



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES
DE LOS TRABAJADORES DEL ESTADO
CENTRO MEDICO NACIONAL "20 DE NOVIEMBRE"**

**VALOR PRONÓSTICO PREDICTIVO DE LA
"LOCALIZACIÓN ANORMAL DE PRECURSORES
INMADUROS", EN BIOPSIAS DE MÉDULA ÓSEA DE
PACIENTES CON SÍNDROME MIELODISPLÁSICO EN
RELACIÓN CON SU EVOLUCIÓN A LEUCEMIA AGUDA.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN ANATOMÍA PATOLÓGICA**

P R E S E N T A:

DRA. CLAUDIA ALVIRDE CASTAÑEDA

ASESOR:

DR. AURELIANO MAURICIO PLÁCIDO MÉNDEZ

CIUDAD DE MEXICO, 2022

REGISTRO 298.2021





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AUTORIZACIONES

VALOR PRONÓSTICO PREDICTIVO DE LA “LOCALIZACIÓN ANORMAL DE PRECURSORES INMADUROS”, EN BIOPSIAS DE MÉDULA ÓSEA DE PACIENTES CON SÍNDROME MIELODISPLÁSICO EN RELACIÓN CON SU EVOLUCIÓN A LEUCEMIA AGUDA.

DR. FÉLIX OCTAVIO MARTÍNEZ ALCALÁ
SUBDIRECTOR DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN
CENTRO MÉDICO NACIONAL “20 DE NOVIEMBRE” ISSSTE

DR. PAUL MONDRAGÓN TERÁN
COORDINADOR DE INVESTIGACIÓN
CENTRO MÉDICO NACIONAL “20 DE NOVIEMBRE” ISSSTE

DR. AURELIANO MAURICIO PLÁCIDO MÉNDEZ
PROFESOR TITULAR DE LA ESPECIALIDAD ANATOMÍA PATOLÓGICA
Y ASESOR DE TESIS
CENTRO MÉDICO NACIONAL “20 DE NOVIEMBRE” ISSSTE

DRA. CLAUDIA ALVIRDE CASTAÑEDA
MÉDICO RESIDENTE DEL CURSO DE ESPECIALIDAD EN ANATOMÍA PATOLÓGICA
CENTRO MÉDICO NACIONAL “20 DE NOVIEMBRE” ISSSTE

REGISTRO 298.2021

AGRADECIMIENTOS

A la madre naturaleza por la vida y la energía.

A mi mamá por ser mi ejemplo de trabajo y superación profesional.

A mi papá por siempre creer en mi y apoyarme sin condiciones.

A Bran por el gran amor, motivación diaria y fortaleza incansable.

A Renata y Dafne por elegirme y confiar en mí, deben saber que todos los sueños pueden ser realidad.

A Viole y Ángel por ser mis compañeras de vida.

A mis maestros por las lecciones aprendidas y las pendientes.

RESUMEN

Los Síndromes mielodisplásicos (SMD) son un conjunto de enfermedades con citopenias en sangre periférica debido al acúmulo de mutaciones a nivel de células madre hematopoyéticas. El incremento de precursores mieloides es gradual o abrupto, en el último caso la transformación desde SMD hacia Leucemia mieloide aguda es inminente reduciendo de forma importante el tiempo de supervivencia del paciente.

La "Localización Anormal de precursores mieloides inmaduros" (LAPI) es un hallazgo morfológico que de acuerdo a distintos reportes ha demostrado ser de utilidad en el momento de la categorización de estas enfermedades.

En el presente trabajo realizamos de forma retrospectiva el análisis morfológico de biopsias de médula ósea de pacientes con diagnóstico de SMD para definir la presencia o ausencia de precursores mieloides con localización anormal y su evolución clínica, la finalidad es obtener la relación de este parámetro con la transformación leucémica y así poder determinar su valor pronóstico predictivo.

Nuestros resultados sugieren; que el hallazgo de LAPI en biopsias de médula ósea de pacientes con SMD muestran un buen valor pronóstico predictivo hacia el desarrollo de la complicación por LMA.

La observación de LAPI debe sugerir la realización del panel de Inmunohistoquímica correspondiente para confirmar su fenotipo con lo que se establece como auxiliar en la toma de decisiones terapéuticas oportunas en pacientes con SMD.

Palabras clave: Síndrome mielodisplásico, leucemia, pronóstico, precursores inmaduros.

Abreviaturas:

SMD: Síndrome mielodisplásico.

LMA: Leucemia mieloide aguda

LAPI: Localización anormal de precursores inmaduros

H-E: Hematoxilina Eosina

MO: Médula ósea

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	6
ANTECEDENTES.....	7
Clasificación y categorización de los SMD.....	7
Diagnóstico de SMD.....	9
Histopatología de la médula ósea en SMD.....	9
Terapia adaptada al riesgo.....	13
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
JUSTIFICACIÓN.....	15
HIPÓTESIS.....	16
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	16
RESULTADOS.....	18
CONCLUSIONES.....	27
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

INTRODUCCIÓN

Los Síndromes mielodisplásicos (SMD) son enfermedades donde el denominador común es la hematopoyesis ineficaz con citopenias en médula ósea y sangre periférica que causan gran parte de los síntomas. Debido al acúmulo de mutaciones el incremento de precursores mieloides es gradual o abrupto, en el último caso la transformación desde Síndrome mielodisplásico hacia Leucemia mieloide aguda (LMA) es inminente reduciendo de forma importante el tiempo y calidad de supervivencia del paciente.

Con base en el grupo de trabajo internacional para el estudio de los Síndromes mielodisplásicos, donde se establecen escalas para determinar el riesgo y pronóstico, se dividen en alto y bajo riesgo en relación con su progresión a Leucemia Mieloide Aguda, donde se ha observado que en el grupo de pacientes de bajo riesgo tienen una supervivencia global mayor a 30 meses y el tiempo para la transformación a leucemia aguda se reduce paulatinamente, en contraparte para el grupo de alto riesgo la supervivencia es menor a 30 meses observándose un riesgo de transformación leucémica inminente dentro de este periodo. Para cada grupo de riesgo existe una terapéutica distinta, especializada y específica, con la finalidad de incrementar la supervivencia y la calidad de la evolución clínica.

El término “ Localización Anormal de precursores mieloides inmaduros (LAPI) ” es un hallazgo morfológico que de acuerdo a distintos reportes ha demostrado ser de utilidad en el momento de la clasificación en escalas de riesgo para pacientes con SMD, este hallazgo es mayormente observado en el grupo de pacientes de alto riesgo y se evalúa como apoyo predictivo morfológico cuyo valor no se encuentra estandarizado en la evaluación rutinaria de pacientes con SMD.

En el presente trabajo realizamos de forma retrospectiva el análisis morfológico de biopsias de médula ósea de pacientes con diagnóstico de SMD para definir la presencia o ausencia de precursores mieloides con localización anormal, la finalidad es obtener la relación de este parámetro con su transformación leucémica y así poder determinar el valor pronóstico predictivo así como determinar su utilidad como auxiliar en la clasificación de alto o bajo riesgo en estos pacientes.

ANTECEDENTES

Los Síndromes Mielodisplásicos (SMD) son un grupo heterogéneo de Neoplasias Mieloides de etiología y evolución clínica distintas. Se presentan frecuentemente en paciente de más de 60 años y relacionados a múltiples enfermedades, medicamentos, post exposición a quimioterapia o radioterapia. En la población infantil se asocian mayormente con alteraciones genéticas.

Estos trastornos surgen a partir de la proliferación clonal de células madre hematopoyéticas con descendencia neoplásica tendiente a una o más líneas de maduración, esto produce displasia morfológica y hematopoyesis ineficaz con citopenias uni o multilíneas. La mayoría de los pacientes debutan con anemia macrocítica o normocítica y trombocitopenia que producen complicaciones crecientes al paso del tiempo de evolución, pero sin duda el mayor impacto clínico es el riesgo de transición a Leucemia Mieloide Aguda (LMA) derivado del aumento gradual de mieloblastos en la médula ósea a causa del acúmulo de mutaciones.

Clasificación y categorización de los SMD

Los SMD se agrupan para su estudio y tratamiento de acuerdo a la clasificación de la Organización Mundial de la Salud para tumores de tejidos hematopoyéticos y linfoides. La segunda edición se publicó en 2001, incorporando bases de la información genética, la tercera edición en 2008 adicionó datos más específicos sobre mutaciones genéticas¹. Fue en la cuarta clasificación de la OMS de 2016, donde se unificaron criterios, se organizó la nomenclatura, se describieron los métodos de conteo para la citopenia, los porcentajes de células blásticas. Se reconoció como base diagnóstica, el grado de displasia en médula ósea, el porcentaje de blastos en la circulación periférica o en médula ósea y las citopenias específicas.^{2,3} Por tanto, el término SMD se usa como el nombre unificado de la enfermedad seguido del número de líneas displásicas (displasia de uni o multilíneas), la presencia de sideroblastos de anillo y el grado de aumento de blastos. Los nombres relacionados al curso clínico, por ejemplo citopenia refractaria, se han evitado para no causar confusión clínica.

