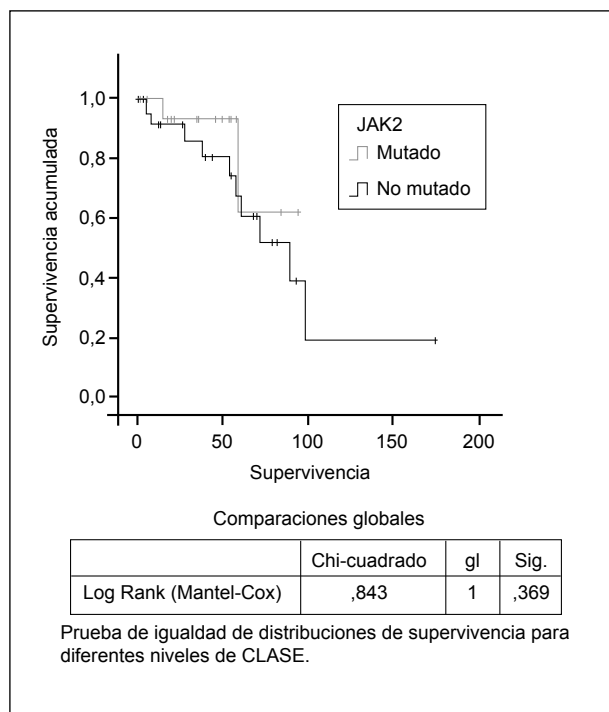


Figura 6. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia diferenciando los pacientes con JAK2 mutado frente a aquellos con JAK2 no mutado.

a leucemia aguda o evolución a mielofibrosis, aparición de complicaciones de tipo trombótico o hemorrágico). Por lo que al tratamiento se refiere, un análisis retrospectivo revela una actitud claramente distinta: en los pacientes con JAK2 no mutado, la abstención terapéutica fue la norma (91,7%), frente a los portadores de la mutación (abstención en un 50%), y en estos últimos se empleó más frecuentemente tratamiento citorreductor con hidroxurea en algún momento de la enfermedad (42,9%) frente a su utilización en muy escasos pacientes (sólo 4,2%) en los casos sin la mutación ($p = 0,009$). La necesidad de soporte transfusional frecuente también fue mayor en los enfermos con ARSA-T sin mutación JAK2 (33,3%), mientras que sólo fue necesario en un 7,1% de casos portadores de la mutación ($p = 0,071$). De nuevo, los tiempos de supervivencia de los casos con JAK2 mutado fueron similares a los de los no mutados (Figura 6). En la Tabla 2 se observan las principales diferencias entre ambos grupos de pacientes.

Discusión

La cifra de plaquetas requerida por la OMS para el diagnóstico de la entidad provisional denominada “anemia refractaria con sideroblastos en anillo asocia-

da a trombocitosis marcada” debe ser superior a $600 \times 10^9/L$. Esta cifra es arbitraria y algunos autores prefieren hablar del término “sideroblastos en anillo con trombocitosis”, y no ser tan estrictos en cuanto a la cifra de plaquetas necesaria para diagnosticar a un paciente de ARSA-T⁴. Sin embargo, cuando comparamos en nuestro estudio ambos grupos de pacientes, aquellos con trombocitosis marcada (plaquetas superiores a $600 \times 10^9/L$, ARSA-TM) y los que presentaban trombocitosis no marcada (plaquetas entre 400 y $600 \times 10^9/L$, ARSA-TnM), llaman la atención algunas diferencias. Así, el primer grupo, aquellos con ARSA-TM presentan algunas características más propias de enfermedad mieloproliferativa (forma de presentación más frecuentemente como hallazgo casual, cifra más elevada de leucocitos, mayor incidencia de esplenomegalia, una mayor frecuencia de hiperplasia megacariocítica y fibrosis en la biopsia medular, y un JAK2 mutado en un elevado porcentaje de casos), mientras que los segundos tienen un “comportamiento” más mielodisplásico (presentación más habitual como síndrome anémico, cifra más baja de hemoglobina y mayor valor del VCM, y un JAK2 no mutado). La cifra de $600 \times 10^9/L$ plaquetas no resulta, por tanto, tan arbitraria, y ayuda a separar, al menos en nuestra serie, pacientes con una enfermedad más mieloproliferativa de aquellos con un comportamiento más propio de enfermedad mielodisplásica. Basándonos en nuestros resultados, estamos más de acuerdo con los autores que no creen oportuno bajar a $500 \times 10^9/L$ el umbral para establecer el diagnóstico de ARSA con trombocitosis marcada⁵.

