

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

FACULTAT DE CIÈNCIES

TESI DOCTORAL

**CARACTERITZACIÓ BIOLÒGICA DE LA
TROMBOCITÈMIA ESSENCIAL I LA POLICITÈMIA VERA**

**Memòria presentada per Lurdes Zamora Plana per assolir el grau de
Doctora en Ciències Biològiques per la
Universitat Autònoma de Barcelona.**

Bellaterra, abril de 2005.

La Dra. Lourdes Florensa Brichs, cap del Laboratori de Citologia Hematològica, Servei de Patologia de l'Hospital del Mar de Barcelona i la Dra. Blanca Espinet Solà, adjunt del Laboratori de Citogenètica i Biologia Molecular, Servei de Patologia de l'Hospital del Mar de Barcelona,

CERTIFIQUEN:

Que na Lurdes Zamora Plana ha realitzat, sota la seva direcció, el treball **“Caracterització biològica de la trombocitèmia essencial i la policitèmia vera”** per a optar al grau de Doctora en Ciències.

Aquest treball s’ha realitzat en el Laboratori de Citogenètica i Biologia Molecular, Servei de Patologia de l'Hospital del Mar de Barcelona.

Bellaterra, abril 2005.

Dra. Lourdes Florensa

Dra. Blanca Espinet

Lurdes Zamora Plana

**A ma mare i al Víctor,
perquè el que m'heu ensenyat i
tot el temps que m'heu dedicat
m'han permès arribar fins aquí.**

**A l'Andrés,
per la seva ajuda i paciència sense les quals
aquesta tesi no hagués sigut possible.**

Vull expressar el meu agraïment a les meves directores de tesi, la Lourdes Florensa i la Blanca Espinet, per haver-me donat l'oportunitat de realitzar aquest treball, així com per la seva ajuda i dedicació en tot moment. Després de tantes hores juntes durant aquests anys l'afecte i amistat cap a vosaltres van més enllà de l'àmbit professional.

Al Francesc Solé per tot el que m'has arribat a ensenyar, ajudar i pels teus bons consells tan científics com personals. Per ser un bon amic.

Al Carles Besses per l'interès que sempre has mostrat per aquest treball i per la teva inestimable ajuda. Així com per haver-me facilitat anar a Houston per a perfeccionar l'HUMARA.

A la Dra. Woessner perquè ets un model a seguir i perquè aprendre "citologia per a no hematòlegs" al teu costat és tot un privilegi.

A les meves companyes de l'Hospital del Mar (Marta, Encarna, Bea, Gemma, Eulàlia, Olaya, Rosa Mari, Rosa, Carme, Mari, Raquel i Mercè) per tots els moments que hem passat juntes i per l'ajut incondicional que he rebut de totes vosaltres. En especial, vull agrair a la Rosa Mari la seva ajuda constant durant tots aquests anys.

Als companys del General Lab (Alberto, Eli, Cristina, Sandra, Dani, Elena i Susana) pels bons moments que vam passar i el recolzament que em va donar en tot moment. Agrair en especial a l'Alberto tot el que m'ha ensenyat i a la Eli la seva amistat.

Als nous companys de Can Ruti que m'han acollit com una més del grup.

To Dr. Albitar for his help when I was in MD Anderson learning how to perform HUMARA assay and to Iman for being so kindly with me during that period of time. Not only it was an excellent professional experience, but also I found some new friends.

Per últim a la meva família, especialment a ma mare, al Víctor i a l'Andrés, perquè amb la vostra estima i paciència sempre m'heu sabut recolzar i "aguantar". Així com als avis que de ben segur els hagués fet molta il·lusió poder compartir aquest moment amb tots nosaltres.

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ	1
1.1. INTRODUCCIÓ A L'HEMATOPOESI	2
1.2. LA MIELOPOESI	4
1.3. LES SÍNDROMES MIELOPROLIFERATIVES CRÒNIQUES.....	5
1.3.1. POLICITÈMIA VERA (PV).....	5
1.3.1.1. Diagnòstic	5
1.3.1.2. Etiopatogènia	9
1.3.1.3. Manifestacions clíniques	10
1.3.1.4. Dades de laboratori.....	11
1.3.1.5. Cultius in vitro.....	12
1.3.1.6. Evolució.....	12
1.3.1.7. Pronòstic	13
1.3.2. TROMBOCITÈMIA ESSENCIAL (TE)	15
1.3.2.1. Diagnòstic	15
1.3.2.2. Etiopatogènia	17
1.3.2.3. Manifestacions clíniques	19
1.3.2.4. Dades de laboratori.....	20
1.3.2.5. Cultius in vitro.....	21
1.3.2.6. Evolució.....	22
1.3.2.7. Pronòstic	22
1.4. CITOGENÈTICA CONVENCIONAL, HIBRIDACIÓ IN SITU FLUORESCENT I ALTRES MARCADORS BIOLÒGICS	23
1.4.1. Citogenètica convencional.....	23
1.4.1.1. Policitèmia vera	23
1.4.1.2. Trombocitèmia essencial.....	25
1.4.1.3. Cariotip i progressió de la PV i ET.....	26
1.4.1.4. Valor pronòstic de la citogenètica convencional.....	28
1.4.2. Hibridació in situ fluorescent.....	28
1.4.2.1. Policitèmia Vera	28
1.4.2.2. Trombocitèmia essencial.....	31
1.4.3. Característiques de les alteracions cromosòmiques més freqüents en la PV i TE.....	32
1.4.4. Altres marcadors biològics.....	38
1.4.4.1. Gen del receptor androgènic humà (HUMARA)	38

1.4.4.2.	Gen de la policitèmia rubra vera 1 (PRV-1).....	42
1.4.4.3.	Microxips d'expressió	43
1.4.4.4.	Mutacions del gen Janus cinasa 2 (JAK2)	45
2.	MATERIAL I MÈTODES.....	47
2.1.	PACIENTS.....	48
2.2.	MÈTODES.....	49
2.2.1.	TÈCNiques DE CITOGÈNÈTICA CONVENCIONAL	49
2.2.1.1.	Extracció i conservació de les mostres.....	49
2.2.1.2.	Composició del medi de cultiu	50
2.2.1.3.	Tècniques de processat dels diferents teixits	50
2.2.1.3.1.	Medul·la òssia	50
2.2.1.3.2.	Sang perifèrica	52
2.2.1.4.	Anàlisi microscòpica i nomenclatura citogenètica convencional.....	53
2.2.2.	TÈCNiques D'HIBRIDACIÓ IN SITU (HIS)	54
2.2.2.1.	Tipus de mostres	54
2.2.2.2.	Metodologia d'hibridació in situ	54
2.2.2.2.1.	Protocol d'HIS amb marcatge de sondes amb biotina i detecció amb fluorescència BIO-FITC: Sondes de pintat cromosòmic	55
2.2.2.3.	Metodologia d'hibridació in situ fluorescent (FISH)	58
2.2.2.3.1.	Protocol d'HIS amb marcatge amb fluorescència. Sondes centromèriques i específiques de locus	58
2.2.2.4.	Criteris de valoració de la FISH i establiment dels nivells de tall	60
2.2.3.	TÈCNICA D'ESTUDI DE CLONALITAT MITJANÇANT EL POLIMORFISME DEL GEN HUMARA	62
2.2.3.1.	Extracció i conservació de les mostres.....	62
2.2.3.2.	Separació de les cèl·lules.....	62
2.2.3.2.1.	Obtenció de cèl·lules mononucleades i granulòcits per tècnica de gradient discontinu	62
2.2.3.2.2.	Separació de les cèl·lules mononucleades en cèl·lules CD3+ i cèl·lules CD3- amb columnes de selecció positiva	64
2.2.3.3.	Extracció d'ADN de sang perifèrica.....	65
2.2.3.4.	Digestió de l'ADN	67
2.2.3.5.	Amplificació de l'ADN mitjançant la tècnica de la PCR.....	67

2.2.3.6. Anàlisi i interpretació dels resultats	68
2.3. REACTIUS I SOLUCIONS	70
2.3.1. Components del medi de cultiu	70
2.3.2. Tècnica de citogenètica convencional	70
2.3.3. Tècnica d'hibridació in situ.....	71
2.3.4. Tècnica d'estudi de clonalitat mitjançant el polimorfisme del gen HUMARA	72
3. ARTICLES	73
3.1. Article 1: "Is FISH a useful method in the diagnosis of Polycythemia Vera patients?"	74
3.2. Article 2: "Is the gain of 9p involved in the pathogenesis of polycythemia vera? A purpose of a case."	82
3.3. Article 3: "Incidence of trisomy 8 and 9, deletion of D13S319 and D20S108 loci and BCR/ABL translocation in non-treated essential thrombocythaemia patients: an analysis of bone marrow cells using interphase fluorescence in situ hybridization."	86
3.4. Article 4: "Clonality analysis by HUMARA-PCR assay in a cohort of spanish females with essential thrombocythemia and polycythemia vera."	89
4. DISCUSSIÓ	93
4.1. Citogenètica convencional i hibridació in situ en la policitèmia vera ..	94
4.2. Importància dels guanys de 9p en la patogènesi de la policitèmia vera.....	97
4.3. Incidència de trisomia 8 i 9, delecio dels loci D13S319 i D20S108 i presència de translocació BCR/ABL en pacients afectes de trombocitèmia essencial no tractats: estudi de cèl·lules de la medul·la òssia per hibridació in situ fluorescent	98
4.4. Estudi de clonalitat mitjançant el gen HUMARA en una població de dones afectes de trombocitèmia essencial i policitèmia vera	101
5. CONCLUSIONS	104
6. BIBLIOGRAFIA	108

ABREVIATURES

¹²⁵I: iode 125 radioactiu
³²P: fòsfor 32 radioactiu
⁵¹Cr: crom 51 radioactiu
ADN: àcid desoxiribonucleic
ARN: àcid ribonucleic
ARNi: àcid ribonucleic d'interferència
Bcl-x_L: B-cell leukemia/lymphoma x_L
BCR/ABL: *breakpoint cluster region/Abelson*
BFU-E: *burst-forming units-erythroid*, unitat formadora de colònies eritroides
BFU-Meg: *burst-forming units-megakaryocyte*, unitat formadora de colònies megacariocítiques
BTK: *bruton tyrosine kinase*, bruton tirosin cinasa
CDKN2A o p16: *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*
CFU-Ba: *colony-forming unit basophil*, unitat formadora de colònies basòfiles
CFU-E: *colony-forming unit erythroid*, unitat formadora de colònies eritroides
CFU-Eo: *colony-forming unit eosinophil*, unitat formadora de colònies eosinòfiles
CFU-G: *colony-forming unit granulocyte*, unitat formadora de colònies granulocítiques
CFU-GEMM: *colony-forming unit granulocyte erythrocyte monocyte macrophage*, unitat formadora de colònies granulocítiques eritroides monocítiques macrofàgiques
CFU-GM: *colony-forming unit-granulocyte/macrophage*, unitat formadora de colònies granulo/macrofàgica
CFU-L: *leukemia colony-forming unit*, unitat formadora de colònies limfoides
CFU-M: *myeloid colony-forming unit*, unitat formadora de colònies mieloides
CFU-Meg: *colony-forming unit megakaryocyte*, unitat formadora de colònies megacariocítiques
c-MPL: *myeloproliferative leukemia virus oncogene C*
EPO: eritropoetina
ES: eritrocitosis secundàries
FAB: *French American British*
FAG: fosfatases alcalines granulocítiques
FEC: factors estimulants de colònies
FEC-Eo: factor estimulant de colònies eosinofíliques
FEC-G: factor estimulant de colònies granulocítiques
FEC-GM: factors estimulants de colònies granulomonocítiques
FEC-Meg: factors estimulants de colònies megacariocítiques
FHL1: *four and a half LIM domains 1*
FISH: *fluorescence in situ hybridization*, hibridació in situ fluorescent
G6PD: glucosa-6-fosfat deshidrogenasa
HPRT: hipoxantin fosforibosil transferasa
Ht: hematòcrit
HUMARA: *human androgen receptor*, receptor androgènic humà

IDS: iduronat-2-sulfatasa
IL: interleucines
IL11RA: receptor de cadenes alfa de la interleucina 11 humana
ILGF-1: factor de creixement de la insulina tipus 1
JAK2: Janus tirosina cinasa 2
LAM: leucèmia aguda mieloide
LMC: leucèmia mieloide crònica
MafB: *v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B*
Mb: megabase
MI: mielofibrosi idiopàtica
MPP1: *matrix metalloproteinase 1*
MYBL2: *v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog-like 2*
OMS: organització mundial de la salut
PGK: *phosphoglycerate kinase*
Ph: *Philadelphia*, Filadèlfia
PLCG1: *phospholipase C, gamma 1*
PRV-1: *polycythemia rubra vera-1*, gen de la policitèmia rubra vera 1
PV: policitèmia vera
PVSG: *polycythemia vera study group*, grup d'estudi de la policitèmia vera
RB: retinoblastoma
RCD: regió comuna delecionada
RT-PCR: *reverse transcription polymerase chain reaction*
SMD: síndromes mielodisplàsiques
SMPC: síndromes mieloproliferatives cròniques
TCF14: *transcription Factor 14*
TE: trombocitèmia essencial
TEK: *tyrosine kinase, endothelial*
TPO: trombopoetina
TR: trombocitosi reactiva
VCM: volum corpuscular mitjà
VNTR: *variable number of tandem repeats*, número variable de repeticions en tàndem
XCIP: *X-chromosome inactivation pattern*, patró d'inactivació del cromosoma X
YAC: *yeast artificial chromosome*, cromosomes artificials de llevat
YWHAB: *tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide*

1. INTRODUCCIÓ

1.1. INTRODUCCIÓ A L'HEMATOPOESI

L'hematopoesi és el mecanisme fisiològic que s'encarrega de produir continuament els diferents elements formes de la sang perifèrica i que els manté dins d'uns valors de normalitat. En l'individu adult, l'hematopoesi té lloc a la medul·la òssia, teixit que permet l'aniuament, creixement i diferenciació de les cèl·lules germinals hematopoètiques. Aquest procés està regulat per mecanismes de gran complexitat, en els quals les cèl·lules hemopoètiques interactuen entre si, amb el microambient, amb factors de creixement i amb la matriu extracel·lular.