Sin embargo se debe considerar que los límites diagnósticos entre los diferentes subgrupos pueden ser arbitrarios y no necesariamente corresponderán con el impacto clínico inmediato, los parámetros cuantificables pueden variar a medida que avanza la enfermedad y por lo tanto los pacientes pueden presentar características que no son consistentes con una sola categoría de diagnóstico.⁴

Ya que los SMD se describen como un espectro de trastornos dinámicos en los que la evolución clonal identificada a nivel citogenético, molecular y morfológico puede desencadenar la progresión, por tanto, el tiempo de esta progresión a LMA es diferente en cada caso.⁵ El pronóstico y supervivencia puede estimarse mediante las escalas de categorización basadas en el riesgo de transformación a LMA, que generalmente se realiza en el momento del diagnóstico.⁶ La clasificación de riesgo citogenético de acuerdo al sistema de puntuación y pronóstico internacional, considera 5 subgrupos que incluyen 20 alteraciones citogenéticas diferentes en total, de esta manera se han dividido en grupos de bajo y alto riesgo de acuerdo con su frecuencia de transformación leucémica. Es debido tomar en cuenta que los patrones citogenéticos no son estables y una parte importante de los pacientes adquiere progresivamente cambios citogenéticos adicionales que se asocian con un mayor riesgo de transformación a Leucemia Mieloide Aguda.⁷

De forma generalizada se puede establecer que los SMD de bajo riesgo comprenden aquellos con displasia de un solo linaje, y los SMD con displasia multilínaje, de alto riesgo son los que presentan exceso de blastos. Los MDS de alto riesgo comprenden dos tipos y se subclasifican en SMD-EB1 si el porcentaje de blastos es $\geq 2\%$ en la sangre periférica o $\geq 5\%$ en la médula ósea y en SMD-EB2 con blastos entre 3 a 10% en la sangre periférica, menos de 20% en la médula ósea, o presencia de cuerpos de Auer. Se diagnostica LMA si los blastos representan $\geq 20\%$ de las células de la médula ósea.⁸

En un estudio retrospectivo multicéntrico donde describen los cambios en el riesgo a lo largo de la evolución de la enfermedad, en busca de estandarizar las puntuaciones pronósticas basales y sus posibles implicaciones clínicas; se estudiaron 7212 pacientes con SMD no tratados, de 19 bases de datos institucionales que comprenden el Grupo de Trabajo Internacional para el Pronóstico en SMD. Se encontraron cambios significativos dependientes del tiempo en el riesgo tanto de supervivencia general como de transformación leucémica. Para los pacientes de mayor riesgo, la mortalidad disminuyó drásticamente a mayor tiempo desde el diagnóstico, mientras que para los pacientes de menor riesgo, la mortalidad permaneció sin cambios durante el seguimiento. En relación a la transformación leucémica se encontró que dicho evento ocurre más temprano en los pacientes de alto riesgo con respecto al diagnóstico y se relaciona directamente al porcentaje de blastos en la médula ósea por lo que se afirma que este último es el predictor individual más fuerte.⁹

Las guías internacionales para el diagnóstico y tratamiento de SMD, han sugerido un periodo de 30 meses como máxima supervivencia global en el grupo de alto, si el tiempo de supervivencia es mayor a este intervalo entonces se podría establecer en el subgrupo de el bajo

riesgo.¹⁰ En conclusión es posible sugerir que la presencia de grupos de precursores inmaduros en la médula ósea mantiene una relación estrecha con el riesgo de presentación leucémica, que en el caso de SMD de alto riesgo tendrá que presentarse dentro de los primeros 30 meses posterior al diagnóstico, factor importante para la correlación clínico-morfológica retrospectiva.

Diagnóstico de SMD

El diagnóstico de SMD se establece con la evidencia de citopenias, displasia de una o más líneas hematopoyéticas y la prueba de clonalidad. En relación a la evidencia morfológica de displasia, tanto el aspirado de médula ósea como la biopsia son esenciales, ambas ofrecen pistas de diagnóstico complementarias entre sí. La biopsia de médula ósea, facilita la evaluación de la celularidad, cambios intersticiales como fibrosis y provee información de apoyo en criterios de displasia. La utilidad de su evaluación se vuelve primordial en SMD hipoplásicos, tiene utilidad en la eliminación de la patología reactiva y es un medio para la Inmunohistoquímica y genética molecular.¹¹

La prueba de clonalidad puede ser morfológica y corresponde al exceso de blastos o precursores inmaduros mieloides, pero también es sustentable con las pruebas citogenéticas o moleculares.

Es necesario aclarar que la información obtenida del cariotipo, la citometría de flujo o la genética molecular es solo complementaria al diagnóstico morfológico y de utilidad para la subclasificación. Hablando de la citometría de flujo, esta identifica patrones fenotípicos anormales y puede ser de ayuda en la detección de casos con displasia mínima. Dado la heterogeneidad de las alteraciones citogenéticas en MDS, no hay evidencia de que un panel de sondas para estudio molecular pueda reemplazar el estudio citogenético como se ha propuesto en algunos trabajos. Por lo tanto el estudio molecular como la citometría de flujo no deben considerarse parte de la evaluación de rutina del paciente con MDS y solo deben usarse en situaciones específicas.¹²

Histopatología de médula ósea en SMD

Celularidad

La celularidad de la médula ósea es un factor importante para establecer el diagnóstico de SMD, es a menudo más alta que el nivel esperado como resultado de la hematopoyesis ineficaz,¹³ La hipocelularidad corresponde aproximadamente a 10% de los casos y es más frecuente en SMD pediátricos, sobre todo después de anemia aplásica.

Al evaluar la celularidad, se toma en cuenta el porcentaje de área de células nucleadas en relación con el tejido adiposo. El tejido adiposo aumenta con la edad y disminuye el área ocupada por células hematopoyéticas. Como guía, la edad en años relacionado al porcentaje se ha utilizado para calcular la celularidad aproximada de la médula ósea. A la edad de setenta o más años, la hipocelularidad es menor al 20% del tejido hematopoyético en relación al tejido adiposo adyacente. Otra forma de evaluar la celularidad es de acuerdo a las pautas del consenso europeo donde Hipercelularidad se define cuando las células hematopoyéticas ocupan más del 50% de los espacios intertrabeculares, normocelularidad del 30–50% e hipocelularidad <30%.

Arquitectura y Localización anormal de precursores inmaduros.

Las tres líneas hematopoyéticas (eritroide, mieloide, y megacariocítica) se analizan por separado. En condiciones no patológicas, la serie eritroide forma islotes eritroblásticos en el área intertrabecular donde el centro está ocupado por macrófagos cuya función es fagocitar núcleos expulsados antes del ingreso a la circulación. Los megacariocitos se ubican próximos al seno venoso. Los granulocitos inmaduros se encuentran en el área paratrabecular y posteriormente tras la maduración migran al área intertrabecular.

La médula ósea normoplásica o hiperplásica muestra un patrón difuso con pérdida de la arquitectura; Generalmente los mieloblastos se localizan de forma anormal en el área intertrabecular formando grupos, más de tres grupos de cinco o más mieloblastos o promielocitos representan un hallazgo patológico denominado “**Localización anormal de precursores inmaduros**”(LAPI por sus siglas en inglés) (Fig 1). Entendiéndose como mieloblastos a células grandes con citoplasma escaso, cromatina fina y nucleolos evidentes que se encuentran en el proceso de síntesis protéica elevada y promielocitos son células intermedias de tamaño con diferenciación neutrofílica en fases iniciales, núcleo orientado hacia una dirección y nucleolos ocasionalmente perceptibles. LAPI es relativamente fácil de encontrar en SMD con exeso de blastos, pero también se puede observar incluso en SMD con contéo de blastos <5%. La formación de islotes eritroblásticos es baja en SMD, y es menor en SMD de alto riesgo.

Muchos estudios han investigado el papel de la localización anormal de precursores inmaduros (LAPI) en pacientes con SMD (estudiados por primera vez por Tricot et al. en 1984). LAPI se encuentra con mayor frecuencia en SMD de alto riesgo y se ha encontrado que indica una corta supervivencia y mayor riesgo de transformación leucémica aguda ya que demuestran el incremento en las mutaciones . En el estudio realizado por *Xiong B, et al* se analizaron las características histomorfológicas de la médula ósea y se confirmó que su presencia tiene un

valor pronóstico importante en pacientes con SMD en conjunto con los índices y sistemas aplicados actualmente. En este estudio su presentación fué prominente en 123 de 187 casos estudiados y mostró un elevado impacto pronóstico tanto en la supervivencia como transformación leucémica aguda. ¹⁴

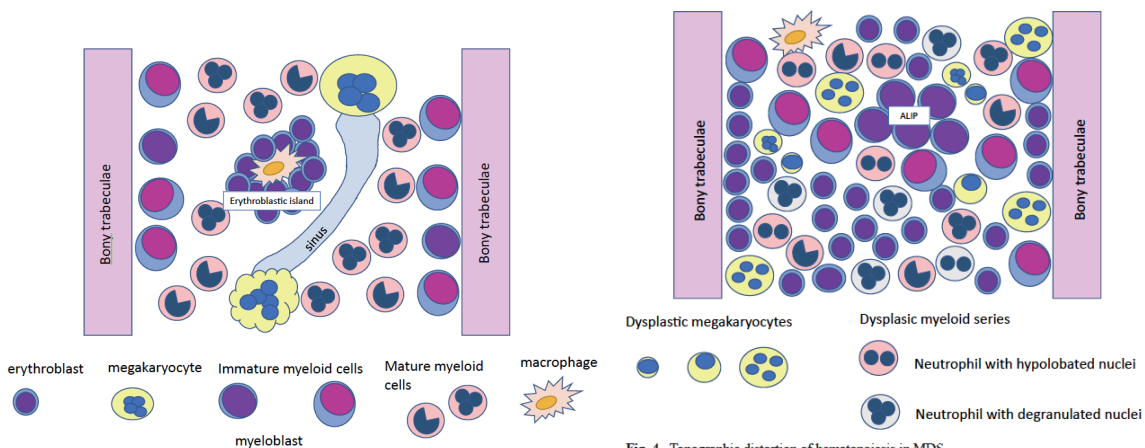


Fig. 3. Schematic illustration of normal bone marrow
Note paratrabecular granulopoiesis, intertrabecular erythroblastic island, and parasinusoidal megakaryocytes.