Por otra parte, hemos de tener en cuenta que cuando se publicó la clasificación OMS (2001) aún no se tenía conocimiento de la importancia que la mutación JAK2 V617F podría tener en el estudio de las enfermedades mieloproliferativas⁶. En la actualidad existe cada vez mayor evidencia de que la mutación JAK2 V617F constituye un elemento fisiopatológico clave en un elevado porcentaje de pacientes con enfermedad mieloproliferativa crónica. En concreto, más del 90% de los pacientes con policitemia vera son portadores de la mutación somática JAK2 V617F en sus granulocitos⁷. Esto ha llevado a algunos autores a reconsiderar la clasificación OMS de los síndromes mieloproliferativos crónicos Filadelfia-negativos⁸⁻¹¹. Sin embargo, esta mutación se puede encontrar también en otras enfermedades mieloproliferativas atípicas, aunque con menor frecuencia, y se halla de forma sólo ocasional en pacientes con síndromes mielodisplásicos¹²⁻¹⁴. Finalmente, no se ha descrito JAK2 V617F en leucocitosis ni trombocitosis secundarias, ni tampoco en enfermedades linfoproliferativas. La determinación de esta mutación puede considerarse, por tanto, como un test de clonalidad específicamente mieloide y muy útil, desde un punto de vista diagnóstico, en la evaluación de los síndromes mieloproliferativos crónicos Filadelfia-negativos.

Por ello, tal vez una forma más “fisiopatológica” de diferenciar los pacientes con ARSA-T (sin subestimar la cifra de plaquetas) es la que consiste en agruparlos en función de la presencia o ausencia de la mutación JAK2 V617F. En nuestra serie, se pudo analizar la existencia o no de la mutación JAK2 V617F en 44 casos del total de 73 pacientes (60%). Globalmente, la mutación estuvo presente en el 39% (17/44) de los casos, pero este porcentaje aumentaba significativamente en el grupo de pacientes con ARSA-TM (14/21, 67%), cuando se comparaba con el grupo con ARSA-TnM (sólo 3 de 23, un 13%).

En el pasado año 2006, algunos autores han encontrado mayor incidencia de la mutación JAK2 V617F en los pacientes con ARSA-T^{14,21}; y este porcentaje mencionado del 67% es similar al aportado en la serie de Szpurka *et al.*¹⁵, si bien ellos sólo estudiaron 9 casos de ARSA-TM, frente a los 21 de nuestro estudio. Por ello consideramos interesante analizar en nuestra serie si, independientemente de la cifra de plaquetas, podrían existir diferencias entre los pacientes con ARSA-T en función de si eran o no portadores de esta mutación. En este sentido, encontramos que los portadores de JAK2 V617F de nuevo registraron cifras mayores de leucocitos y basófilos en sangre, de frecuencia de esplenomegalia, de concentración plasmática de LDH y de incidencia de fibrosis medular. Por su parte, los pacientes con ARSA-T sin la mutación JAK2 V617F presentaron una cifra más baja de hemoglobina al diagnóstico y un VCM más elevado. La necesidad de utilizar hidroxiurea como tratamiento citorreductor fue claramente mayor en el grupo de enfermos portadores de la mutación, mientras que los requerimientos transfusionales fueron superiores en los pacientes no portadores de JAK2 V617F.

Nuestros resultados, con un número de pacientes netamente superior al recogido hasta la fecha en la literatura, apoyan los de otros autores en el sentido de poder separar la ARSA-TM como enfermedad mieloproliferativa crónica asociada a la mutación JAK2 V617F, frente a la ARSA-TnM, esta última con características clínicas y biológicas más propias de un síndrome mielodisplásico no asociado a la mencionada mutación JAK2.