1.1.1 Factors de creixement hemopoetics

Fins a l'actualitat s'han identificat més de 25 classes de factors de creixement, dins dels quals trobem l'eritropoetina (EPO), els factors estimulants de colònies (FEC), la trombopoetina (TPO) i les interleucines (IL). Inicialment es pensava que aquests factors tenien una acció específica, restringida a una línia cel·lular; però més tard s'ha pogut comprovar que la majoria d'ells actuen de forma sinèrgica entre si [1-4].

L'eritropoetina (EPO) és la principal hormona reguladora de la proliferació dels precursors eritroides i la seva diferenciació a eritrocits. El gen que la codifica es localitza al cromosoma 7 (7q11-22). Estimula la formació de colònies eritroides (BFU-E, de l'anglès *burst formation unit-erythroid* i CFU-E, de l'anglès *colony formation unit-erythroid*). També s'ha descrit un lleuger efecte estimulador de la EPO sobre la megacariopoesi [4].

El factor estimulant de colònies granulomonocítiques (FEC-GM) o factor estimulant de colònies α (FEC- α) actua induint el creixement de precursors granulomonocítics, així com dels progenitors granulocítics, macrofàgics, eosinofílics, basofílics i megacariocítics. El gen que el codifica es localitza al cromosoma 5 (5q23-31).

La trombopoetina (TPO) és el principal factor regulador de la megacariopoesi. El gen que la codifica es localitza al cromosoma 3 (3q26-27). La TPO indueix directament la proliferació de CFU-Meg i megacariòcits immadurs, i actua en la fase madurativa de la formació de proplaquetes [5].

Les interleucines (IL 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11) són altres factors de creixement de les cèl·lules hemopoètiques. Cada interleucina té una funció diferent: hi ha interleucines que estimulen cèl·lules primitives, altres que estimulen el creixement de cèl·lules T, cèl·lules B, megacariòcits, etc. La interrelació de les diferents interleucines amb les diverses línies cel·lulars i progenitors es descriu en els apartats corresponents.

1.1.2 Acció dels factors de creixement en els progenitors hemopoètics

Entre les cèl·lules progenitores eritroides madures hi ha tres línies compromeses amb l'eritropoesi: la CFU-E, la BFU-E madura i la BFU-E primitiva. Aquestes BFU-E necessiten la presència de certs nivells d'EPO i d'IL-3, i un llarg període de cultiu perquè es diferenciïn a eritroblasts. La més diferenciada, denominada CFU-E, precisa escassos nivells d'EPO, però nivells més elevats d'IL-3, així com un període de cultiu curt per donar origen al primer element reconeixible de la sèrie eritroblàstica (proeritroblast) [6]. La cèl·lula compromesa en la granulopoesi (CFU-GM) prolifera i madura sota l'acció del FEC-GM i de la IL-3, i origina posteriorment dues cèl·lules compromeses, una a la granulopoesi neutròfila o CFU-G i una altra a la monopoesi o CFU-M. Aquestes cèl·lules originaran, amb posterioritat, el mieloblast i el monoblast, respectivament [7]. Sobre la CFU-G actua el FEC-GM i el FEC-G, i sobre la CFU-M, el FEC-GM i el FEC-M.

La sèrie eosinòfila té un progenitor específic, el CFU-Eo, que s'estimula per un factor segregat fonamentalment pels limfòcits T i es denomina FEC-Eo o també interleucina 5 (IL-5). Sota l'efecte d'aquest factor es produeix la proliferació i maduració cap al primer element de la sèrie reconeixible morfològicament, el mielòcit eosinofílic immadur. El mateix passa amb la sèrie basòfila; la cèl·lula compromesa d'aquesta línia és la CFU-Ba, que prolifera sota l'acció de la IL-3 [8].

En l'actualitat es coneixen amb més exactitud les cèl·lules germinals compromeses en la megacariopoesi humana. En l'home es reconeixen, com a mínim, dues classes de precursors megacariocítics capaços de formar colònies in vitro, el BFU-Meg, que representa el progenitor immadur, i el CFU-Meg o progenitor madur. La seva diferenciació cap a la megacariopoesi està condicionada, sobretot, per dues classes de factors humorals, els coneguts

com a factors estimulants de colònies megacariocítiques (FEC-Meg) que actuen en fases inicials de la proliferació megacariocítica, i altres, denominats factors potenciadors de la megacariopoesi o Mega-pot, indispensables per a la maduració dels megacariòcits i per a la formació de plaquetes. Al primer grup pertanyen la IL-3, el FEC-GM i la IL-6, mentre que la TPO, l'EPO i la IL-11 presenten acció Mega-pot [9,10].

1.2. LA MIELOPOESI

Gràcies a les tècniques de cultiu *in vitro*, actualment se sap que en l'home existeix una cèl·lula mare pluripotent amb capacitat de proliferació, diferenciació i autorenovació, anomenada CFU-LM (*colony formation unit-lymphomyeloid*) o cèl·lula mare limfomieloide, també coneguda com a CFU-GEMMegL degut a la seva capacitat de produir colònies *in vitro* constituïdes per granulòcits, eritròcits, monòcits, osteoclasts, megacariòcits i limfòcits T i B [11, 12].

A partir de la CFU-LM apareixen la cèl·lula germinal mieloide (CFU-M o CFU-Mix) i la cèl·lula germinal limfoide (CFU-L). A partir de la CFU-M té lloc la formació de tota la sèrie mieloide.

La majoria de les cèl·lules de la medul·la òssia pertanyen a precursors granulomonocítics i eritroides amb una proporció normal de 2 a 1. Els elements limfoides, les cèl·lules plasmàtiques i els progenitors mieloides representen el 10% restant de les cèl·lules medul·lars. Els basòfils, els mastòcits i els macròfags estan presents en escassa proporció. El percentatge de megacariòcits és molt variable, amb un promig aproximat d'un megacariòcit per cada 200 cèl·lules medul·lars. Convé recordar que si s'aspira més de 0.1 a 0.2 ml de medul·la òssia, el nombre de limfòcits augmenta per contaminació sanguínia [13].

1.3. LES SÍNDROMES MIELOPROLIFERATIVES CRÒNIQUES

El concepte de síndromes mieloproliferatives cròniques (SMPC) engloba un conjunt d'entitats hematològiques amb característiques clíniques i evolutives molt similars, i d'etiopatogènia probablement comú. Es tracta de processos caracteritzats per l'expansió clonal d'una cèl·lula mare (*stem cell*) pluripotent, que dona com a resultat una hiperplàsticitat medul·lar amb predomini d'una o més línies que arriben a diferenciar-se en elements madurs. Totes les SMPC es troben subjectes a evolució clonal però en un grau força variable: un 90% d'evolució a leucèmia aguda en la leucèmia mieloide crònica front un 1-2% a la trombocitèmia essencial. Les SMPC clàssiques comprenen quatre entitats: la leucèmia mieloide crònica (LMC), la mielofibrosi idiopàtica (MI), la policitèmia vera (PV) i la trombocitèmia essencial (TE).

L'agrupació de totes aquestes entitats sota una mateixa categoria té, sobretot, un sentit clínic. Es tracta de processos d'evolució crònica, habitualment esplenomegàtics, que solen cursar amb recomptes hemàtics augmentats (eritrocitosi, leucocitosi i trombocitosi) en proporció variable segons l'entitat de que es tracti, amb freqüent eosinofília i basofília, i tendència a desenvolupar fibrosi. En ocasions, s'expressen amb quadres frontera, amb manifestacions o característiques superposables, fet que dificulta el seu encasellament en una malaltia concreta. Tot i que rarament pot donar-se el pas d'una entitat a una altra, aquesta classe d'evolucions reflexa, en realitat, les diferents etapes d'una mateixa malaltia més que un autèntic canvi d'entitat clínic.

1.3.1. POLICITÈMIA VERA

1.3.1.1. Diagnòstic

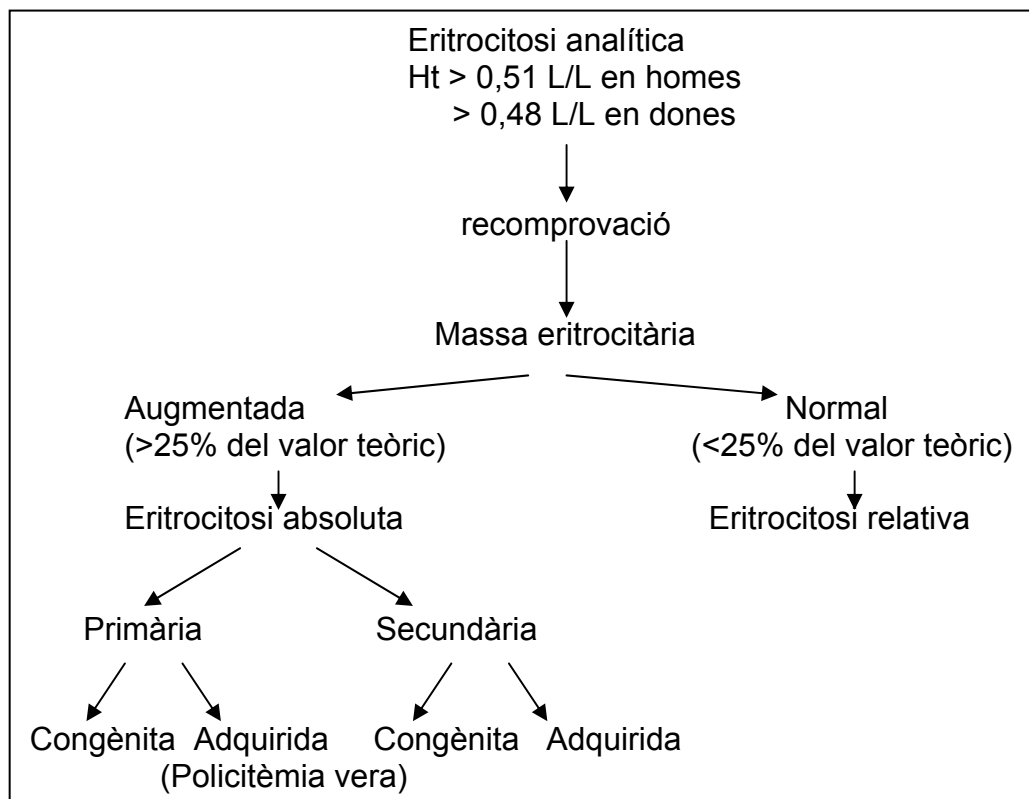
A la pràctica clínica, la valoració d'una eritrocitosi acostuma a ser el primer paràmetre que posa de manifest una possible PV. El paràmetre de laboratori a avaluar ha de ser l'hematòcrit, ja que existeix una millor correlació entre aquest i la massa eritrocitària (citèmia), que entre l'hemoglobina i la citèmia. En primer lloc, s'han de definir els valors de referència del límit alt de normalitat de l'hematòcrit. Segons Pearson, aquests es situen en 0,51 L/L pels homes i 0,48 L/L per les dones [14]. Un hematòcrit augmentat sempre s'hauria de confirmar en una segona determinació abans de procedir a més exploracions complementàries. Una vegada confirmat l'augment, es procedeix mitjançant

mètodes isotòpics a la mesura de la massa eritrocitària o citèmia, utilitzant ^{51}Cr i del volum plasmàtic amb albúmina marcada amb ^{125}I .