Fig. 4. Topographic distortion of hematopoiesis in MDS
In MDS, the precursors of the three cell lineages dispersed in all marrow regions in the bone marrow. ALIP, abnormal localization of immature precursors within the intertrabecular space.

Fig 1, Representación esquemática de MO normal y LAPI .¹⁵

Displasia

El término "displasia" se deriva del griego que significa "malformación". En patología diagnóstica, se usa para describir la morfología celular anormal que se visualiza mediante microscopía de luz, al aplicar el término a células mieloides (precursores de granulocitos, eritrocitos y plaquetas) se usa el término "mielodisplasia". ¹⁶

Las primeras descripciones de mielodisplasia fueron establecidas por el grupo cooperativo franco-estadounidense-británico (FAB) en 1982.¹⁷ Sin embargo, no fue hasta la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2001 que se introdujo la cuantificación de las células displásicas para tener en cuenta la presencia de células anormales ocasionales incluso en las médulas normales, este grupo indicó que al menos el 10% de las células en cualquiera de los tres linajes mieloides deben ser displásicos para cumplir con este criterio. Este umbral ha persistido en las actualizaciones posteriores de la OMS y en los criterios de diagnóstico desarrollados por la conferencia de Viena en 2006.¹⁸ Dónde se establecieron dos criterios necesarios para el diagnóstico; la presencia de citopenias y la ausencia de otros trastornos hematopoyéticos o no hematopoyéticos causantes de ellas. Los criterios decisivos como ya lo hemos mencionado fueron el aumento de blastos (5-19%) o la presencia de una anomalía citogenética típica.¹⁹

A la fecha se han intentado estandarizar los criterios diagnósticos morfológico para SMD en la evaluación de la displasia, reconociendo la variabilidad significativa entre observadores, lo cual se debe a la naturaleza subjetiva de la evaluación morfológica, pero también depende de la calidad de la muestra, un estudio mostró que cuando se excluyen las preparaciones de baja calidad, se reduce la variabilidad entre observadores.²⁰ Otros estudios han demostrado que la variabilidad entre observadores es baja en los subtipos de alto riesgo (con exceso de blastos) , pero existe un desacuerdo importante en el diagnóstico de SMD de menor grado.²¹

A pesar de que la evaluación morfológica de las células hematopoyéticas individuales no es fácil en los cortes de médula ósea, algunas características de displasia son identificables:

1. Línea megacariocítica: La displasia en esta línea es reconocible por la forma nuclear, se observan núcleos hipo segmentados en megacariocitos grandes y núcleos sin lobulación/ no segmentados en megacariocitos pequeños. En MDS con cromosópatía 3q26, la displasia megacariocítica es grave y el pronóstico es similar al de la LMA.^{22,23}

2. Línea neutrofílica y eosinofílica : Son observables los núcleos hipolobulados e hipogranulación de neutrófilos y eosinófilo maduros , aglomeración anormal de la cromatina, o bastones de Auer.²⁴

3. Línea eritroide: Se caracteriza por irregularidades nucleares a lo largo de la maduración de precursores; multinucleación, gemación nuclear, condensación anormal de cromatina, cariorrexis y la maduración asincrónica del núcleo y el citoplasma. Al incrementar los depósitos de hierro en MO se forman sideroblastos anillados o mejor llamados sideroblastos patológicos, estos son blastos eritroides con cinco o más gránulos de hierro al rededor del núcleo, comunmente se observan en preparaciones de frotis, pero también se puede ver en secciones de tejido.²⁵

La evaluación de la displasia de células sanguíneas debe realizarse con precaución ya que estas anomalías no son específicas de SMD, alteraciones como diseritropoyesis y dismegacariopoyesis pueden observarse en pacientes con infecciones virales tales como las causadas por VIH o B19, la anemia de Fanconi se relaciona con disgranulopoyesis al igual que en los pacientes con síndrome de Down. Sobre todo los SMD de bajo riesgo requieren diagnóstico diferencial al inicio del abordaje con citopenia y / o displasia debido a múltiples causas farmacológicas, metabólicas e infecciosas.²⁶

Inmunohistoquímica

Ningún anticuerpo conocido ofrece el diagnóstico específico para SMD, sin embargo algunos proporcionan información útil. CD34 es positivo en mieloblastos y endotelio vascular,

tiene utilidad especialmente cuando la médula ósea es hipoplásica, fibrótica o incluso si la calidad de los aspirados es insatisfactoria.²⁷

La acumulación multifocal anormal de células CD34 positivas frecuentemente detectadas en SMD de alto riesgo es una expresión visible de LAPI con buena utilidad diagnóstica. Además, la inmunotinción de CD34 es útil para evaluar la densidad de microvasos de la médula ósea, el cual podría ser un adecuado factor predictivo y pronóstico de la enfermedad, aunque debe tenerse en cuenta que CD34 es ocasionalmente positivo en megacariocitos y eritroblastos.²⁸

El inmunomarcador para detectar el linaje mieloide por predilección es mieloperoxidasa y para la línea monocítica son CD68 y CD117 (c-Kit). En médula ósea normal, los MGC representan el 1% de las células nucleadas, se observan aproximadamente en una relación de dos células por campo de alto aumento. Los MGC pequeños o micro megacariocitos generalmente no exceden el 10% de los MGC, pero no se reconocen fácilmente con H-E. Algunos marcadores útiles para su detección son CD61, CD42b y CD41.

Los marcadores eritroides incluyen hemoglobina, glicoforina, transportadores de glucosa (Glut-1), CD71 (receptor de transferrina-1) es el marcador líder para citometría de flujo²⁹. CD71 no es expresado en eritrocitos maduros, lo cual facilita la evaluación del patrón de distribución de eritroblastos. La E-cadherina es positiva en eritroblastos inmaduros grandes como los proeritroblastos y eritroblastos basofilos.³⁰

Claves morfológicas en SMD de alto riesgo

Además de la presencia de ALIP, son considerables otros factores para hacer una diferenciación morfológica entre SMD de alto y bajo riesgo. La fibrosis se observa de manera general en 10% a 15% de los pacientes y si es grado 2 o 3 es signo de mal pronóstico. En SMD con fibrosis son muy notables los megacariocitos displásicos y pleomórficos.³¹

Aproximadamente en el 15% de los pacientes con SMD presenta proliferación de eritroblastos superior al 50% de las células nucleadas. Aunque no figura como elemento de clasificación en la clasificación de la OMS, su evaluación histopatológica es esencial debido al mal pronóstico que surge de anomalías cromosómicas y TP53, las cuales son relevantes del tratamiento.³²

Terapia adaptada al riesgo

Identificar a los pacientes con SMD que se dirigen hacia la progresión leucémica es un desafío real, por lo que varios estudios han intentado estratificar el riesgo de los pacientes en función de su potencial leucémico en etapas tempranas de la enfermedad. Por ejemplo, Makishima et al. examinaron muestras de más de 2000 pacientes en busca de genes mutados

favorables para el desarrollo de SMD y LMA de mayor riesgo. Mutaciones en los genes NPM1 , IDH1 , IDH2 , WT1 ,NRAS , PTPN11 y FLT3 se encontraron significativamente en el grupo de LMA y fueron subclonales a una mutación más abundante, lo que sugiere que se adquirieron más tarde, y se asociaron con una supervivencia más corta. Estos pacientes albergan un trastorno de superposición entre SMD y LMA, de esta manera es que las terapias dirigidas a estos subclones (p. Ej., Inhibidores de IDH o FLT3) pueden retrasar la transformación leucémica. En la práctica clínica , los pacientes con SMD de alto riesgo y LMA de bajo recuento de blastos tienen un pronóstico similar y a menudo se tratan de la misma forma, con agentes hipometilantes o son candidatos para trasplante de células madre hematopoyéticas. ³³

En resumen, podemos observar las opciones y recomendaciones terapéuticas para subconjuntos específicos de pacientes que son dependientes directos de la clasificación de SMD en alto y bajo grado. Es así que los sistemas de puntuación de pronóstico adicionales incluyen sistemas para SMD hipocelular y para SMD relacionados con la terapia. ³⁴

Pacientes con enfermedad de bajo riesgo se tratan con factores de crecimiento (lenalidomida y azanucleósidos). Los pacientes con SMD de mayor riesgo tienen opción de trasplante o azanucleótidos, terapia similar a la utilizada en LMA . El pronóstico de pacientes que no cumplen cualquiera de estos enfoques es pobre y se ha evidenciado que la presencia de comorbilidades tiene un impacto independiente significativo sobre la supervivencia. ³⁵

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la práctica médica actual la evaluación histo morfológica de las biopsias de médula ósea como parte del protocolo diagnóstico de pacientes con sospecha o pacientes confirmados con SMD se limita a la evaluación de la celularidad, el grado de fibrosis y en el mejor de los casos los hallazgos de displasia por línea celular, sin embargo un parámetro de mayor valor pronóstico predictivo es la observación de células blásticas inmaduras de estirpe mieloide, el cual no es reportado de manera estandarizada, por tanto, la biopsia de médula ósea no ofrece un apoyo certero en la sub categorización de SMD de alto o bajo riesgo hacia la transformación leucémica.