Conclusiones

En nuestra opinión, y según los hallazgos encontrados en un número significativo de pacientes (73) afectos de ARSA-T, provenientes de 18 hospitales de nuestro país, la cifra de plaquetas $600 \times 10^9/L$ separa dos grupos de enfermedades: a) una ARSA-T con trombocitosis no marcada ($400-600 \times 10^9/L$), con características biológicas más próximas a la ARSA “clásica” y un comportamiento clínico más propio de síndrome mielodisplásico; y b) una ARSA-T con trombocitosis marcada ($>$

$600 \times 10^9/L$), que en lo fundamental no difiere demasiado de lo observado en pacientes con enfermedad mieloproliferativa crónica. No nos parece suficientemente justificado bajar arbitrariamente la cifra de plaquetas de $600 \times 10^9/L$ a $500 \times 10^9/L$ para establecer el diagnóstico de la entidad que la OMS recoge como ARSA con trombocitosis marcada. La determinación de la mutación JAK2 V617F, que resulta relativamente sencilla en la actualidad, se postula como una herramienta útil desde un punto de vista diagnóstico para separar, de una forma aún más precisa que la cifra de plaquetas, los casos de ARSA-T y naturaleza mieloproliferativa (JAK2 mutado) de aquellos con un carácter más puramente mielodisplásico (JAK2 no mutado).

Bibliografía

1. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. WHO classification. Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press; 2001.
2. Raya JM, Florensa L, Letamendi G, Piñán MA, Barbón M, Luño E, et al. Anemia refractaria con sideroblastos en anillo asociada a trombocitosis marcada: resultados preliminares de un estudio multicéntrico retrospectivo. *Haematologica* (ed. esp.) 2006; 91 (extr. 2): 93.
3. Raya JM, Florensa L, Domingo A, Arenillas L, Alonso E, Letamendi G, et al. Refractory anaemia with ringed sideroblasts associated with thrombocytosis: results from a Spanish multicentric study. 12th EHA Congress, Vienna 2007 (accepted).
4. Shaw GR. Ringed sideroblasts with thrombocytosis: an uncommon mixed myelodysplastic/myeloproliferative disease of older adults. *Br J Hematol* 2005; 131: 180-4.
5. Bain B. Ringed sideroblasts with thrombocytosis: an uncommon mixed myelodysplastic/myeloproliferative disease of older adults. *Br J Hematol* 2006; 134: 340.
6. Tefferi A, Gilliland DG. JAK2 in myeloproliferative disorders is not just another kinase. *Cell Cycle* 2005; 4: 1053-6.
7. Tefferi A, Pardanani A. Mutation screening for JAK2V617F: when to order the test and how to interpret the results. *Leuk Res* 2006; 30: 739-44.
8. Tefferi A, Gilliland DG. The JAK2V617F tyrosine kinase mutation in myeloproliferative disorders: status report and immediate implications for disease classification and diagnosis. *Mayo Clin Proc* 2005; 80: 947-58.
9. Tefferi A. Classification, diagnosis and management of myeloproliferative disorders in the JAK2V617F era. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006; 240-5.
10. Michiels JJ, De Raeye H, Berneman Z, Van Bockstaele D, Hebeda K, Lam K, et al. The 2001 World Health Organization and updated European clinical and pathological criteria for the diagnosis, classification, and staging of the Philadelphia chromosome-negative chronic myeloproliferative disorders. *Semin Thromb Hemost* 2006; 32: 307-40.
11. Michiels JJ, Berneman Z, Van Bockstaele D, De Raeye H, Schroyens W. Current diagnostic criteria for the chronic myeloproliferative disorders (MPD) essential thrombocythemia (ET), polycythemia vera (PV) and chronic idiopathic myelofibrosis (CIMF). *Pathol Biol (Paris)* 2007; 55: 92-104.
12. Steensma DP, Dewald GW, Lasho TL, Powell HL, McClure RF, Levine RL et al. The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both “atypical” myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2005; 106: 1207-9.