La definició actual d'una **eritrocitosi absoluta** o massa eritrocitària augmentada, és la d'una citèmia que excedeixi més del 25% el valor normal calculat pel pacient, ja que el 98% dels homes i el 99% de les dones tenen valors del $\pm 25\%$ del valor normal calculat per un individu.

L'**eritrocitosi relativa** es defineix com un increment de l'hematòcrit causat per una disminució del volum plasmàtic, però amb uns valors de citèmia normals o en el límit alt de la normalitat. En la Figura 1 es pot veure un algoritme diagnòstic de les eritrocitosis.

Figura 1. Orientació diagnòstica de les eritrocitosis



El *Polycythemia Vera Study Group* (PVSG) [15] va establir l'any 1975 uns criteris diagnòstics per la PV, que es detallen a la Taula 1. Els criteris es van establir amb la finalitat d'incloure en protocols clínics terapèutics aquells pacients amb característiques evidents de la malaltia exclouent els pacients amb eritrocitosis clonals o formes incompletes de la malaltia. Aquests criteris, tot i que vàlids, poden excloure pacients amb manifestacions moderades o en la fase inicial de la malaltia i estan essent desplaçats per uns altres que

incorporen els avanços produïts els últims anys en l'estudi de la PV, com els progenitors eritroides estudiats per cultius *in vitro*, els marcadors de clonalitat, els nivells d'eritropoetina i la detecció d'esplenomegàlia no palpable [16]. La Taula 2 mostra aquests criteris modificats que són àmpliament acceptats a Europa. Paral·lelament a aquesta última modificació dels criteris del PVSG, un grup internacional d'investigadors va col·laborar a la formulació d'uns criteris pel diagnòstic de la PV. Aquests criteris són els que ha adoptat l'Organització Mundial de la Salut (OMS) (Taula 3) i es diferencien als proposats pel PVSG en tres aspectes: 1) formulen el criteri A1 de forma menys estricta; 2) la formació endògena de colònies eritroides deixa de ser un criteri menor (B) per passar a ser un criteri major (A) i 3) inclouen la biòpsia de moll d'os com a criteri menor (B), dada que fins al moment no havia estat contemplada [17].

Des que es van establir els criteris actualitzats del PVSG o de la OMS, s'han realitzat grans progressos en el camp dels marcadors moleculars de la PV. Alguns exemples són la valoració de l'expressió del receptor de la trombopoetina (TPO), c-Mpl, en les plaquetes i del gen policitèmia rubra vera (PRV-1) en els granulòcits. Es tractaria doncs de dos nous biomarcadors pendents de validar el seu paper diagnòstic.

Taula 1. Criteris diagnòstics de la policitèmia vera segons el PVSG [15]

Criteris majors	Criteris menors
A1 Massa eritrocitària ^a Homes ≥ 36 mL/kg Dones ≥ 32 mL/kg	B1 Trombocitosi ≥ 400 x 10 ⁹ /L B2 Leucocitosi ≥ 12 x 10 ⁹ /L B3 Índex FAG >100 ^b
A2 Saturació arterial d'O ₂ ≥ 92%	B4 Vitamina B ₁₂ sèrica >900 pg/mL o CR B ₁₂ >2200 pg/mL ^c
A3 Esplenomegàlia	
Diagnòstic de PV si es compleix: A1 + A2 + A3 A1 + A2 + 2 criteris categoria B	

^aMesura amb ⁵¹Cr; ^ben absència de febre o infecció; ^ccapacitat de transport lliure de vitamina B₁₂. FAG: fosfatases alcalines granulocítiques

Taula 2. Criteris diagnòstics de la policitèmia vera modificats pel PVSG [16]

Criteris

- A1 Augment de la citèmia (>25% del valor normal calculat)
 - A2 Absència de causa d'eritrocitosi secundària
 - A3 Esplenomegàlia palpable
 - A4 Marcador de clonalitat (ex. cariotip medul·lar anormal)
 - B1 Trombocitosi ($>400 \times 10^9/L$)
 - B2 Leucocitosi neutrofílica (neutròfils $> 10 \times 10^9/L$)
 - B3 Esplenomegàlia demostrada per ecografia o gammagrafia
 - B4 Creixement endogen de BFU-E característic o disminució de l'Epo sèrica
- Diagnòstic de PV si es compleix:
- A1 + A2 + A3 o A4
 - A1 + A2 + 2 criteris de la categoria B

BFU-E: unitat formadora de colònies eritroides; Epo: eritropoetina

Taula 3. Criteris diagnòstics de la Policitèmia Vera segons l'OMS [17]

Criteris

- A1 Augment de la citèmia (>25% del valor normal calculat), o hemoglobina $>18.5g/dL$ en homes i $>16.5g/dL$ en dones, o >99 percentil en funció del valor de referència per edat, sexe i altitud de residència
 - A2 Absència de causa d'eritrocitosi secundària
 - A3 Esplenomegàlia palpable
 - A4 Marcador de clonalitat (ex. cariotip medul·lar anormal)
 - A5 Creixement endogen de BFU-E característic (in vitro)
 - B1 Trombocitosi ($>400 \times 10^9/L$)
 - B2 Leucocitosi neutrofílica (neutròfils $> 12 \times 10^9/L$)
 - B3 Biòpsia de moll d'os que mostri panmielosi amb una proliferació evident eritroide i megacariocítica
 - B4 Disminució d'eritropoetina sèrica
- Diagnòstic de PV si es compleix:
- A1 + A2 + A3 o A4 o A5
 - A1 + A2 + 2 criteris de la categoria B

BFU-E: unitat formadora de colònies eritroides

1.3.1.2. Etiopatogènia

Com la resta de SMPC, la policitèmia vera (PV) és el resultat de la proliferació anormal d'una cèl·lula mare pluripotent, que dóna lloc a una hemopoesi clonal d'hematies, granulòcits i plaquetes, amb predomini d'hiperplàsia eritroide sobre la resta de línies hemopoètiques. El potencial proliferatiu sembla que no afecta els progenitors de cèl·lules T i NK.

Els primers estudis de clonalitat en la PV es van dur a terme l'any 1976 per Adamson i Fialkow, a través de l'estudi de l'isoenzim de la glucosa-6-fosfat-deshidrogenasa en dues dones negres heterozigotes per l'enzim. Aquests estudis van demostrar que els hematies, els granulòcits i les plaquetes tenien el mateix isoenzim, mentre que els fibroblasts cutanis en tenien de dos tipus, fet que es va interpretar com a demostració de clonalitat i del seu origen en una cèl·lula mare hemopoètica pluripotent. Anàlisis posteriors, utilitzant diverses tècniques moleculars d'estudi de la clonalitat, assenyalen que un 60-80% de pacients amb PV presenten patró clonal en els granulòcits i policlonal en els limfòcits T, i que alguns mostren un patró policlonal en els granulòcits, de forma similar al que succeeix en la trombocitèmia essencial [18].

Altres mecanismes presumptament implicats en la patogènia de la PV són les proteïnes inhibidores de l'apoptosi i les unitats formadores de colònies eritroides (BFU-E). Les BFU-E normals necessiten eritropoetina per poder preservar el seu paper progenitor front el mecanisme avortiu de l'apoptosi. En els cultius *in vitro* de progenitors hemopoètics en pacients amb PV, si bé s'ha demostrat hipersensibilitat dels progenitors eritroides a l'acció de l'eritropoetina, s'ha evidenciat, així mateix, una capacitat de formació de colònies Epo-independent. S'han observat, també, valors elevats de proteïna Bcl-x_L, inhibidora de l'apoptosi, que podrien explicar perquè aquestes colònies poden sobreviure sense eritropoetina [19]. Contràriament, les colònies eritroides de subjectes normals o afectes d'eritrocitosis secundàries, expressen valors de proteïna Bcl-x_L molt disminuïts o absents.

Adicionalment, s'ha constatat que el receptor de la trombopoetina (c-Mpl) es troba també molt disminuït, circumstància que suggereix que la proliferació i diferenciació dels megacariòcits en la PV és independent de la trombopoetina [20]. Es tracta, doncs, d'una situació anàloga a la de l'eritropoetina i les BFU-E. Per tot això, s'ha de considerar que la PV s'origina a partir de la proliferació

anòmala d'una cèl·lula mare pluripotent que adquireix així diverses alteracions genètiques, entre les quals n'hi ha unes que afecten la trombopoetina i el sistema de Bcl-2. La hipersensibilitat als factors de creixement i citocines (IL-3, EPO, GM-CSF, IGF-1) dels progenitors eritroides representa, probablement, una altra de les alteracions implicades. En una accepció més àmplia, la PV seria una malaltia clonal acumulativa i no invasiva que es desenvoluparia sota l'acció d'aquests sistemes reguladors de l'hematopoesi, assemblant-se en aquesta peculiaritat a la leucèmia limfàtica crònica i al limfoma fol·licular, malalties també acumulatives vinculades entre d'altres mecanismes, a alteracions de l'apoptosi.

1.3.1.3. Manifestacions clíniques

La incidència de la PV és de 0.8-1.5 casos/100.000 habitants i any. La mitjana d'edat en el moment del diagnòstic és de 60 anys pel sexe masculí i de 62 anys pel sexe femení. La relació home/dona és de 1.2:1. Un 15-25% dels casos es diagnostiquen de forma casual a conseqüència d'una anàlisi de rutina. Aparentment, el 0.4% dels subjectes amb PV tenen una història familiar de la malaltia.

La majoria de les manifestacions clíniques de la PV són una conseqüència directa de la proliferació excessiva de les diverses línies cel·lulars hemopoètiques que participen en el procés neoplàsic. Els pacients amb PV simptomàtica poden presentar diverses manifestacions com astènia, cefalees, pèrdua de pes, molèsties epigàstriques, prurit i gota. L'exploració física evidencia un pacient amb aspecte pletòric, injecció conjuntival, cianosi rogenca de la pell i mucoses, esplenomegàlia i hipertensió arterial [21].

Les **complicacions trombòtiques** són la principal causa de morbiditat i mortalitat en pacients amb PV. Els principals factors clínics implicats són l'edat avançada, la història prèvia de trombosis i els requeriments de flebotomies [22].

Les **complicacions vasculars** en la PV es determinen principalment amb el valor de l'hematòcrit. Un hematòcrit augmentat incrementa el risc trombòtic ja que augmenta la viscositat sanguínia [22].

Les **complicacions hemorràgiques** es detecten en el 30-40% dels pacients [23] i la predisposició a l'hemorràgia s'atribueix, en part, a les alteracions qualitatives de les plaquetes.

1.3.1.4. Dades de laboratori

La dada més destacada és el gran augment de la xifra d'hematies, que acostuma a superar els $6 \times 10^{12}/L$. Tot i la microcitosi existent, la concentració d'hemoglobina es troba també molt elevada, i en ocasions supera xifres de 20 g/dL. Un hematòcrit superior a 0.60 L/L es detecta en més del 50% de pacients. Cal recordar que l'hematòcrit és el millor indicador biològic per valorar una eritrocitosi, ja que indica la situació hemorreològica del pacient, ja que si existeix ferropènia, la concentració d'hemoglobina és proporcionalment més baixa comparada amb la de l'hematòcrit [24]. Les anomalies morfològiques eritrocitàries com la microcitosi i la hipocròmia són degudes al dèficit de ferro. En els pacients que segueixen un règim de flebotomies, s'acostumen a veure signes morfològics regeneratius com anisocitosi i policromàsia.