En nuestro servicio no se cuentan con estudios que evalúen la localización anormal de precursores inmaduros en la médula ósea, por lo que no se cuentan con reportes que demuestren su utilidad como su valor pronóstico para la supervivencia o predictivo para la transformación leucémica.

JUSTIFICACIÓN

Dada complejidad en la observación y cuantificación de células blásticas precursoras mieloides con tinciones de rutina (Hematoxilina-Eosina), se han propuesto parámetros morfológicos-arquitecturales evaluables en biopsias de médula ósea, es el caso de la Localización anormal de precursores inmaduros, criterio no estandarizado en los reportes diagnósticos y que ha demostrado poseer un alto valor en la categorización clínica de los SMD.

La importancia de subclasificar los grupos de pacientes con SMD de alto y bajo riesgo hacia la transformación en leucemia mieloide aguda, radica en que el grupo de alto riesgo es beneficiado con terapia dirigida que prolonga la supervivencia global de los pacientes, en el grupo de bajo riesgo el objetivo es reducir la sintomatología y el número de transfusiones requeridas.

En el Centro Médico Nacional 20 de Noviembre es factible conocer el valor pronóstico para la supervivencia o predictivo para la transformación leucémica de la localización anormal de precursores inmaduros en la médula ósea de pacientes con SMD y de esta manera evaluar la reproducibilidad de este parámetro como apoyo en la categorización clínica y el enfoque terapéutico.

HIPÓTESIS

La presencia de precursores inmaduros de localización anormal en pacientes con SMD representa un buen valor pronóstico predictivo hacia la transformación leucémica aguda.

OBJETIVO GENERAL : Determinar el valor pronóstico predictivo de la localización anormal de precursores inmaduros en pacientes con SMD en relación con su evolución a leucémica mieloide aguda.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Evaluar la presencia de LAPI en cortes histológicos de biopsias de médula ósea para la categorización en SMD de alto y bajo riesgo.
2. Evaluar la displasia de células mieloides hematopoyéticas en cortes histológicos de biopsias de médula ósea en pacientes con SMD.
3. Evaluar la proliferación de eritroblastos en cortes histológicos de biopsias de médula ósea como auxiliar en la categorización de SMD de alto y bajo riesgo.

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

Diseño y tipo de estudio: Estudio trasversal, retrospectivo, observacional y descriptivo.

Población de estudio: Pacientes con diagnóstico de SMD y con biopsias de médula ósea valoradas en el servicio de Anatomía Patológica del CMN 20 de Noviembre desde 01 de Enero del 2018 y hasta 31 de Diciembre del 2018.

Universo de trabajo: Pacientes con diagnóstico de SMD en el CMN 20 de Noviembre.

Criterios de inclusión: Material histológico disponible en el servicio de Anatomía Patológica correspondiente a biopsias de médula ósea de pacientes con diagnóstico de SMD dentro del tiempo establecido.

Criterios de exclusión: Material histológico con mala conservación y que no pueda ser valorable.

Criterios de eliminación: Material histológico que no se encuentre disponible en el servicio de Anatomía Patológica.

Tamaño de la muestra: Se incluirán el 100% de las biopsias de médula ósea que cumplan con los criterios antes mencionados.

Operacionalización de Variables:

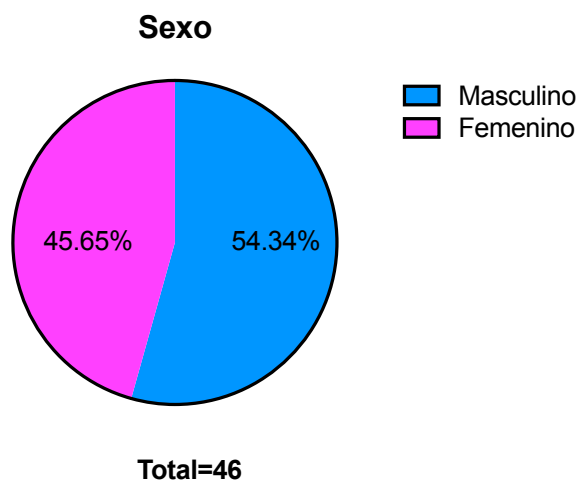
Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Escala de medición	Indicador
Localización anormal de precursores inmaduros (LAPI)	Más de tres grupos de cinco o más mieloblastos o promielocitos distribuidos en el área inter trabecular	Al menos tres agregados ubicados lejos de la superficie trabecular	Cualitativa	Positivo/ Negativo
Transformación leucémica	Tempo de evolución hasta LMA.	Tiempo entre el diagnóstico y la presentación de LMA.	Cuantitativa	Número de meses
Proliferación eritroblástica	Grupos de más de 20 eritroblastos en la misma etapa de maduración.	Al menos un grupo de 20 eritroblastos en la misma fase	Cualitativa	Positivo/ Negativo
Celularidad * (Consenso europeo)	Proliferación de células hematopoyéticas	Hiper celularidad (células que ocupan más del 50% de los espacios intertrabeculares), normocelularidad (30–50%) e hipocelularidad (<30%).	Cuantitativa	Hiper celular / normocelular /hipocelular.
Displasia Eritroide	Características displásicas en más del 10% de la línea eritroide.	Detección de: 1 Irregularidad nuclear, 2 condensación anormal de cromatina, 3 maduración asincrónica núcleo/citoplasma, 4 sideroblastos patológicos.	Cualitativa	Ausente/ Presente
Displasia megacariocítica	Características displásicas en más del 10%, Línea megacariocítica	1 Núcleos hipobulados en megacariocitos grandes y 2 núcleos no segmentados en megacariocitos pequeños.	Cualitativa	Ausente/ Presente
Displasia neutrofílica y eosinofílica	Características displásicas en más del 10 % de la línea neutrofílica y eosinofílica.	1 Núcleos hipobulados, 2 hipogranulación citoplásmica, 3 aglomeración anormal de la cromatina, 4 bastones de Auer.	Cualitativa	Ausente/ Presente

Aspectos de bioseguridad: Al tratarse de un protocolo de investigación con carácter retrospectivo donde las fuentes de datos son el expediente electrónico y la revisión de laminillas del archivo de patología, no existen elementos que interfieran con las normas de bioseguridad al no hacer uso de ningún material biológico.

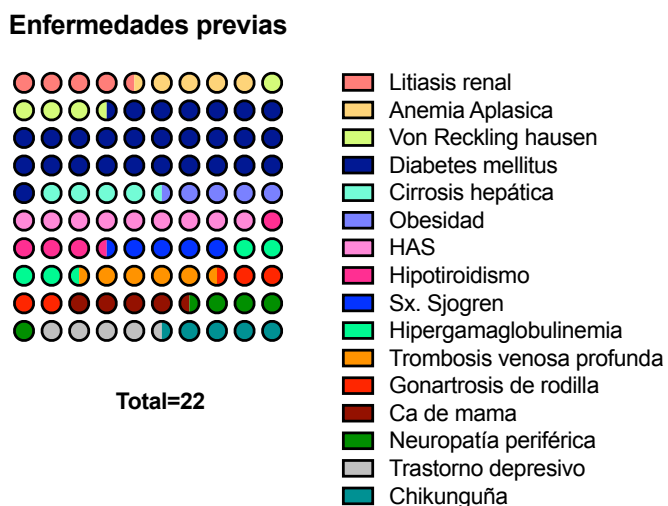
Conflicto de intereses: Los investigadores declaran que no presentan ningún conflicto de intereses.

RESULTADOS

1. Posterior a la búsqueda de pacientes con diagnóstico de SMD cuya biopsia de médula ósea fue revisada en el servicio de Anatomía Patológica; Se recabaron un total de 46 pacientes del periodo comprendido entre el 01 de enero del 2018 hasta 31 de diciembre del 2018, quienes tuvieron un promedio de edad de 49 años. Se encontró que fueron 25 (54.34%) masculinos y 21 (45.65%) femeninas (Figura 1). De estos, se eliminaron a cuatro pacientes debido a que en el momento del análisis ya no se encontraba el material histológico correspondiente de manera física.



2. Con base en datos del expediente electrónico institucional y al respecto de estos pacientes, recabamos información referente a las comorbilidades que presentaban al momento del diagnóstico del SMD (Figura 2).



De nuestra n inicial de 42, encontramos que 22 (52.38%) presentaron comorbilidades, siendo la más frecuente la diabetes mellitus que se presentó en 6 pacientes (27.27%), seguida de la hipertensión arterial sistémica con 2 pacientes (9.09%), el resto de las comorbilidades se presentaron en un paciente.