13. Ohyashiki K, Aota Y, Akahane D, Gotoh A, Miyazawa K, Kimura Y et al. The JAK2 V617F tyrosine kinase mutation in myelodysplastic syndromes (MDS) developing myelofibrosis indicates the myeloproliferative nature in a subset of MDS patients. *Leukemia* 2005; 19: 2359-60.
14. Wang SA, Hasserjian RP, Loew JM, Sechman EV, Jones D, Hao S, et al. Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis harbors JAK2 mutation and shows overlapping myeloproliferative and myelodysplastic features. *Leukemia* 2006; 20: 1641-4.
15. Szpurza H, Tiu R, Murugesan G, Aboudola S, His ED, Theil KS, et al. Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis (RARS-T), another myeloproliferative condition characterized by JAK2 V617F mutation. *Blood* 2006; 108: 2173-81.
16. Remacha AF, Nomdedeu JF, Puget G, Estivill C, Sarda P, Canals C, et al. Occurrence of the JAK2 V617F mutation in the WHO provisional entity: myelodysplastic/myeloproliferative disease, unclassifiable—refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Haematologica* 2006; 91: 719-20.
17. Boissinot M, Garand R, Hamidou M, Hermouet S. The JAK2-V617F mutation and essential thrombocythemia features in a subset of patients with refractory anemia with ring sideroblasts (RARS). *Blood* 2006; 108: 1781-2.
18. Renneville A, Quesnel B, Charpentier A, Terriou L, Crinquette A, Lai J-L, et al. High occurrence of JAK2 V617F mutation in refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Leukemia* 2006; 20: 2067-70.
19. Steensma DP, Caudill JS, Pardanani A, McClure RF, Lasho TL, Tefferi A. MPL W515 and JAK2 V617 mutation analysis in patients with refractory anemia with ringed sideroblasts and an elevated platelet count. *Haematologica* 2006; 91: ECR57.
20. Ceesay MM, Lea NC, Ingram W, Westwood NB, Gaken J, Mohamedali A, et al. The JAK2 V617F mutation is rare in RARS but common in RARS-T. *Leukemia* 2006; 20: 2060-1.
21. Gattermann N, Billiet J, Kronenwett R, Zipperer E, Germing U, Nollet F, et al. High frequency of the JAK2 V617F mutation in patients with thrombocytosis (platelet count > 600 × 10⁹/L) and ringed sideroblasts more than 15% considered as MDS/MPD, unclassifiable. *Blood* 2007; 109: 1334-5.

Centros participantes

Hospital *del Mar* (Barcelona): Dra. Florensa, Dra. Arenillas, Dra. Bellosillo, Dra. Woessner; *Universitari de Bellvitge* (Hospitalet, Barcelona): Dra. Domingo, Dra. Alonso; *Clínica i Provincial* (Barcelona): Dra. Rozman, Dr. Gutiérrez; *Central de Asturias* (Oviedo): Dra. Luño, Dra. Sanzo; *de Cruces* (Baracaldo, Vizcaya): Dra. Piñán, Dra. Letamendi; *La Fe* (Valencia): Dra. Pérez Sirvent, Dr. Cervera; *de León* (León): Dr. Barbón; *de Getafe* (Madrid): Dr. García Alonso; *Doctor Negrín* (Las Palmas de Gran Canaria): Dra. Molero, Dra. Lemes; *Marqués de Valdecilla* (Santander): Dr. Yáñez; *Sierrallana* (Torrelavega, Cantabria): Dr. Olalla; *Germans, Trias i Pujol* (Badalona, Barcelona): Dra. Millá, Dr. Navarro; *Txagorritxu* (Vitoria); *de Zumárraga* (Guipúzcoa): Dra. Elósegui, Dra. Hernández Santamaría; *Clínico San Carlos* (Madrid): Dra. Villegas, Dra. Mateo; *de Laredo* (Cantabria): Dr. Cortés, Dra. González Ponte; *Son Dureta* (Palma de Mallorca): Dra. Durán; *Universitario de Canarias* (La Laguna, Tenerife): Dr. Raya, Dr. Hernández Nieto.

Agradecimientos

Al Dr. Alejandro Jiménez (Unidad Mixta de Investigación del Hospital Universitario de Canarias, La Laguna, Tenerife), por su contribución en el análisis estadístico. Este trabajo ha sido financiado en parte por una beca FIS (PI030345) y una beca de investigación FEHH (Fundación Española de Hematología y Hemoterapia).