Com que es tracta d'una panmielosi, la majoria de pacients amb PV, a més de cursar amb un hematòcrit augmentat, presenten leucocitosi i trombocitosi. La fórmula leucocitària acostuma a tenir un increment en la proporció de basòfils (2/3 dels pacients tenen més d'un 3% de basòfils) i la presència ocasional de formes granulocitàries immadures. La xifra de plaquetes és superior a $500 \times 10^9/L$ en el 40-50% de malalts i pot superar $1000 \times 10^9/L$ en el 10% dels casos. En el moment del diagnòstic, el mielograma és hipercel·lular amb una hiperplàsia de la sèrie eritroide, granulocítica i megacariocítica. Aquesta acusada hiperplàsia de les tres sèries, comú en totes les síndromes mieloproliferatives cròniques, resulta útil en el diagnòstic diferencial entre PV i altres formes secundàries d'eritrocitosi. La població eritroblàstica, de morfologia normal, domina en percentatge a la proliferació granulopoètica. Com que existeix una ferropènia per hiperconsum, amb la tinció de Perls es veu un descens o fins i tot absència dels sideroblasts i una disminució o desaparició de l'hemosiderèmia dels macròfags medul·lars, fet que es detecta en el 95% de pacients en el moment del diagnòstic. Des del punt de vista citoquímic, destaca un important augment de les fosfatases alcalines granulocítiques (FAG); el seu índex sol trobar-se per sobre de 100. Aquesta dada és també d'interès en el diagnòstic diferencial amb les eritrocitosis secundàries [25].

La biòpsia medul·lar habitualment és hipercel·lular; un 85% dels casos tenen més d'un 60% de cel·lularitat. La tinció per reticulina inicialment és normal en el 64% dels pacients i en un 25% s'aprecia un increment moderat de la xarxa reticulínica.

1.3.1.5. Cultius in vitro

Els cultius in vitro de progenitors hemopoètics, de medul·la òssia o de sang perifèrica, mostren creixement de colònies eritroides en absència d'Epo en el medi de cultiu, en la majoria de pacients amb PV. Aquest fenomen es denomina creixement endogen o espontani i és especialment útil per diferenciar la PV d'altres policitèmies secundàries, en les que mai s'observa aquest fet [26]. En general, el creixement espontani de colònies tampoc es presenta en les policitèmies congènites i familiars primàries, tot i la hipersensibilitat dels progenitors d'aquests pacients a l'Epo [27]. En definitiva, els cultius in vitro són molt valuosos en el diagnòstic de PV en aquells pacients que no compleixen tots els criteris diagnòstics i en determinades situacions clíniques, com per exemple, una trombosi esplènica, que pot ser la primera manifestació d'una PV silent.

1.3.1.6. Evolució

La PV pot progressar per una sèrie de fases o estadis que van des d'una fase inicial asimptomàtica en la que només es detecta una eritrocitosi aïllada associada o no a trombocitosi i esplenomegàlia, seguida per una fase d'eritrocitosi simptomàtica i aquesta per una fase inactiva durant la qual la malaltia sembla estable, i que pot prosseguir amb una fase postpolicitèmica amb metaplàsia mieloide, denominada també fase d'esgotament. Una altra possibilitat és que es produeixi una transformació a una leucèmia aguda, habitualment tipus mieloide (Taula 4). La transformació a mielofibrosi es produeix en un 10% de pacients als 10-15 anys i en un 50% després de 20 anys, independentment del tractament efectuat, tot i que existeixen variacions individuals molt àmplies [28].

La metaplàsia mieloide postpolicitèmica es caracteritza per: a) increment progressiu de l'esplenomegàlia; b) quadre leucoeritroblàstic i presència d'hematies en llàgrima en sang perifèrica; c) fibrosi medul·lar difusa; i d) normalització o disminució de la massa eritocitària, amb instauració d'una anèmia progressiva. L'evolució leucèmica és molt més freqüent en aquest context (20-50%). Els pacients poden estar asimptomàtics o presentar símptomes com astènia progressiva, anorèxia i pèrdua de pes. El creixement de la melsa és la manifestació clínica més freqüent i, a diferència de l'esplenomegàlia present al diagnòstic, el seu increment de mida és degut a l'augment del *pool* eritrocitari esplènic i a l'establiment progressiu d'una hemopoesi extramedul·lar [29].

L'anèmia en aquesta situació pot ser el resultat de diferents factors: hiperesplenisme, eritropoesi ineficaç, disminució de la vida mitja eritrocitària i també dèficit de folat i ferro. La trombopènia i les alteracions del funcionalisme plaquetar poden causar hemorràgies en forma d'epistaxis o equimosis. Les hemorràgies gastrointestinals acostumen a ser conseqüència de varius esofàgiques secundàries a una hipertensió portal. La majoria de pacients moren abans dels 3 anys d'haver-se produït la transició mielofibròtica, tot i que un 30% viuen entre 6 i 7 anys.

1.3.1.7. Pronòstic

Els pacients amb PV sense tractament tenen una mitjana de supervivència de només 18 mesos, mentre que els tractats viuen, en general, més de 15 anys. Ara bé, la malaltia per si mateixa determina una reducció de la supervivència quan es compara amb una població control de la mateixa edat i sexe [30].

Taula 4. Evolució de la policitèmia vera

Estadi	Característiques clíniques
<p>Fase asimptomàtica</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	<p>Esplenomegàlia</p> <p>Eritrocitosi aïllada</p> <p>Trombocitosi aïllada</p>
<p>Fase simptomàtica</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	<p>Eritrocitosi</p> <p>Trombocitosi</p> <p>Leucocitosi</p> <p>Esplenomegàlia</p> <p>Trombosi</p> <p>Hemorràgia</p> <p>Prurit</p>
<p>Fase inactiva</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	<p>Reducció dels requeriments de flebotomies o quimioteràpia</p>
<p>Fase d'esgotament: metaplàsia mieloide postpolicitèmica</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	<p>Anèmia</p> <p>Síndrome leucoeritroblàstic</p> <p>Trombopènia o trombocitosi</p> <p>Increment de l'esplenomegàlia</p> <p>Símtomes sistèmics</p>
<p>Leucèmia aguda mieloide</p>	<p>(febre, pèrdua de pes)</p>

1.3.2. TROMBOCITÈMIA ESSENCIAL

1.3.2.1 Diagnòstic

La TE no disposa d'un marcador biològic característic i el seu diagnòstic es basa en criteris d'exclusió. L'any 1986, el PVSG va proposar uns criteris diagnòstics basats en l'exclusió de la resta de SMPC que poden cursar amb trombocitosi (LMC, PV i MI) i de les trombocitosis de causa secundària o reactiva [31]. L'any 1997 aquest grup va fer algunes modificacions sobre les propostes originals [32] (Taula 5).

Taula 5. Criteris diagnòstics de la trombocitèmia essencial segons el PVSG [32]

Criteris	
I.	Recòmpte de plaquetes $>600 \times 10^9/L$
II.	Hematòcrit <0.40 L/L o massa eritrocitària normal (V < 36 mL/Kg, M <32 mL/Kg)
III.	Ferro medul·lar present o ferritina sèrica normal o VCM normal*
IV.	Absència del cromosoma Ph' o del reordenament BCR/ABL
V.	Fibrosi col·làgena de la medul·la absent o $< 1/3$ de l'àrea de la biòpsia, sense esplenomegàlia ni síndrome leucoeritroblàstica acompanyant
VI.	Absència d'evidència morfològica o citogenètica de síndrome mielodisplàsica
VII.	Absència de causa coneguda de trombocitosi reactiva

* Si la ferritina o el VCM suggereixen ferropènia, no pot excloure's la policitèmia vera, a no ser que un tractament amb ferro no incrementi la massa eritrocitària a xifres policitèmiques

Posteriorment a aquesta última modificació dels criteris del PVSG, un grup internacional d'investigadors va col·laborar a la formulació d'uns criteris pel diagnòstic de la TE. Aquests criteris són els que ha adoptat l'Organització Mundial de la Salut (OMS) (Taula 6). Aquests criteris es diferencien dels proposats pel PVSG bàsicament en la incorporació de dos criteris diagnòstics positius: 1) Recòmpte plaquetar $\geq 600 \times 10^9/L$ de manera persistent i 2) Biòpsia de moll d'os que mostri bàsicament una proliferació de la línia megacariocítica amb un augment dels megacariòcits madurs i de mida gran.

Taula 6. Criteris diagnòstics de la trombocitèmia essencial segons l'OMS [17]

Criteris positius

1. Recompte persistent de plaquetes $>600 \times 10^9/L$
 2. Biòpsia de moll d'os amb proliferació de la línia megacariocítica i un augment dels megacariòcits madurs i de mida gran
-

Criteris d'exclusió

1. No evidència de policitèmia vera
 - Massa eritrocitària normal o Hb <18.5 g/dL en homes i <16.5 g/dL en dones
 - Ferro medul·lar present o ferritina sèrica normal o VCM normal
 - Si la condició anterior no existeix, ha d'existir un problema en la via del ferro que no permeti incrementar la massa eritrocitària o els nivells d'Hb a xifres policitèmiques
2. No evidència de leucèmia mieloide crònica
 - Absència del cromosoma Ph' o del reordenament BCR/ABL
3. No evidència de mielofibrosi idiopàtica crònica
 - Fibrosi col·làgena absent
 - Fibrosi reticulínica mínima o absent
4. No evidència de síndrome mieloproliferativa
 - Absència d'alteracions cromosòmiques com: del(5q), t(3;3)(q21;q26), inv(3)(q21q26)
 - Absència de displàsia granulocítica significativa, o poca si existeixen micromegacariòcits
5. Absència de causa coneguda de trombocitosi reactiva tipus
 - Inflamació o infecció
 - Neoplàsia
 - Prèvia a esplenectomia

VCM: volum corpuscular mitjà; Ph': cromosoma filadèlfia

1.3.2.2 Etiopatogènia

La Trombocitèmia essencial (TE) és una SMPC caracteritzada per un increment persistent de la xifra de plaquetes i per una hiperplàsia megacariocítica en la medul·la òssia. La malaltia no es va considerar una entitat clinicopatològica fins a les descripcions de Gunz [33] i Ozer [34]. Clínicament es manifesta per una tendència a presentar complicacions trombòtiques i/o hemorràgiques.

Si bé la seva etiologia és desconeguda, Fialkow i col. al 1981 van demostrar que es tractava d'una malaltia clonal quan van estudiar el patró de distribució dels isoenzims de la glucosa-6-fosfat-deshidrogenasa (G6PD) en dones heterozigòtiques. Els estudis recents d'anàlisi dels patrons de metilació de l'ADN i de l'expressió de l'ARN han demostrat que la TE és una malaltia heterogènia des del punt de vista clonal, ja que s'han trobat pacients que, tot i complir amb tots els criteris diagnòstics exigits i presentar les manifestacions clíniques característiques, tenien una hemopoesi policlonal [18]. Les limitacions de l'estudi molecular de clonalitat en la TE són degudes a que, tot i ser una malaltia de predomini femení, condició indispensable per poder aplicar les tècniques d'anàlisi dels patrons d'inactivació del cromosoma X, un 20-50% de dones hematològicament normals presenten un desequilibri constitucional d'expressió al·lèlica i un percentatge no despreciable de dones sanes d'edat avançada mostren un patró clonal dels granulòcits [35]. Es desconeix encara si els estudis moleculars de clonalitat identificaran subgrups biològicament diferents amb expressivitat clínica diferent.

La **trombopoetina (TPO) i del seu receptor (c-Mpl)** sembla que siguin les claus de la regulació de la megacariopoesi en els ratolins i en l'home. Com que la TE es caracteritza per una megacariopoesi desregulada, existeix un interès especial en la dinàmica de la TPO i el seu receptor c-Mpl per intentar aclarir quelcom sobre la malaltia i potser ajudar en la difícil discriminació entre TE i trombocitosi reactiva.

Els nivells de TPO en sèrum, en persones control, són inversament proporcionals al recompte plaquetar de sang perifèrica i a la massa megacariocítica del moll d'os [36], però és més determinant la massa megacariocítica del moll d'os. Així, en l'aplàsia medul·lar per exemple, on el nombre de megacariòcits és baix i el recompte de plaquetes és baix, els nivells

de TPO en sèrum són alts. En canvi, en la púrpura trombocitopènica autoimmune, on el nombre de megacariòcits és alt i el recompte de plaquetes baix, els nivells de TPO són baixos [37].

Els primers estudis fets en la TE suggerien que els nivells de TPO en aquesta malaltia eren alts, dada no esperada degut a que, en la TE, la massa megacariocítica i el recompte plaquetar són elevats. Aquest fet va aixecar molt interès ja que semblava indicar que la desregulació de la cascada de transducció de senyals podia estar implicada en la patogènesi de la TE [38]. S'han suggerit diverses hipòtesis per explicar el perquè dels nivells alts de TPO en la TE: 1) una eliminació inefectiva de la TPO deguda a una marcada reducció de l'expressió del c-Mpl en les plaquetes i els megacariòcits [36, 39-41], 2) un augment de la producció de la TPO per les cèl·lules estromals del moll d'os [42], i 3) una alteració de la taxa catabòlica de la TPO [43]. De totes maneres, anàlisis posteriors han mostrat que, tot i que hi hauria una tendència general d'uns valors de TPO en sèrum aixecats en la TE, quan es comparen amb els valors de les trombocitosis reactives, aquestes xifres es solapen força, fet que fa que la TPO no sigui gaire útil a nivell de diagnòstic [44, 45]. En alguns estudis no s'han trobat diferències entre els valors de TPO dels pacients amb TE i els que tenen les persones hematològicament normals [41].