3. Análisis de las características histopatológicas de SMD

Al respecto, fueron divididas por línea de diferenciación hematopoyética en: displasia mieloide, displasia eritroide y displasia megacariocítica, de acuerdo a la propuesta de consenso del Grupo de trabajo internacional sobre morfología del síndrome mielodisplásico basado en Giagounidis Et Al. dónde se enumeran criterios específicos.

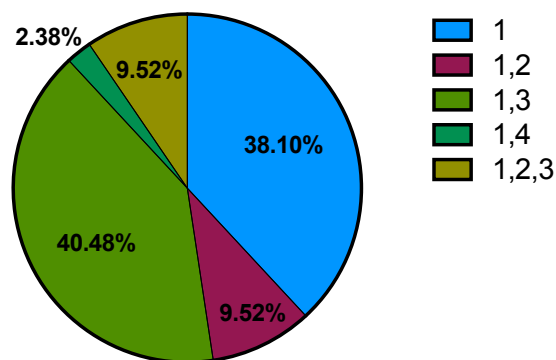
Displasia Mieloide:

Los núcleos hipolobulados representa el criterio de displasia mieloide prominente, observado en la totalidad de las biopsias analizadas, seguido de la aglomeración anormal de la cromatina caracterizada por áreas densas en forma de grumos alternando con áreas de cromatina dispersa. El resto de los criterios y su proporción se muestran en la tabla 1.

Ya que diferentes criterios de displasia coinciden en una sola biopsia, en la siguiente gráfica se encuentran representados el conjunto de combinaciones observadas para displasia mieloide, en relación con la tabla anterior.

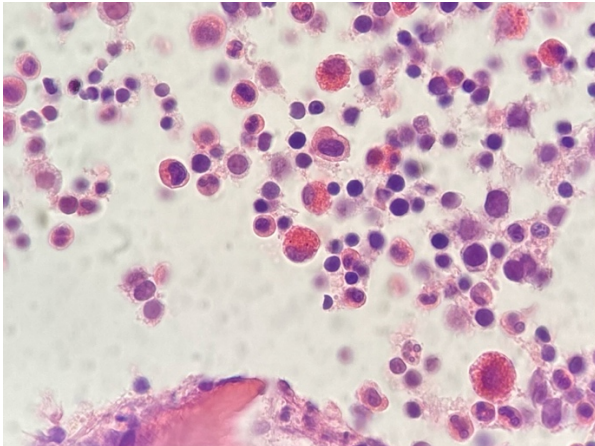
Tabla 1: Pacientes con criterios de Displasia Mieloide	
Criterios	# de pacientes (proporción)
1. Núcleos hipolobulados	42 (100%)
2. Hipogranulación citoplasmática	8 (19.04%)
3. Aglomeración anormal de la cromatina	21 (50%)
4. Aglomeración de mieloperoxidasa (Bastones de Auer).	1 (2.38%)

Combinaciones de hallazgos morfológicos de displasia mieloide

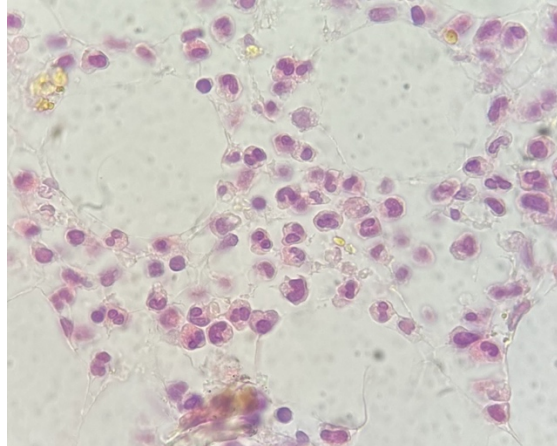


Total=42

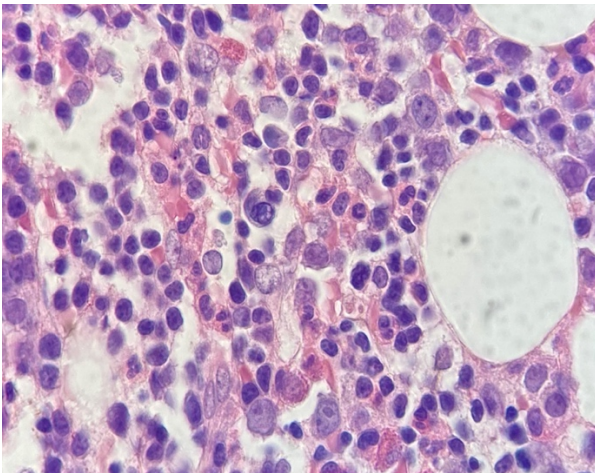
Núcleos hipolobulados



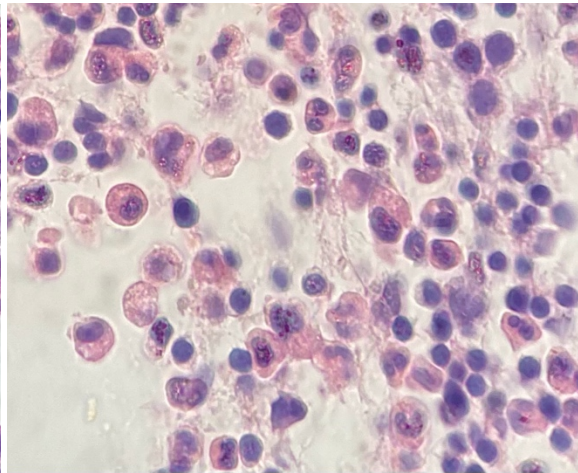
Hipogranulación citoplasmática



Aglomeración anormal de la cromatina.



Aglomeración de mieloperoxidasa (Bastones de Auer)

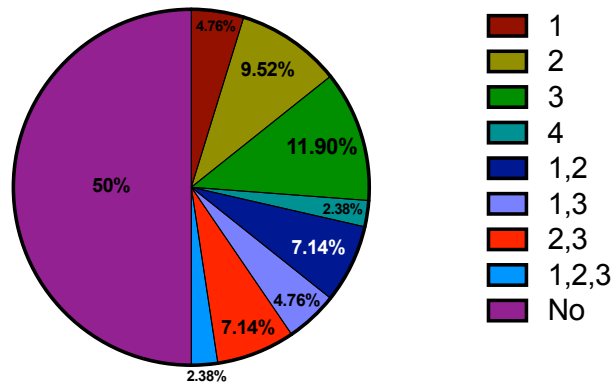


Displasia eritroide:

Con respecto a los hallazgos de displasia eritroide, se observa en el 50% de los pacientes, siendo la condensación anormal de la cromatina el criterio independiente más frecuente (26.19%) en las biopsias observadas.

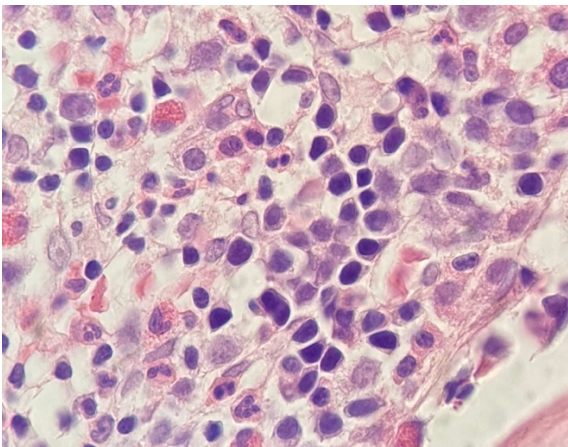
Tabla 2: Pacientes con criterios de Displasia Eritroide	
Criterios	# de pacientes (proporción)
1. Irregularidad nuclear	8 (19.94%)
2. Condensación anormal de la cromatina	11 (26.19%)
3. Maduración asincrónica núcleo/citoplasma	10 (23.80%)
4. Sideroblastos patológicos (anillados)	1 (2.38%)