TYPE I AND II BLASTS AND PROMYELOCYTES: MORPHOLOGIC CRITERIA. MATERIAL, METHODS AND RESULTS OF THE INTEROBSERVER STUDY






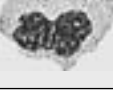
J.E. GOASGUEN, M.T. VALLESPI; ON BEHALF OF THE INTERNATIONAL WORKING GROUP ON MDS (IWG ON MDS)

For many years classification of the myelodysplastic syndromes (MDS) and acute leukemias were mainly based on blast identification and enumeration. The FAB classification (1976) provided criteria for blast recognition. These criteria were not modified in the WHO classification (2001) although the percentage of blasts required for a diagnosis of AML was lowered to 20% and RAEB was divided in two groups (5 to 9 and 10 to 19% blasts). It is not clear that the blast definition has been applied similarly throughout the world and this could have a major impact on how individual cases are classified, and might produced differences when comparing results of therapeutic protocols. For these reasons, morphologic criteria for blast definition might need revision or a more precise definition to achieve uniformity.

Definition

Experts in morphology from the IWG on MDS proposed that “Blast” (B) should include undifferentiated blasts (without granulation) and immature cells with granules but without other characteristics of a promyelocyte. A promyelocyte (PMC) is recognised by a “clearly visible Golgi zone”, a lower nucleocytoplasmic ratio and an acentric nucleus. It is acknowledged that a “Golgi zone” may be observed in blast cells having no other features of promyelocytes (mainly absence of granules) – that will not be included in PMC- and that some dysplastic promyelocytes have few or no granules (but have the features of promyelocytes). Maturing cells of granulocyte lineage (M) are recognised by

Figure 1

	Example	Subtype
A = Agranular		Agranular blast with basophilic cytoplasm fine chromatin and nucleoli
G = granular		A subtype but with azurophilic granulations and absence of Golgi zone
P = promyelocyte		Blastic cell with azurophilic granulations and a clear visible Golgi zone
AP = abnormal promyelocyte		P subtype but with irregular distribution of granulations
M = mature cells		All mature cells which do not have basophilic cytoplasm
AM = abnormal mature cells		M subtype but with still some azurophilic granulations or abnormal segmentation of nucleolus

the disappearance of cytoplasmic basophilia, disappearance of primary (azurophilic) granulations, and a more mature nucleus (Figure 1).

Methodology

Experts were trained by observation of bone marrow smears from AML or MDS using video-observation in a conference room. Then, to verify agreement and reproducibility between experts on these new definitions, a unique digital picture was produced from the bone marrow smear of a case of AML by the association of 150 consecutive native pictures (600 × 800 pixels). The mosaic picture is 8340 × 2386 pixels (about 30 M in jpeg format or 16 M in pdf). All the 265 nucleated cells were numbered and choice boxes with drop down menu were provided. The picture was located on the server of the MDS Foundation (<http://www.mds-foundation.org/goasguenfollowup>) and after evaluation, the results were sent automatically to the MDS Foundation center and registered. The five experts produced their evaluation on exactly the same cells (numbered from 1 to 265) and results were submitted for statistical analysis. If the definitions are sufficiently clear and understandable, a high concordance rate would be expected.

Results

174 cells (65.9%) fit for 5/5 concordances and 61 others (23.1%) for 4/5 concordances. If we consider that at least 4/5 concordances are required, we obtained 89% of correlation between experts. Moreover, 22 cells (8.3%) had 3/5 concordances and 7 (2.7%) had only 2/5.

Concordance	5/5	4/5	3/5	2/5
Cells	174	61	22	7
%	65.9	23.1	8.3	2.7
≥ 4/5		89%		

Moreover all experts would have produced an identical diagnosis since standard deviations are very narrow as demonstrated in the following table:

Table: Minimum, maximum and mean percentage of cells for 5 experts

	Mini	Maxi	Mean	Standard Deviation
Blasts	57.5	61.7	59.8	1.73
Promyelocytes	13.3	22.3	17.6	4.75
Matures	14.4	21.6	18.3	2.87

We conclude that the new blast and promyelocyte definitions will help to standardise classification.

Conclusion

With this new methodology using large field digital pictures where all experts had to identify exactly the same cells, we were able to refine definitions for blast cells and promyelocytes. We recommend that cells with granules and a clearly visible Golgi zone be recognised as promyelocyte but that granular cells without a Golgi zone and with other features of blasts should be regarded as blasts.

References

1. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C; The French-American-British (FAB) Co-operative Group. Proposals for the classification of myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1982; 51: 189-99.
2. Goasguen JE, Bennett JM, Cox C, Hambley H, Mufti G, Flandrin G. Prognostic implication and characterization of the blast cell population in the myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 1991; 15 (12): 1159-65.