Els estudis del receptor c-Mpl semblen indicar que podria tenir un valor diagnòstic més prometedor, com a mínim si s'utilitza com a complement de l'assessorament morfològic. En la TE, l'expressió del c-Mpl dels megacariòcits i de les plaquetes està generalment disminuïda en comparació a la que s'obté en les persones hematològicament normals i a les trombocitosis reactives [39-41]. De totes maneres, la manca de sensibilitat i especificitat de la concentració circulant de TPO i de l'expressió del c-Mpl suggeriria que aquestes troballes serien més aviat un epifenomen que patogènicament rellevants [20, 39, 40]. En aquest moment no es disposa de prou informació que expliqui la complexa relació entre la TPO i el c-Mpl en la TE. Caldrà realitzar més estudis per clarificar aquesta relació.

L'estudi de les malalties hereditàries ha demostrat que la presència de mutacions en un únic gen pot originar una desregulació de la producció de plaquetes. En la trombocitèmia familiar s'han detectat quatre mutacions heterozigotes diferents situades a la regió 5' del domini regulador del gen de la

TPO; totes les mutacions produeixen un augment dels nivells proteics [46]. L'existència de mutacions sense sentit o la introducció prematura de codons stop en el receptor c-Mpl originarien una trombocitèmia congènita amegacariocítica [47]. La pèrdua total de l'expressió del c-Mpl en plaquetes s'ha demostrat com a mínim en alguns d'aquests pacients, però tots eren homozigots o portadors heterozigots, i els seus parents heterozigots eren asimptomàtics.

En la TE però, no s'han identificat mutacions equivalents, a les de la trombocitèmia familiar (regió 5' del domini regulador del gen de la TPO). Aquestes mutacions haguessin pogut explicar els nivells normals/aixecats de la TPO [48]; la seva absència, en canvi, reforça les hipòtesis anteriors:

- Les concentracions altes de la TPO s'originarien secundàriament a una eliminació inefectiva de la TPO deguda a una disminució de l'expressió del c-Mpl més que a un defecte intrínsec de la TPO per si mateixa [36, 39, 41];
- Altres citocines com la interleucina-6 o el factor de creixement- β , etc.. podrien contribuir en l'augment dels nivells de TPO, possiblement perquè estimularien la producció de TPO en llocs alternatius (ex. el factor de creixement- β induiria la síntesi de TPO per les cèl·lules estromals del moll d'os) [42]. Estudis recents suggereixen que aquests factors podrien estar implicats en l'aparició de mielofibrosi i/o angiogènesi en la TE [49].

1.3.2.3 Manifestacions clíniques

La TE era considerada, fins fa uns anys, la SMPC menys freqüent. La incorporació sistemàtica del recompte de plaquetes en els comptadors hematològics ha incrementat la freqüència diagnòstica de pacients asimptomàtics i de malalts joves. Tot i que no es disposa d'estudis prospectius sobre prevalència, en el nostre medi, és probable que actualment sigui la més freqüent de totes les SMPC. La seva incidència es calcula en 2-3 casos per 100.000 habitants i any. La mitjana d'edat en el moment del diagnòstic és de 60 anys i existeix un clar predomini femení (relació dona/home 1.6:1) [50], amb un pic d'incidència en la tercera-quarta dècada de la vida.

L'exploració física és relativament anodina, a excepció de la presència d'esplenomegàlia, que es palpa en un 15-25% de malalts. L'ecografia abdominal pot evidenciar, fins en un 50% de pacients, un augment moderat del volum esplènic.

Les principals causes de morbiditat i mortalitat en la TE són els episodis trombòtics i/o hemorràgics que apareixen amb freqüència durant el curs clínic de la malaltia [51]. Les complicacions relacionades amb l'hemostàsia més freqüents són:

A) **Eritromelàlgia:** és el paradigma de l'oclusió microvascular en la TE. Es tracta d'un fenomen trombòtic intravascular causat per l'activació i agregació plaquetària en les arterioles distals de les extremitats [52].

B) **Obstètriques:** la TE s'associa amb un major risc d'avortaments espontanis i retard en el creixement fetal, mort intrauterina i part prematur. Només un 57% dels embarassos aconsegueixen arribar a terme [53].

C) **Oclusives trombòtiques:** s'atribueixen a múltiples alteracions qualitatives plaquetàries (morfològiques, bioquímiques i funcionals) [54, 55].

D) **Hemorràgiques:** són molt menys freqüents que les trombòtiques i afecten de forma principal a l'aparell digestiu [56]. La púrpura equimòtica i els hematomes són les manifestacions hemorràgiques cutànies més freqüents.

E) **Microcirculació:** afecten de forma preferent al sistema nerviós central. Els símptomes neurològics i visuals atípics són causats per oclusions microvasculars en la circulació cerebral. [57, 58].

1.3.2.4 Dades de laboratori

Les **troballes hematològiques** més característiques a l'inici de la malaltia són la normalitat de l'hemoglobina i de l'hematòcrit, una leucocitosi moderada amb presència ocasional d'alguna forma mioeloides immadura i un índex de FAG variable. La basofília sol ser discreta i no supera el 3% de la fórmula leucocitària, a diferència de la PV. L'extensió de sang perifèrica demostra la presència d'agregats plaquetaris i la morfologia de les plaquetes pot estar alterada, amb presència d'anisocitosi plaquetària, plaquetes gegants, vacuolització i hipogranularitat. És possible observar fragments de citoplasma o nuclis de megacariòcits circulants. Amb tot, en alguns pacients gairebé no s'observen alteracions morfològiques plaquetàries [25].

El **mielograma** evidencia una intensa hiperplàsia megacariocítica. Les característiques principals de la **biòpsia medul·lar** consisteixen en: una cel·lularitat moderadament augmentada amb conservació del teixit adipós, una hiperplàsia megacariocítica a expenses de megacariòcits de mida gran, aspecte madur i nucli multilobulat que es disposen en petits acúmuls (*clusters*), i una trama de reticulina normal o discretament augmentada.

Entre les **alteracions bioquímiques** destaquen la hiperuricèmia en un 15-20% dels casos, l'augment de la vitamina B₁₂ en un percentatge similar i l'increment de la LDH i del potassi, causant d'una hiperpotassèmia espúrea [59].

1.3.2.5 Cultius *in vitro*

Els cultius *in vitro* de progenitors mieloides aporten informació bàsica en dos aspectes: 1) confirmen la naturalesa mieloproliferativa d'una trombocitosi que compleix criteris diagnòstics de TE, i 2) permeten el diagnòstic diferencial entre la TE i situacions de trombocitosi reactiva d'etiologia latent o oculta clínicament. En la TE, la gran majoria de pacients presenten creixement espontani de colònies eritroides i/o megacariocítiques, fenomen contrastat i confirmat i que s'ha proposat com a criteri de diagnòstic "positiu" de la malaltia. Florensa i col·laboradors van demostrar, en un estudi de 60 pacients afectes de TE, que el 91% presentaven creixement endogen de colònies eritroides i/o megacariocítiques circulants, mentre que aquest patró de creixement estava absent en les trombocitosis reactives i en els controls. Aquest fet suggeria que es tractava d'un trobolla freqüent i característica de la TE [60, 61] (Taula 7).

Taula 7. Creixement endogen de CFU-Meg i BFU-E en la trombocitèmia essencial i en la trombocitosi reactiva [60]

	CFU-Meg	BFU-E	CFU-Meg i/o BFU-E
TE (n=60)	38/60 (63.3%)	42/60 (70%)	55/60 (91.6%)
TR (n=10)	0/10	0/10	0/10
Control (n=21)	0/21	0/21	0/21

CFU-Meg: unitat formadora de colònies megacariocítiques; BFU-E: unitat formadora de colònies eritroides; TE: trombocitèmia essencial; TR: trombocitosi reactiva

1.3.2.6 Evolució

La història natural de la TE indica que, tot i tractar-se d'una SMPC, l'evolució a leucèmia aguda en els pacients que no reben tractament quimioteràpic és un fet molt poc freqüent, probablement inferior a l'1% [62]. Una revisió efectuada l'any 1994 sobre 50 casos de transformació aguda assenyalava que l'interval mig des del diagnòstic fins la transformació era de 6 anys i que els subtipus FAB més freqüents corresponien a M4 i M7 [63]. S'han descrit tots els subtipus citològics mieloides i també, però més rarament, leucèmies agudes limfoides i síndromes mielodislàsiques, tot això dins d'un context de tractament quimioteràpic. Les leucèmies agudes que apareixen en els pacients tractats amb hidroxiurea presenten, en la majoria dels casos, una deleció 17p o síndrome 17p, caracteritzada addicionalment per disgranulopoesi (vacuolització i pseudo-Pelger) i mutació de p53 [64].

En un 5-8% de pacients pot observar-se la transició a mielofibrosi posttrombotèmica i en un 5% de pacients una transformació a PV.

1.3.2.7 Pronòstic

Els estudis clínics retrospectius suggereixen que l'esperança de vida en la TE no és substancialment diferent a la d'una població control, tot i que algun estudi recent epidemiològic refereix una disminució de la supervivència [65]. Les diferents causes de mort en més de 2.000 pacients, i sobre un 9,6% de mortalitat global, es van repartir en un 3,1% per la trombotosi, un 0,3% per les complicacions hemorràgiques, un 1,1% per la transformació aguda i la resta per neoplàsies sòlides i causes desconegudes [66].

1.4. CITOGENÈTICA CONVENCIONAL, HIBRIDACIÓ IN SITU FLUORESCENT (FISH) I ALTRES MARCADORS BIOLÒGICS

1.4.1. Citogenètica convencional

Els estudis citogenètics en la PV i la TE es van començar a realitzar a les dècades dels seixanta i setanta. Aquests primers estudis utilitzaven tècniques de tinció homogènia (sense bandes), que no permetien definir amb seguretat les alteracions citogenètiques. Aquest fet fa que la casuística aportada per aquests estudis sigui poc valuosa [67-69]. Posteriorment es van utilitzar tècniques de tinció més modernes que permetien obtenir un patró de bandes típic per cada cromosoma (ex. bandes G) [70-82]. Aquests estudis van demostrar que la presència d'anomalies cromosòmiques (numèriques i/o estructurals) en la majoria de pacients amb PV i TE era força aleatòria i que hi havia poques alteracions específiques.

1.4.1.1. Policitemia vera

Al moment del diagnòstic, entre el 13-18% dels pacients presenten un cariotip alterat mitjançant tècniques de citogenètica convencional.

Mertens i col. (1991) van revisar la literatura i van recopilar més de 300 cariotips de pacients afectes de PV. D'entre tots ells, es van identificar menys d'una dotzena d'alteracions cromosòmiques recurrents entre les gairebé 90 alteracions descrites en els pacients cromosòmicament alterats. Per ordre de major a menor freqüència van ser: del(20q) (25%), trisomia 8 (16%), trisomia 9 (16%) (tampoc era rar trobar les dues trisomies 8 i 9 juntes en el mateix pacient), duplicacions de bandes inespecífiques d'1q o trisomies d'1q (10%), seguit per del(13q), del(11q), del(7q), del(5q) i trisomia 21. La pèrdua del cromosoma Y també era una alteració freqüent, però s'ha de tenir en compte per separat, ja que és una troballa coneguda en homes aparentment sans d'edat avançada. Aquest estudi concorda amb revisions similars que s'han anat fent posteriorment [83-85].

Tot i que la del(13)(q12q14) s'ha observat com a única alteració en pacients amb diferents malalties hematològiques, es detecta sobretot en situacions de mielofibrosi, fet que suggereix que ambdues troballes podrien estar relacionades.

Les delecions i/o monosomies dels cromosomes 5 i 7 s'han descrit principalment en pacients que han estat sotmesos a teràpia mielosupressora i amb freqüència formen part d'un cariotip complex. Per aquest motiu es creu que aquestes alteracions no estarien relacionades amb l'etiologia de la PV.