Combinaciones de hallazgos morfológicos de displasia eritroide

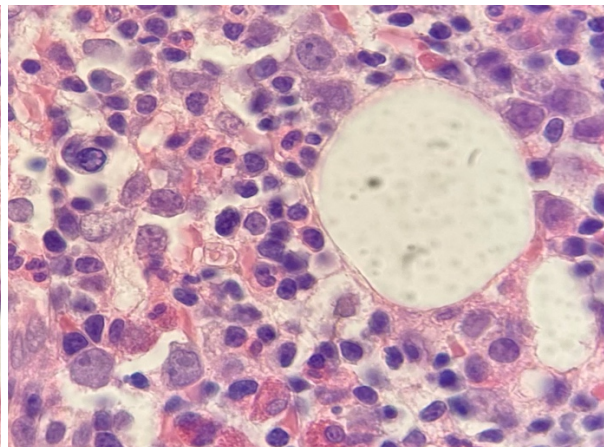


Total=42

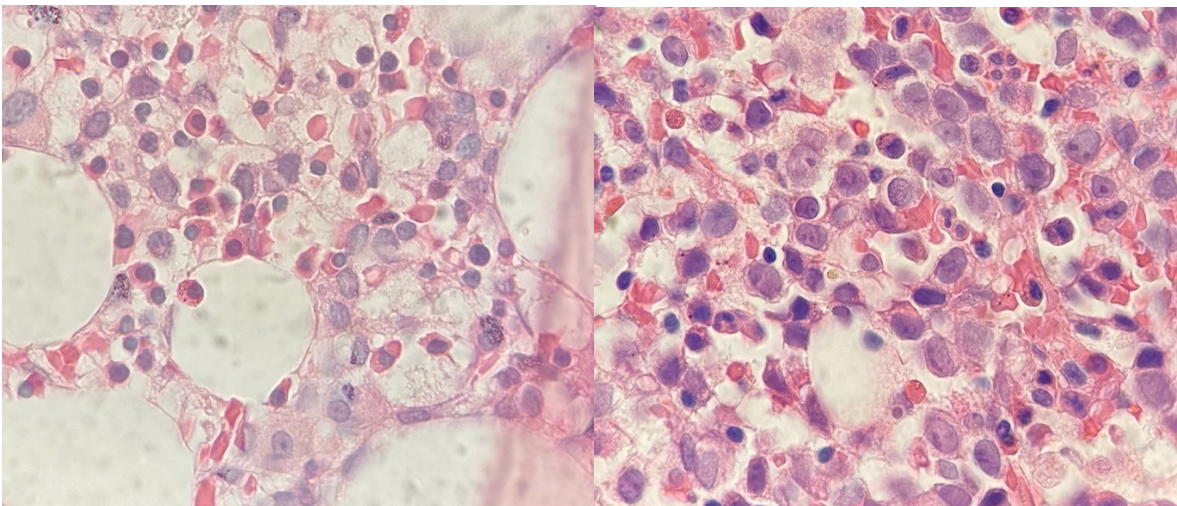
Irregularidad nuclear



Condensación anormal de la cromatina



Sideroblastos patológicos (anillados)

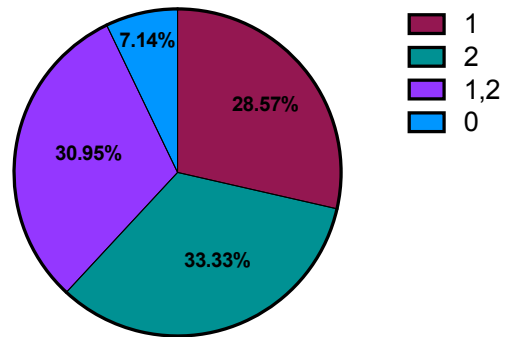


Displasia megacariocítica:

Ambos criterios de displasia megacariocítica se observaron en más de la mitad de las biopsias analizadas de manera individual y de forma combinada solo uno de los pacientes (7.14%) no presentaba displasia en esta línea. Tabla 3

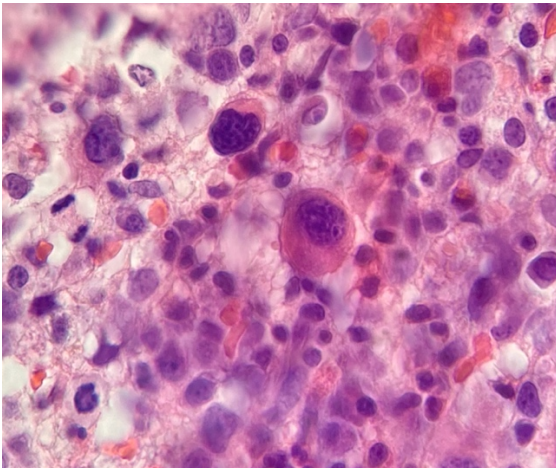
Tabla 3: Pacientes con criterios de Displasia megacariocítica	
Criterios	# de pacientes (proporción)
1. Núcleos hipolobulados en megacariocitos grandes	25 (59.52%)
2. Núcleos no segmentados en megacariocitos pequeños	27 (64.28%)

Combinaciones de hallazgos morfológicos de displasia megacariocítica

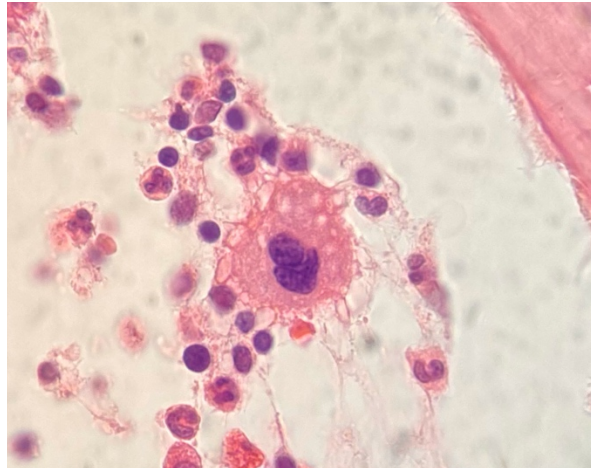


Total=42

Núcleos no segmentados en megacariocitos pequeños



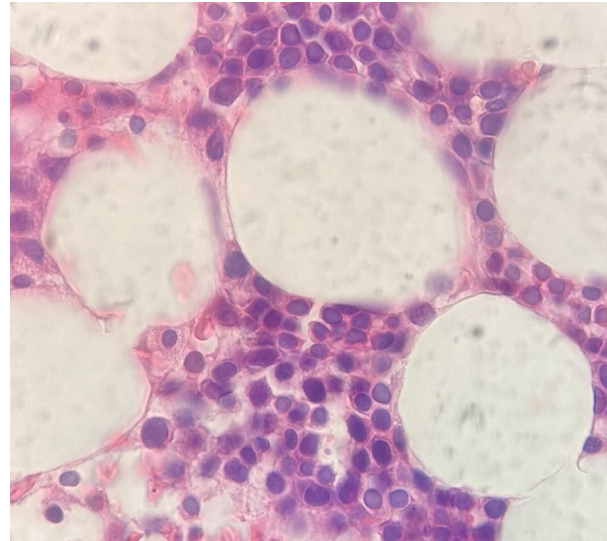
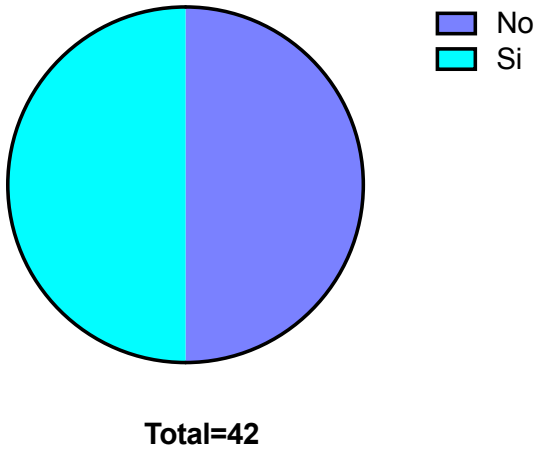
Núcleos hipolobulados en megacariocitos grandes



Proliferación eritroblástica:

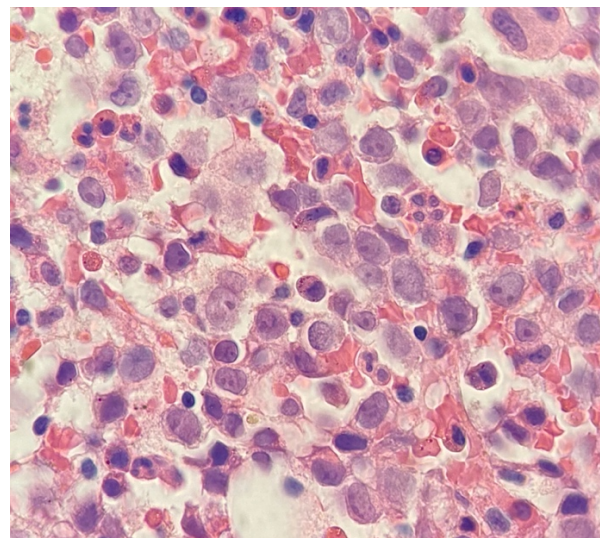
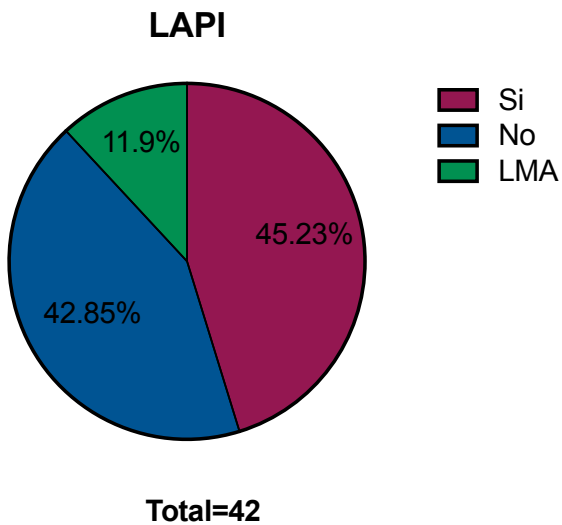
Se observó proliferación eritroblástica en la mitad de los pacientes, lo cual coincidía en gran medida con estimulantes de crecimiento de colonias eritroides que forman parte del tratamiento para reducir las citopenias.