Respecte la incidència i tipus d'alteracions, s'ha vist que varien considerablement en funció de la fase de la malaltia en que es fa l'estudi. El percentatge de pacients amb alteracions citogenètiques al diagnòstic oscil·la entre un 10-20%. Aquest percentatge augmenta com més avançada és la fase de la malaltia i també quan els pacients reben tractament mielosupressor. Per exemple, aquells pacients que desenvolupen mielofibrosi, i encara més aquells pacients que sembla que evolucionen a mielodisplàsia o leucèmia aguda, tenen alteracions cromosòmiques amb més freqüència i poden arribar a ser presents en un 70-90% dels pacients en transformació blàstica. En aquestes fases avançades de la malaltia és quan també podem trobar els cariotips més complexes [70-75, 83].

La utilitat clínica de l'anàlisi cromosòmica en la PV és limitada. Si el cariotip és alterat permetrà descartar eritrocitosis degudes a processos reactius. Si el cariotip és normal, com passa en la majoria dels casos, només serà útil quan ens trobem davant d'un cas que presenta característiques de leucèmia mieloide crònica, ja que l'absència de la $t(9;22)(q34.1;q11.2)$ ens ajuda a eliminar la possibilitat que es tracti d'aquesta malaltia. Tot i això, no podrem diferenciar una PV d'una metaplàsia mieloide o d'una trombocitèmia essencial.

Actualment, el significat patobiològic i molecular d'aquestes anomalies segueix essent desconegut, per tant, cap alteració pot explicar encara el perquè a la PV, les cèl·lules BFU-E, GM i CFU-Meg tenen una alta hipersensibilitat a la IL3 o perquè els precursors eritroides circulants són també hipersensibles als factors de creixement tipus insulina 1 (ILGF-1), entre d'altres dilemes.

1.4.1.2. Trombocitèmia essencial

Els estudis fets en pacients afectes de TE mostren que entre el 5% i 10% dels casos presenten alteracions cromosòmiques al diagnòstic; les alteracions del cariotip normalment s'originen durant la transformació a leucèmia aguda [86]. No s'ha observat cap marcador genètic consistent en la TE, i moltes de les alteracions cromosòmiques trobades en la fase preleucèmica de la TE s'han vist també en altres SMPC. De la majoria d'aquestes anomalies cromosòmiques que es troben en la TE i altres SMPC no se'n coneix el gen o gens responsables del fenotip clínic.

Els diferents casos descrits a la literatura han relacionat la TE amb alteracions de gairebé tots els cromosomes (Taula 8) [87-108]. La majoria dels cariotips de la TE són diploides o amb alguna aneuploidia i rarament s'han descrit cariotips hiperdiploides.

La sèrie més llarga de pacients amb TE amb resultat citogenètic es va presentar al "Third International Workshop on Chromosomes in Leukemia", on es va revisar la citogenètica convencional de 170 pacients afectes de TE i només es van trobar 9 casos (5.3%) que presentessin alguna alteració cromosòmica [109].

Entre les alteracions citogenètiques més descrites en la TE [85] trobem les delecions dels braços llargs dels cromosomes 20 (del(20q)) i 13 (del(13q)) i les trisomies 8 i 9 (com en la PV).

Una altra alteració cromosòmica descrita en la TE, no sense haver generat controvèrsia, ha estat la t(9;22)(q34.1;q11.2) [110-114]. Aquesta translocació però, és característica de la leucèmia mieloide crònica (LMC). Per aquest motiu des de fa uns anys s'ha generat el dilema de si aquests casos de TE amb t(9;22) s'haurien de reinterpretar com LMC amb presentació atípica de la malaltia. Fins i tot alguns criteris diagnòstics [31] han incorporat el requisit que no ha d'estar present la t(9;22) per poder establir el diagnòstic de TE. Aquesta decisió s'ha vist reforçada per estudis recents mitjançant tècniques de biologia molecular. Damaj i col. l'any 2002 van estudiar 121 pacients afectes de TE mitjançant una RT-PCR múltiple capaç de detectar tots els possibles reordenaments dels gens BCR/ABL [115]. Dos dels 121 pacients presentaven la proteïna de fusió p210. Owen i col. l'any 2003 van analitzar 151 pacients afectes de TE, 126 per citogenètica convencional i 90 per RT-PCR [116]. Cap

dels 126 pacients presentava la $t(9;22)(q34.1;q11.2)$ ni cap dels 90 pacients presentaven la proteïna de fusió p210.

Els dos pacients de la sèrie de Damaj G i col. [115] i moltes de les suposades TE amb cromosoma Filadèlfia, presenten en sang perifèrica leucocitosi, basofília, cèl·lules mieloides immadures i absència de megacariòcits grans hiperlobulats [117,118], característiques típiques de la LMC.

La citogenètica convencional en els pacients afectes de TE té, per tant, un percentatge baix d'èxit a l'hora de detectar alteracions cromosòmiques, però és molt útil per detectar aquells pacients afectes de LMC d'inici trombocitèmic, ja que permet posar de manifest la $t(9;22)$. Això és de gran ajut per evitar diagnòstics erronis de TE. De manera poc freqüent podrem trobar algun cas on la citogenètica convencional no detecti la $t(9;22)$ [118]; en aquests casos serà útil aplicar les sondes que detecten el reordenament BCR/ABL mitjançant la hibridació in situ fluorescent [119].

1.4.1.3. Cariotip i progressió de la PV i ET

El fet d'observar pacients afectes tant de PV com de TE amb un major percentatge d'anomalies cromosòmiques en fases avançades que al moment del diagnòstic suggereix que els estadis inicials de la malaltia no presenten cap anomalia cromosòmica detectable que pugui ser considerada com una lesió primària, ni que tingui un paper patofisiològic en la PV o la TE similar al que té la $t(9;22)(q34.1;q11.2)$ en la leucèmia mieloides crònica. Pel contrari, es creu que hi ha altres factors genètics o biològics implicats en l'origen i progressió primerenca de la PV i la TE. L'alta activitat mitòtica i la natura mieloproliferativa d'aquestes entitats podrien predisposar al pacient a desenvolupar alteracions cromosòmiques, algunes de les quals tindrien potencial neoplàsic. Per tant, sembla que les alteracions cromosòmiques s'originen en cèl·lules que prèviament ja eren malignes i en alguns casos la inestabilitat genòmica d'aquestes cèl·lules podria veure's potenciada per qualsevol tractament mielosupressor que, a més, també pot causar alteracions directes del material genètic. Les alteracions cromosòmiques més freqüents associades a tractament impliquen anomalies dels cromosomes 5 o 7, o de tots dos, i translocacions desequilibrades derivades de la $t(1;7)(p11;p11)$ [75, 120].

Taula 8. Compendi de les anomalies cromosòmiques descrites en la TE

Cromosoma	Cariotip	Referència
1	46,XY,dup(1)(q21q32)	[87]
	46,XY,dup(1)(q11q42)	[88]
	46,XX,dup(1)(q11q44)	[89]
	46,XX,+der(1)t(1;7)(p11;p11),-7,+21,der(21;21)(q10;q10)	[90]
	46,XX,+der(1)t(1;7)(p11;p11),-7	[91]
	46,XX,+1,der(1;7)(q10;p10)/47,idem,+21	[92]
3	46,XX,inv(3)(q21q26)	[93]
	46,XX,inv(3)(q21q26)	[94]
5	46,XX,ins(12;5),del(20)(q11q13)	[95]
7	46,XX,+der(1)t(1;7)(p11;p11),-7	[90]
	46,XX,+der(1)t(1;7)(p11;p11),-7	[91]
	46,XX,+der(1)t(1;7)(p11;p11),-7 /	[90]
	46,XX,+der(1)t(1;7),-7,+21,der(21;21)(q10;q10)	
	46,XX,+der(1)t(1;7)(p11;p11),-7	[91]
	46,XY,del(7)(q11q22)/45,X,-Y	[96]
8	46,XX,+1,der(1;7)(q10;p10)/47,idem,+21	[92]
	47,XX,+8/47,XX,+9	[97]
	47,XX,+8	[98]
9	47,XY,+8	[98]
	47,XX,+8/47,XX,+9	[97]
	47,XX,+9	[97]
	47,XY,+9	[97]
12	47,XX,+9	[97]
	46,XX,ins(12;5),del(20)(q11q13)	[95]
13	46,XY,del(13)(q12q14),del(20)(q11q13),+0-1mar	[100]
17	46,XX,del(17)(q24q25)	[101]
	46,XY,del(17)(q24q25)	[101]
	42-45,XY,-21/40-45,XY,-17/40-45,X,-Y	[102]
20	46,XY,del(20)(q11)	[103]
	46,XX,del(20)(q11)	[104]
	46,XY,del(20)(q11)	[105]
	46,XY,del(20)(q11q13)	[101]
	46,XX,ins(12;5),del(20)(q11q13)	[95]
	46,XY,del(13)(q12q14),del(20)(q11q13),+0-1mar	[100]
	46,XY,del(20)(q11q13)	[106]
	45,X,-Y,-20,+mar	[88]
45,XX,-20	[107]	
21	46,XX,+der(1)t(1;7),-7,+21,der(21;21)(q10;q10)	[90]
	47,XX,+21,i(21)(q10)x2	[108]
	46,XX,+1,der(1;7)(q10;p10)/47,idem,+21	[92]
	42-45,XY,-21/40-45,XY,-17/40-45,X,-Y	[102]
Y	45,X,-Y	[98]
	46,XY,del(7)(q11q22)/45,X,-Y	[96]
	45,X,-Y,-20,+mar	[88]
	42-45,XY,-21/40-45,XY,-17/40-45,X,-Y	[102]

Informació obtinguda de la base de dades "Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer. Mitelman F, Johansson B, Mertens F (eds), <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>." Accedit març de 2004.

Els pacients amb més d'una alteració que impliqui més d'un cromosoma s'han repetit tants cop com número de cromosomes implicats.

Quan els punts de trencament no estan especificats és perquè a l'article original no apareixen.

1.4.1.4. Valor pronòstic de la citogenètica convencional

Respecte el valor pronòstic de la citogenètica convencional en aquestes malalties, tot i que hipotèticament un cariotip normal tindria un millor valor pronòstic [75] també podem trobar cariotips normals en leucèmies agudes terminals. Cal esmentar que la majoria de cariotips alterats també mantenen durant anys un patró clínic-hematològic inalterable. A més, durant l'evolució de la malaltia hi ha molt poques anomalies que anunciïn la progressió i fins el moment, sigui quina sigui la classe de leucèmia aguda, el pronòstic és sempre molt dolent.

1.4.2. Hibridació in situ fluorescent

La tècnica d'hibridació in situ fluorescent (FISH) permet detectar alteracions cromosòmiques concretes en cèl·lules en estat d'interfase. Al contrari que la citogenètica convencional, la FISH no depèn de que la cèl·lula tumoral entri en divisió, i per tant, no està influenciada per l'eficiència de divisió de la cèl·lula tumoral. Així doncs, la FISH no requereix d'un cultiu in vitro, i pot aplicar-se sobre material guardat en fixador. Per altra banda, aquesta tècnica es basa en la detecció de senyals de fluorescència sobre els nuclis o metafases, i no en la interpretació morfològica d'alteracions cromosòmiques complexes o subtils. Tot això fa que la FISH sigui una tècnica més sensible i fàcil d'utilitzar que la citogenètica convencional, en la detecció de marcadors específics.

1.4.2.1 Policitemia Vera

Els estudis de FISH en pacients afectes de PV s'han fet tant sobre cèl·lules procedents tant de sang perifèrica com de moll d'os i s'han utilitzat les quatre sondes que permeten detectar les alteracions cromosòmiques més freqüents en la PV per citogenètica convencional (+8, +9, del(20q) i del(13q)). El percentatge de pacients amb alteracions cromosòmiques que es detecten mitjançant la tècnica de FISH varia entre 14.3% i 71.5% en funció de cada sèrie [121-127]. La Taula 9 mostra un resum d'aquests resultats.