Proliferación eritroblástica



5. Localización anormal de precursores inmaduros (LAPI)

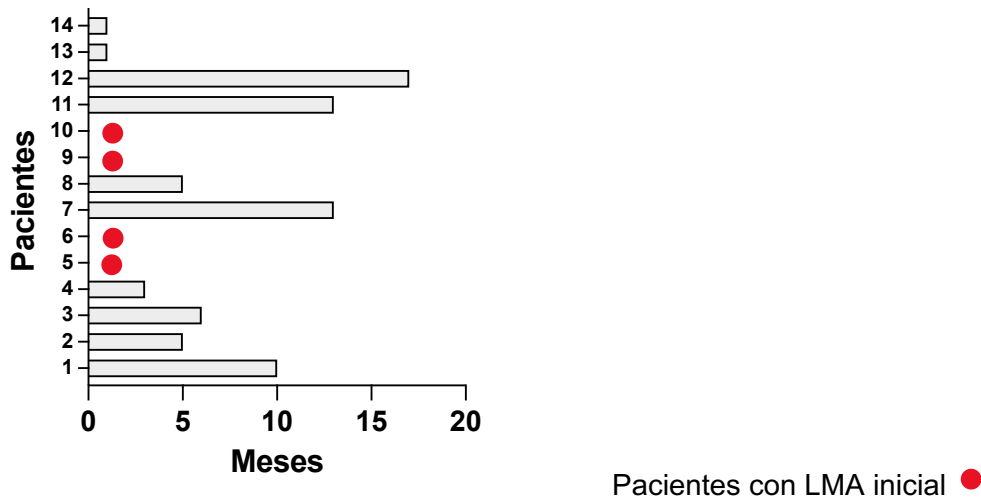
De nuestros 42 pacientes, 19 (45.23%) presentaron **Localización anormal de precursores inmaduros (LAPI)** en la biopsia de médula ósea, 18 (42.85%) pacientes no presentaron LAPI y 5 (11.9%) pacientes ya presentaban criterios para diagnóstico de **Leucemia mieloide aguda (LMA)**.



6. Transformación leucémica

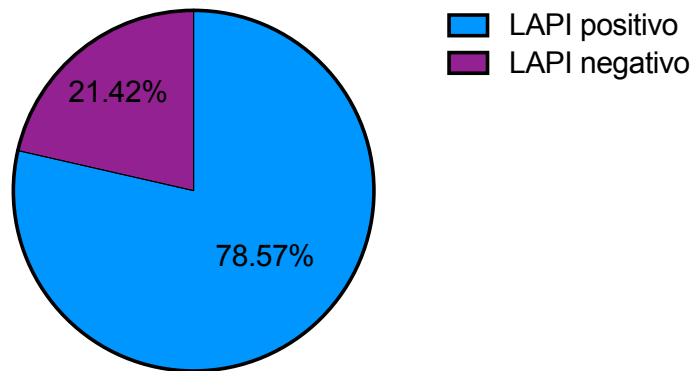
De los 42 pacientes que se consideraron en la población, 14 de ellos desarrollaron hasta la fecha LMA, esto de acuerdo con los datos individuales del expediente clínico . En la siguiente gráfica podemos observar el tiempo desde la toma de biopsia de médula ósea, hasta el diagnóstico de LMA para cada uno de estos pacientes:

Tiempo de transformación a leucemia mieloide aguda



De estos 14 pacientes en que hasta la fecha han desarrollado LMA, se observó que 11 (78.57%) de ellos presentan LAPI y 3 pacientes (21.42%) no presentaron.

Relación LMA y presencia de LAPI



Total=14

Análisis estadístico

Se desarrollaron intervalos para determinar la tasa de ocurrencia de sucesos, es decir la complicación con LMA y la tasa de supervivencia en ambos grupos de pacientes LAPI positivos y negativos.

Pacientes positivos a LAPI

Intervalo No.	Intervalo en días entre los sucesos (LMA)	No. De sucesos (LNA) al final del intervalo A	No. de pacientes libres de sucesos (vivos) inmediatam ente antes del intervalo B	Probabilidad de sobrevivir el intervalo C=1-(A/B)	Valor de la curva libre de sucesos (superviven cia) al final del intervalo D= D-precendente*C
0			18	1	1
1	0 a 1	1	17	0.94117647	0.941176471
2	2 a 8	1	16	0.9375	0.882352941
3	9 a 31	1	15	0.93333333	0.823529412
4	32 a 44	1	14	0.92857143	0.764705882
5	45 a 115	1	13	0.92307692	0.705882353
6	116 a 174	1	12	0.91666667	0.647058824
7	174 a 178	1	11	0.90909091	0.588235294
8	179 a 332	1	10	0.9	0.529411765
9	333 a 400	1	9	0.88888889	0.470588235
10	400 a 420	1	8	0.875	0.411764706
11	421 a 530	1	7	0.85714286	0.352941176

Tasa de pacientes sin LAPI que desarrollaron LMA	número de pacientes que desarrollaron LMA	11	0.57894737	por 100 habitantes (constante)
	número total de pacientes con LAPI	19		57.89473684

Tasa de ocurrencia para LMA **con** hallazgo de LAPI = 0.57. La interpretación es que, por cada 100 pacientes con síndrome mielodisplásico, y que sean positivos a LAPI, 58 podrían desarrollar LMA.

Pacientes negativos a LAPI

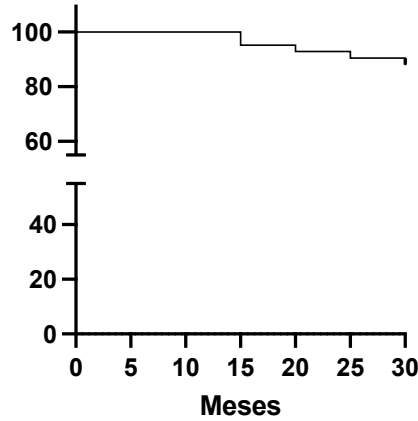
Intervalo No.	Intervalo en días entre los sucesos (LMA)	No. De sucesos (LNA) al final del intervalo A	No. de pacientes libres de sucesos (vivos) inmediatam ente antes del intervalo B	Probabilidad de sobrevivir el intervalo C=1-(A/B)	Valor de la curva libre de sucesos (superviven cia) al final del intervalo D= D-precendente*C
0	0			1.0000	1.0000
1	0 a 231	1	17	0.941176471	0.941176471

Tasa de pacientes sin LAPI que desarrollaron LMA	número de pacientes que desarrollaron LMA	1	0.055555556	por 100 habitantes (constante)
	número total de pacientes sin LAPI	18		5.55555556

Tasa de ocurrencia para LMA **sin** hallazgo de LAPI = 0.05. La interpretación es que por cada 100 pacientes con síndrome mielodisplásico, y que sean negativos a LAPI solo 5 desarrollarán LMA.

Por otro lado, hasta la escritura de la tesis, se encontró reportado en el expediente clínico que 5 de nuestros 42 pacientes iniciales han fallecido a causa de complicaciones por LMA.

Curva de Supervivencia

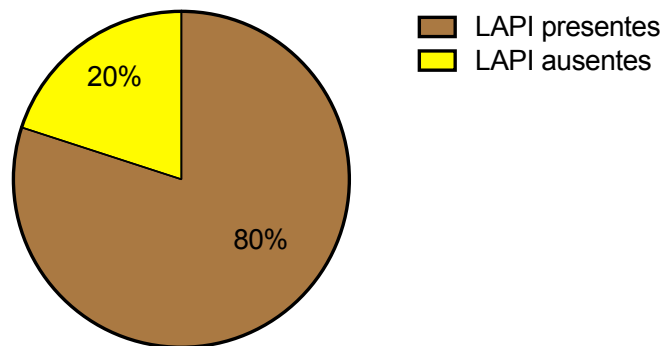


Con base en la curva de sobrevivida de Kaplan-Meier se estimó la probabilidad de sobrevivir al final de los 30 meses, tiempo considerado para catalogar SMD de bajo o alto riesgo:

Intervalo No.	Intervalo en meses entre los sucesos (muertes)	No. De sucesos (muertes) al final del intervalo A	No. de pacientes libres de sucesos (vivos) inmediatamente antes del intervalo B	Probabilidad de sobrevivir el intervalo $C=1-(A/B)$	Valor de la curva libre de sucesos (supervivencia) al final del intervalo $D= D\text{-precedente} * C$
0	0			1.0000	1.0000
1	0-15	2	40	0.9500	0.9500
2	15-20	1	39	0.9744	0.9256
3	20-25	1	38	0.9737	0.9013
4	25-30	1	37	0.9730	0.8769

De los cinco pacientes que han fallecido hasta el momento, cuatro de ellos presentaron LAPI, mientras que solo uno no presentó.

LAPI y Mortalidad



Total=5

CONCLUSIONES

El hallazgo de “Localización anormal de precursores inmaduros” (LAPI) en biopsias de médula ósea de pacientes con SMD, se observó en un porcentaje importante (45.23%) de los pacientes analizados. De los 42 pacientes que se consideraron en la población, 14 de ellos evolucionaron a LMA hasta la fecha de la escritura de la tesis y de este grupo el 11.9% de los pacientes presentaban criterios para diagnóstico de Leucemia mieloide aguda (LMA) inicial.

Nuestro análisis estadístico resulta con una tasa de ocurrencia para LMA de 0.57 en pacientes positivos a LAPI y se traduce en que 57 de cada 100 pacientes LAPI positivos pueden desarrollar LMA, sin embargo la tasa de ocurrencia para LMA en ausencia de LAPI es de 0.05, lo cual quiere decir que por cada 100 pacientes con síndrome mielodisplásico, y que sean negativos a LAPI solo 5 desarrollarán LMA.

De acuerdo con recomendaciones de las Guías internacionales para la estratificación del pronóstico de los SMD, se consideran de alto riesgo si la sobrevida global es menor a 30 meses y de bajo riesgo si no ocurre muerte en este intervalo; En nuestros resultados el 80% de los pacientes fallecidos compartían la característica de positividad para LAPI y con base en la curva de sobrevida de Kaplan-Meier dónde se estimó la probabilidad de sobrevivir al final de 30 meses, se concluye que LAPI tiene buen valor predictivo en relación a la mortalidad.

Estos primeros resultados sugieren; que el hallazgo de Localización Anormal de Precursores inmaduros en biopsias de médula ósea de pacientes con Síndrome Mielodisplásico muestran un buen valor pronóstico predictivo hacia el desarrollo de la complicación por LMA. Sí se define la observación positiva para LAPI idealmente debería encaminar la realización del panel de Inmunohistoquímica correspondiente para confirmar el fenotipo de los precursores mieloides inmaduros. De esta manera se puede establecer con certéza que LAPI es un auxiliar en la toma de decisiones terapéuticas oportunas y específicas en pacientes con SMD con el objetivo de incrementar la sobrevida global.

Sin embargo es necesario el desarrollo de otros estudios donde se genere un análisis con mayor cantidad de pacientes que amplíe y respalde los resultados presentados en este momento.

Referencias Bibliográficas

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, et al. Introduction and over view of the classification of myeloid neoplasms. In : Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J (eds). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th ed, Lyon, IARC. 2017; pp. 16-27.
2. Hasserjian RP, Orazi A, Brunning RD, et al. Myelodysplastic syndromes: Overview. In : Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J (eds). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th ed, Lyon, IARC. 2017; pp. 98-106.
3. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2391-405. doi: 10.1182/blood-2016-03-643544. Epub 2016 Apr 11. PMID: 27069254.
4. Tanaka, T. N., & Bejar, R. (2019). MDS overlap disorders and diagnostic boundaries. *Blood*, 133(10), 1086–1095. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-10-844670>
5. Ad'es L, Itzykson R, Fenaux P. Myelodysplastic syndromes. *Lancet*. 2014;383(9936):2239-2252..
6. Pfeilstöcker M. Prognostic Scoring in MDS. In: Varkonyi J, ed. *The Myelodysplastic Syndromes*. Dordrecht, The Netherlands: Springer; 2011: 103-120.
7. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised international forecast scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012; 120 (12): 2454 - 2465 .
8. Hasserjian RP, Head DR. Myelodysplastic syndromes. In : Jaffe ES, Arber DA, Campo E, Harris NL, Quintanilla-Martinez L (eds). *Hematopathology*. 2nd ed, Philadelphia, Elsevier. 2017; pp. 793-816.
9. Pfeilstöcker M, Tuechler H, Sanz G, et al. Time-dependent changes in mortality and transformation risk in MDS. *Blood*. 2016;128(7):902-910. doi:10.1182/blood-2016-02-700054
10. Guías Españolas para el diagnóstico de SMD y LMMC, Edición 2020.
11. Montalban-Bravo G. Myelodysplastic syndromes. 2018 update on diagnosis, risk stratification and management. *Am J Hematol*. 2018; 93 : 129-147.
12. Shaver, A. C., & Seegmiller, A. C. (2017). Nuances of Morphology in Myelodysplastic Diseases in the Age of Molecular Diagnostics. *Current hematologic malignancy reports*, 12(5), 448–454. <https://doi.org/10.1007/s11899-017-0405-y>
13. Schemenau J, Baldus S, Anlauf M, et al. Cellularity, characteristics of hematopoietic parameters and prognosis in myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol* 2015; 95: 181–9.
14. Xiong B, et al., Prognostic evaluation of ALIP and CD34 immunostaining in IPSS-R subgroups of myelodysplastic syndromes, *Pathology* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.pathol.2017.05.001>
15. Kayano H, Histopathology in the diagnosis of high-risk myelodysplastic syndromes, *Journal of clinical and experimental hematopathology* Vol. 58 No.2, 51-60, 2018
16. Dysplasia has a differential diagnosis: distinguishing genuine myelodysplastic syndromes (MDS) from mimics, imitators, copycats and impostors. *Curr Hematol Malig Rep*. 2012;7: 310–20. doi:10.1007/s11899-012-0140-3.
17. Bhasin TS, Sharma S, Manjari M, Mannan R, Kansal V, Chandey M, et al. Changes in megakaryocytes in cases of thrombocytopenia: Curr Hematol Malig Rep bone marrow aspiration and biopsy analysis. *J Clin Diagn Res*. 2013;7:473–9. doi:10.7860/JCDR/2013/5085.2801.
18. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnich HR, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 1982;51:189–99.
19. Valent P, Horny HP, Bennett JM, Fonatsch C, Germing U, Greenberg P, et al. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: consensus statements and report from a working conference. *Leuk Res*. 2007;31:727–36. doi:10.1016/j.leukres.2006.11.009.
20. Swart L, Smith A, MacKenzie M, Symeonidis A, Neukirchen J, Mikulendova D, et al. Cytomorphology review of 100 newly diagnosed lower-riskMDS patients in the European LeukemiaNetMDS (EUMDS) registry reveals a high inter-observer concordance. *Ann Hematol*. 2017;96:1105–12. doi:10.1007/s00277-017-3009-7.
21. Font P, Loscertales J, Soto C, Ricard P, Novas CM, Martin-Clavero E, et al. Inter-observer variance in myelodysplastic syndromes with less than 5% bone marrow blasts: unilineage vs. multilineage dysplasia and reproducibility of the threshold of 2% blasts. *Ann Hematol*. 2015; 94(4):565-73.
22. Goasguen JE, Bennet JM, Bain BJ, et al. Quality control initiative on the evaluation of the dysmegakaryopoiesis in myeloid neoplasms: Difficulties in the assessment of dysplasia. *Leuk Res*. 2016; 45 : 75-81.
23. Feng G, Gale RP, CuiW, CaiW, Huang G, Xu Z, et al. A systematic classification of megakaryocytic dysplasia and its impact on prognosis for patients with myelodysplastic syndromes. *Exp Hematol Oncol*. 2016;5:12–20. doi:10.1186/s40164-016-0041-6.

24. Goasguen JE, Bennett JM, Bain BJ, Brunning RD, Vallespi MT, Tomonaga M, et al. Proposal for refining the definition of dysgranulopoiesis in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Leuk Res.* 2014;38:447–53. doi:10.1016/j.leukres. 2013.12.020.
25. Kawai N, Matsuda A, Jinnai I, Ichimura T, Kayano H, Okamura D, et al. Proposal of criteria for dyserythropoiesis in the diagnosis of myelodysplastic syndromes. *Int J Hematol.* 2016;103:227–33. doi: 10.1007/s12185-015-1916-8.
26. Parmentier S, Schetelig J, Loenz K, et al. Assessment of dysplastic hematopoiesis: lessons from healthy bone marrow donors. *Haematologica.* 2012; 97 : 723-730.
27. Bennett JM, Orazi A. Diagnostic criteria to distinguish hypocellular acute myeloid leukemia from hypocellular myelodysplastic syndromes and aplastic anemia: recommendations for a standardized approach. *Haematologica.* 2009; 94 : 264-268.
28. Kim CK, Han DH, Ji YS, et al. Biomarkers of angiogenesis as prognostic factors in myelodysplastic syndrome patients treated with hypomethylation agents. *Leuk Res.* 2016; 50 : 21-28.
29. Rollins-Raval MA, Fuhrer K, Marafioti T, et al. ALDH, CA I, and CD2AP Novel, diagnostically useful Immunohistochemical markers to identify erythroid precursors in bone marrow biopsy specimens. *Am J Clin Pathol.* 2012; 137 : 30-38
30. Ohgami RS, Chisholm KM, Ma L, et al. E-cadherin is a specific marker for erythroid differentiation and has utility, in combination with CD117 and CD34, for enumerating myeloblasts in hematopoietic neoplasms. *Am J Clin Pathol.* 2014; 141 : 656-664.
31. Ramos F, Robledo C, Izquierdo-Garcia FM, et al. Bone marrow fibrosis in myelodysplastic syndromes: a prospective evaluation including mutational analysis. *Oncotarget.* 2016; 7 : 30492-30503.
32. Calvo X, Arenillas L, Luno E, et al. Erythroleukemia shares biological features and outcome with myelodysplastic syndromes with excess blasts: a rationale for its inclusion into future classifications of myelodysplastic syndromes. *Mod Pathol.* 2016; 29 : 1541-1551.
33. Tanaka, T. N., & Bejar, R. (2019). MDS overlap disorders and diagnostic boundaries. *Blood*, 133(10), 1086–1095. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-10-844670>
34. Zeidan AM, Al Ali N, Barnard J, et al. Comparison of clinical outcomes and prognostic utility of risk stratification tools in patients with therapy-related vs de novo myelodysplastic syndromes: a report on behalf of the MDS Clinical Research Consortium. *Leukemia.* 2017;31(6):1391–1397.
35. Daver N, Naqvi K, Jabbour E, et al. Impact of comorbidities by ACE-27 in the revised-IPSS for patients with myelodysplastic syndromes. *Am J Hematol.* 2014;89(5):509–516.