Taula 9. Relació de de les diferents series que inclouen pacients amb PV

Sèrie	Nº casos	Sondes utilitzades	Tractats	Mostra	Nivell de tall	Alterats FISH	Alterats CC
[121]	14 SMPC	CEP8	-	mo	2%	2/14 (14.3%)	0
[122]	14 PV	CEP8; CEP9	14/14	sp (total)	4.9%; 4.9%	10/14 (71.5%)	7/14 (50%)
[124]	64 PV	CEP8; CEP9; 20q12	46/64	sp (grànuls)	1.7%; 1.8%; 4.9%	15/64 (23.4%)	7/23* (30.4%)
[126]	53 PV	CEP8; CEP9; 9p21; 20q12; 13q14	NE	mo	1.5%; 1.5%; 1.7%; 1.8%; 1.2%	15/53 (28.3%)	12/51 (23.5%)
[127]	26 PV	CEP8; CEP9; 9p21; 20q12; 13q14; 19q13.12	NE	mo	1.5%; 1.5%; 1.7%; 1.8%; 1.2%; -	11/21 (52%)	12/26 (46%)

CC: citogenètica convencional; SMPC: síndromes mieloproliferatives cròniques; CEP: sonda centromèrica; NE: no específica el número de casos tractats; sp: sang perifèrica; mo: moll d'os. *La CC en moll d'os va detectar 4 pacients amb del(20q) que la FISH en sang perifèrica no va detectar

La concordància entre FISH i citogenètica convencional no és igual en totes les sèries, però sí que en gairebé tots els estudis, la FISH detecta un discret però major número d'alteracions que la citogenètica convencional. Això indica que la FISH és una tècnica més sensible que la citogenètica convencional a l'hora de detectar marcadors específics i que per tant, en pacients amb un hematòcrit elevat i cap causa que indiqui una possible eritrocitosi secundària podria ser útil, ja que la troballa d'una alteració cromosòmica farà que el diagnòstic de PV sigui gairebé segur.

En la sèrie de Westwood i col. [124], en canvi, la citogenètica convencional detecta un major percentatge de pacients amb alteracions que la tècnica de FISH. Això és degut a que l'estudi de FISH es va realitzar directament sobre granulòcits de sang perifèrica mentre que la tècnica de citogenètica convencional és va fer sobre cèl·lules de moll d'os. En quatre pacients d'aquesta sèrie la FISH no va detectar cap deleció de 20q, mentre que la citogenètica convencional sí que ho va evidenciar. L'existència de pacients amb deleció de 20q en cèl·lules de moll d'os i no en granulòcits de sang perifèrica ja

havia estat descrita amb anterioritat en pacients afectes de PV i síndromes mielodisplàsiques [125]. En aquests casos s'ha postulat que els granulòcits que porten la del(20q) serien una subclona preferencialment destruïda o que es quedaria retinguda al moll d'os i no sortiria a sang perifèrica. Aquest fenomen posa de manifest que estudiar la sang perifèrica amb tècniques de FISH no és equiparable a fer l'estudi en cèl·lules de moll d'os ja que es pot estar obviant la detecció d'algunes anomalies cromosòmiques de la línia mieloide.

El percentatge d'alteracions (71.5%) detectades amb la utilització de sondes de FISH (CEP8 i CEP9) a l'estudi d'Amiel i col. [122], és molt més alt que el que troben els altres estudis [121,124,126], 14.3%; 23.4% i 29.4%, respectivament. El 71.5% podria estar sobreestimat perquè, per una banda, la sèrie d'Amiel i col. [122] és la sèrie que inclou més pacients que rebien tractament amb hidroxiurea i/o ^{32}P en el moment de fer l'estudi (14/14). Per altra banda, quatre dels 10 pacients que es van considerar alterats tenien un percentatge de trisomia 8 o 9 (5%, 5%, 5% i 6%) just en el nivell de tall que van establir després d'estudiar tres individus sans (4.9%). En les altres sèries en canvi, els pacients alterats tenen un percentatge de trisomia 8 o 9, o deleció de 20q més allunyat del nivell de tall.

Najfeld i col. [126] és l'únic grup que estudia guanys de 9p i posen de manifest que el 53% de pacients cromosòmicament alterats, després de l'estudi de FISH, tenien guanys de 9p, ja fos com a trisomia completa del cromosoma 9, com a tetrasomia 9p o com a $\text{der}(9)\text{t}(1;9)(\text{q}12;\text{q}12)$. Això representa que el guany de 9p és l'alteració genòmica més freqüent en aquesta sèrie. Igualment, aquest grup és l'únic que fa un seguiment seqüencial dels pacients d'entre 1.5 a 178 mesos i demostren que 9 casos que al moment del primer estudi tenien un cariotip normal, passat aquest temps desenvolupaven una alteració. Això representa que gairebé el 41% dels seus pacients que estaven sotmesos a un seguiment citogenètic van desenvolupar una alteració cromosòmica. El significat d'aquest fet encara no està clar, ja que uns altres 12 pacients que van ser estudiats durant 138 mesos seguien mantenint un cariotip normal.

Per una altra banda, Najfeld i col. [126] també van observar que set pacients que tenien un cariotip alterat mantenien la mateixa alteració durant més de 10 anys sense afegir cap altra alteració. Això suggereix que algunes alteracions cromosòmiques (en aquest estudi la trisomia 9 i la deleció de 20q) són estables

i no predisposen a l'aparició d'altres canvis. Per tant, la presència de qualsevol d'aquestes dues anomalies en un pacient no seria suficient per provocar una transformació a leucèmia aguda, sinó que caldria una segona alteració cromosòmica i/o alteració genètica.

L'estudi més recent de Najfeld i col. [127] utilitza, a més de les sondes d'hibridació in situ utilitzades clàssicament en la PV (#8, #9, 20q12; 13q14), una nova sonda localitzada a 19q13.12-3 que equival a la regió on està situat el gen ***Polycythemia Rubra Vera-1 (PRV-1)***. Aquest gen ha estat molt estudiat per tècniques de biologia molecular ja que està sobreexpressat en la PV i no en eritrocitosis secundàries (ES), trombocitosis secundàries (TS) ni individus sans [128-134]. El resultat de Najfeld i col. [127], després d'aplicar la tècnica de FISH, mostren que cap dels pacients estudiats tenen una deleció, translocació o amplificació del gen PRV-1. Aquests resultats indicarien que la sobreexpressió d'aquest gen detectada per PCR seria deguda a algun epifenomen com una activació aberrant d'algun factor de transcripció [135].

1.4.2.2. Trombocitèmia essencial

Hi ha pocs estudis fets sobre l'utilitat de la FISH en pacients afectes de TE. L'any 1996, Elis i col. [136] van fer un estudi sobre sang perifèrica amb sondes centromèriques pels cromosomes 8 i 9 en 18 pacients afectes de TE. Dotze d'aquests pacients estaven tractats amb hidroxiurea. La citogenètica convencional, en sang perifèrica (3 dies de cultiu sense mitogen), només va mostrar un pacient amb un cariotip alterat (46,XY,16q-), mentre que la FISH va posar de manifest cinc pacients amb trisomia 8 i uns altres cinc pacients diferents amb trisomia 9. La FISH va trobar trisomia 8 o trisomia 9 en 10 dels 18 pacients (55%). Pel contrari Swolin B i col. [102] van fer un estudi sobre moll d'os amb sondes centromèriques pels cromosomes 8 i 9 en 22 pacients afectes de TE. Dos d'aquests pacients estaven tractats, un amb hidroxiurea i l'altre amb interferó, i en els altres 20 pacients es va fer l'estudi al moment del diagnòstic. La citogenètica convencional va mostrar quatre pacients amb un cariotip alterat (46,XX,t(1;17)[12]/ 47,XX,t(1;17),+8[8]; 42-45,XY,-21/ 40-45,XY,-17/ 40-45,X,-Y/ 46,XY; 45,XX,-8[3]/ 46,XX[12]; 48,XX,+mar1,+mar2), mentre que la FISH va posar de manifest dos pacients amb trisomia 8 (una trisomia ja s'havia vist per

citogenètica convencional i a l'altre cas va permetre identificar un dels cromosomes marcadors com a cromosoma 8).

Aquests dos estudis difereixen entre si ja que a l'estudi d'Elis i col. [136] la FISH permet detectar un 55% d'alteracions, mentre que a l'estudi de Swolin i col. [102], la FISH no posa de manifest cap alteració nova. Aquestes diferències són degudes a que els pacients incorporats en cada estudi són molt diferents; en el primer estudi, els pacients feia molt de temps que se'ls havia diagnosticat la TE (rang 1-13 anys) i la gran majoria d'ells havien rebut tractament mielosupressor (7 dels 10 pacients alterats rebien tractament amb hidoxiurea). En canvi, en el segon estudi en 20 dels 22 pacients l'estudi citogenètic es va fer en el moment de diagnòstic i no havien rebut cap tractament. Aquests resultats indicarien que l'efecte leucemogènic dels fàrmacs seria el causant de l'aparició d'un major nombre d'alteracions citogenètiques o que els pacients que tenen una malaltia en progressió, i per tant requereixen un tractament més agressiu, tenen més probabilitats de desenvolupar alteracions citogenètiques.

1.4.3. Característiques de les alteracions cromosòmiques més freqüents en la PV i TE

- **Trisomia dels cromosomes 8 i/o 9**

Entre el 15% i 20% dels pacients amb PV i entre el 1% i 2% dels pacients amb TE presenten aquestes trisomies, en la majoria dels casos com a única alteració. La troballa d'ambdues trisomies conjuntament és també força freqüent, fins i tot en absència de canvis addicionals. De fet, la combinació de trisomia 8 i 9 pot persistir sense que hi hagi evolució clonal ni evolució a leucèmia aguda durant més de dues dècades [84, 85, 137].

Per detectar trisomies del cromosoma 8 en SMPC és molt útil la tècnica de FISH amb la sonda centromèrica per aquest cromosoma, ja que ens permet analitzar mostres amb poques metafases o de baixa qualitat.

L'aplicació d'aquesta tecnologia ha proporcionat una sèrie d'observacions interessants:

- En alguns pacients s'ha suggerit que les cèl·lules amb trisomia 8 tenien una avantatge proliferativa sobre les cèl·lules amb dos cromosomes 8, com a mínim en els cultius in vitro, ja que la freqüència de cèl·lules amb tres cromosomes 8 és més elevada en metafases de moll d'os que sobre nuclis en interfase [123, 138, 139].
- En alguns pacients, on la citogenètica convencional no havia detectat trisomia 8, la FISH sí que detecta subclones poc representades [121], indicant que la trisomia 8 podria ser més freqüent del que originalment s'havia pensat.

La combinació de la FISH amb l'immunofenotip ha permès seguir la implicació de línia de la trisomia 8. Price i col. van demostrar que la trisomia 8 estava present en la majoria de colònies BFU-E i CFU-GM de dos pacients amb PV. A més, també estava present en les cèl·lules CD34+ i cèl·lules mieloides madures però no en els limfòcits [140].

La conseqüència genètica de les duplicacions del cromosoma 8 no és clara. No s'ha fet cap mapatge molecular, però el fet de trobar còpies addicionals de 8q en leucèmies agudes mieloides (LAM) [141] i leucèmies mieloides cròniques en crisis blàstica, suggeriria que al braç llarg del cromosoma 8 hi hauria algun gen o gens crítics per aquestes malalties. El protooncogen c-MYC, situat a 8q, s'ha demostrat que està present en forma de dobles diminuts en un nombre baix de LAM [142]. Els dobles diminuts contenen segments amplificats de l'ADN, però la mida de la zona amplificada varia i en aquests casos de LAM no s'han mapat. Per aquest motiu no està clar si el gen c-MYC o algun altre gen pròxim a aquest tindrien alguna rellevància en aquestes malalties.

En la PV, s'han identificat trisomies completes del cromosoma 9, però també és freqüent trobar guanys de **9p**, ja sigui en forma de trisomia o tetrasomia [126]. La trisomia de 9p també s'ha associat a la trisomia parcial o total d'1q ja que fins el moment s'han descrit dotze casos de t(1;9) en pacients afectes de PV [68, 73, 74, 143-146]. Aquestes troballes i el fet que gairebé no es troben trisomies 9 per FISH o hibridació genòmica comparada en la trombocitèmia essencial, recolzen la hipòtesi de Chen i col. [146] que suggereixen que l'amplificació d'un o diversos gens de 9p, i no de 9q, tindrien un paper important en la patogènesi de la PV.

Alguns gens candidats proposats fins el moment són: l'interferó α [147], el receptor de la tirosina cinasa específic de proteïna endotelial (*TEK*) [148], el receptor de cadenes alfa de la interleucina 11 humana (*IL11RA*) [149,150] i l'inhibidor-2A de cinasa dependent de ciclina (*CDKN2A* o *p16*) [151]. Les delecions o mutacions del gen *CDKN2A* han estat descrites en una gran varietat de càncers. Fan falta més estudis moleculars per identificar exactament quins gens serien els implicats en la patogènesi de la PV.

- **Delecions de 20q**

La incidència de delecions del braç llarg del cromosoma 20 en la PV varia del 5% al 30% en funció de cada estudi, mentre que en la TE es dona entre el 0.2% i el 0.5% dels pacients.

Alguns estudis suggereixen que la delecio de 20q és més comú en pacients que reben tractament mielosupressor, però aquest fet no s'ha pogut confirmar ja que també es dona amb igual freqüència en pacients no sotmesos a aquest tractament. A més de la PV i la TE, les delecions a 20q també es troben en aproximadament el 4% de pacients amb síndromes mielodisplàsiques (SMD) i en 1-2% de leucèmies agudes mieloides (LAM). En canvi, rarament es troben en patologies limfoides. Aquest patró d'associació suggereix que la regió delecionada de 20q dona lloc a la pèrdua o inactivació d'un o més gens encarregats de la regulació dels progenitors hemopoètics [152]. Amb l'ajut de tècniques de bandes G d'alta resolució i pintat cromosòmic revers, Nacheva i col. [106] van establir una regió comuna delecionada (RCD) a nivell citogenètic que anava de 20q11.2 a 20q13.1. Posteriorment, amb l'ajut de sondes d'hibridació in situ, PCR de microsatèl·lits i tècniques de Southern Blot s'ha demostrat que existeix heterogeneïtat tant en el punt de trencament més proximal al centròmer com en el més distal [153, 154]. Aquest fet també reafirma la hipòtesi que la RCD conté un o més gens supressors de tumors. El mecanisme que originaria amb major freqüència la pèrdua d'heterozigositat a 20q seria una delecio intersticial més que una recombinació mitòtica [152].

El fet que les SMPC i les SMD siguin clínicament diferents fa possible que hi hagi gens diferents o addicionals implicats en les dues malalties. Per aquest motiu és normal que s'hagin definit dos RCD superposables. La RCD de les SMD comprèn una regió de 7-8 megabases (Mb), mentre que la RCD de les SMPC és una mica més gran, unes 8-9 Mb. Ambdues regions comparteixen una zona de 2 Mb (Figura 2) [155-157].

Els mapatges físics d'aquesta regió del cromosoma 20 han identificat un total de 36 seqüències amb expressió, 12 d'elles corresponen a gens coneguts [155], entre els que hi ha gens que codifiquen per factors de transcripció (*Mafk*, *MYBL2*, *TCF14*) i per components de la senyals de transducció (*PLCG1*, *YWHAB*).

Figura 2. Esquema del mínim segment comú delecionat en SMPC i MDS a 20q

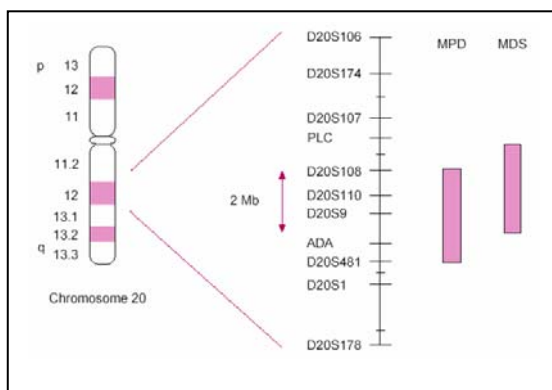
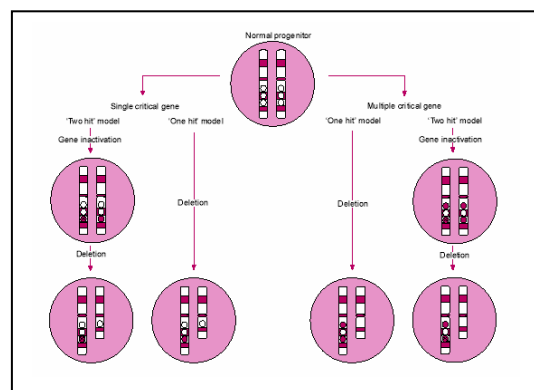


Figura 3. Possibles mecanismes implicats en la patogènesi de les delecions a 20q



Hi ha diferents hipòtesis que intenten explicar com la pèrdua/inactivació d'aquests gens candidats intervindrien en la patogènesi d'aquestes malalties [152]. Una d'aquestes hipòtesis és la de Knudson [158] que consisteix en la inactivació d'una de les còpies d'un únic gen candidat com a causa d'una alteració genètica (ex. mutació puntual), seguit per la pèrdua de la segona còpia degut a una delecio. Una altra alternativa seria que la còpia "intacta" es silenciï, per exemple per metilació, com s'ha demostrat que succeeix en els gens *VHL*, *p16* i *p15* implicats en altres leucèmies [159-161]. De totes maneres, la pèrdua d'una única còpia del gen ja hauria de tenir, per si sola, algun efecte patogènètic (cada cop es descriuen més exemples on l'haploinsuficiència influeix l'aparició de tumors). Tot i això, seria necessària la pèrdua/inactivació de dos o més gens perquè aparegués el fenotip de la malaltia (Figura 3).

Alguns estudis recents suggereixen que les delecions a 20q identificarien un subtipus de malalties mieloides caracteritzades per displàsia megacariocítica i mieloide. Kurtin i col. [100] van fer un estudi amb 78 pacients portadors de del(20q) com a única alteració cromosòmica i va demostrar que tots els pacients amb SMPC i 46 dels 47 pacients amb SMD mostraven displàsies megacariocítiques i el 45% dels pacients amb SMPC i els 87% de SMD tenien diseritropoesi. Per contra, cap pacient amb SMPC i només el 19% dels pacients amb SMD tenien displàsia granulocítica. Per això van postular que les delecions de 20q identificaven un subgrup de malalties mieloides caracteritzades per displàsia megacariocítica i eritroide. Aquest estudi, però, ha rebut varies crítiques perquè no van incloure pacients sense la del(20q) com a controls. En conclusió i a la vista dels resultats obtinguts pels diferents grups es pot dir que fan falta nous estudis.

Respecte el valor pronòstic de la del(20q) en les SMPC, no hi ha cap conclusió definitiva degut al nombre limitat de pacients estudiats. Amb la informació que es té en aquests moments no hi hauria diferències entre la taxa de supervivència dels pacients portadors de la delecio i la dels que són normals [104, 162]. Un estudi fet per Aatola i col. amb 18 pacients amb SMPC [103] tampoc va trobar correlació entre el percentatge de metafases portadores de delecions a 20q i la taxa de supervivència.

- **Delecions de 13q**

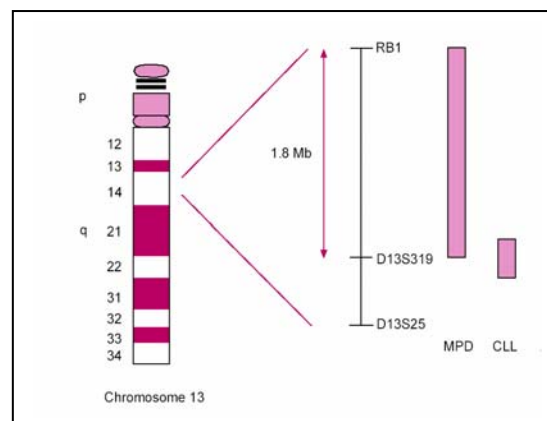
Menys d'un 10% dels pacients amb PV i un 0.7% dels pacients amb TE presenten una delecio del braç llarg del cromosoma 13. La delecio s'ha interpretat alguns cops com a terminal i altres vegades com a intersticial, i s'han implicat la majoria de bandes de 13q com a possibles punts de trencament.

En el cas que el mecanisme implicat en l'aparicio de la del(13q) en les SMPC tingui com a conseqüència una pèrdua d'activitat antioncogènica, llavors el gen del retinoblastoma (*RB1*) situat a 13q14, seria un dels candidats a tenir un paper patogenètic. No es coneixen però, mutacions que afectin el gen del RB en les SMPC.

La caracterització citogenètica sovint careix de precisió, però la majoria de leucèmies, mielodisplàsies i SMPC amb una del(13q) sembla que comparteixin la pèrdua de 13q14. Mapatges físics amb YACs d'aquesta regió estimen que la mínima regió comuna delecionada tindria aproximadament 1.5Mb [163,164]. Aquesta regió es sobreposa parcialment amb la regió comuna delecionada en la leucèmia limfàtica crònica (LLC), malaltia on també trobem freqüentment delecions a 13q (Figura 4). De totes maneres, les SMPC tenen una biologia tan diferent a la de la LLC que es creu que els gens implicats en cada patologia serien diferents.

Fins el moment no hi ha cap estudi que tingui en compte el valor pronòstic d'aquestes delecions en la PV [137].

Figura 4. Resum de la regió comuna delecionada a 13q tant en SMPC com en LLC. En la LLC s'han descrit tres regions diferents (A, B i C)



- **Guany d'1q**

Un 10% dels pacients amb PV i un 0.2% dels pacients amb TE presenten algun tipus de reordenament el resultat del qual és un guany del material d'1q.

En la majoria dels casos trobem la presència d'un cromosoma 1 extra que té delecionat el braç curt prop del centròmer. En un percentatge menor de casos, la trisomia parcial està causada per duplicacions o translocacions que involucren un segment d'1q supernumerari, normalment des d'1q22 a 1qter [144], o per translocacions desequilibrades com der(1)t(1;9) que origina una trisomia d'1q i de 9p [145].

Amb l'ajut de bandes G s'ha identificat com a regió comuna delecionada el segment que va d'1q23 a 1q32. És necessari realitzar estudis moleculars que estableixin una regió més concreta.

S'han trobat dup(1q) en tots els estadis de la malaltia (diagnòstic, progressió,...), per tant no està clar si existeix alguna relació entre la trisomia 1q i una fase més avançada de la malaltia, una major necessitat de tractament o una major progressió a leucèmia aguda.

1.4.4. Altres marcadors biològics

Degut al nombre baix de pacients afectes de PV i TE amb alteracions cromosòmiques al moment del diagnòstic (obtingudes tan per citogenètica convencional com per FISH) s'ha iniciat la recerca de nous biomarcadors mitjançant tècniques moleculars.

1.4.4.1. Gen del receptor androgènic humà (HUMARA)

L'anàlisi del patró d'inactivació del cromosoma X (*X-chromosome inactivation pattern*, XCIP) és una bona eina per determinar l'existència d'una hemopoesi clonal. Durant l'embriogènesi femenina es produeix una inactivació a l'atzar d'un dels dos cromosomes X; aquest procés es realitza per prevenir una doble dosi, que seria letal, dels gens localitzats al cromosoma X. Aquest fenomen es coneix amb el nom de Lyonització [165]. Una vegada es fixa la inactivació d'un dels dos cromosomes X, es manté sempre estable, i la descendència de cada cèl·lula heredarà el mateix cromosoma X inactiu en cada futura ronda de mitosis. Com a resultat d'aquest procés, l'expressió dels gens localitzats al cromosoma X es realitza en forma de mosaic pel cos femení en funció de quin cromosoma X tingui inactiu cada cèl·lula. Com que la inactivació del cromosoma X es fa a l'atzar, si estudiéssim el XCIP d'un teixit en particular, seguiria una distribució Gaussiana amb una mitja del 50%. Pel contrari, quan un teixit esdevé neoplàsic, hi ha una inactivació preferent d'un dels cromosomes X. S'ha establert arbitràriament la definició de població clonal com l'expressió 3:1 dels gens d'un dels cromosomes X respecte de l'altre.

Existeixen dos requeriments per realitzar l'anàlisi de clonalitat mitjançant XCIP:

1. La capacitat d'establir quin és el cromosoma X actiu i quin l'inactiu: les formes actives i inactives dels gens del cromosoma X es poden diferenciar perquè els extrems 5' dels residus de citosines d'aquests gens presenten un patró de metilació diferent [166, 167]. Aquestes regions estan metilades quan els gens estan inactius i desmetilades quan els gens estan actius. Per tant, si apliquem un enzim de restricció sensible a la metilació (ex. HpaII) en un teixit clonal, perdrem el fragment que correspongui al gen actiu que estiguem estudiant, ja que estarà desmetilat i l'enzim de restricció el podrà tallar, mentre que en un teixit no clonal obtindrem una reducció equiparable de cada un dels dos fragments, que corresponen al gen actiu i inactiu.
2. La capacitat de diferenciar el cromosoma patern del matern: al llarg del temps s'han utilitzat diferents gens polimòrfics per diferenciar els dos cromosomes X. El primer va ser el gen de la glucosa-6-fosfat deshidrogenasa (G6PD), però la baixa freqüència d'heterozigots (30%) va suposar una limitació per l'aplicació de la tècnica. Després d'aquest polimorfisme, a nivell d'ADN, s'han utilitzant d'altres cada vegada amb un major grau d'heterozigositat: fosforibosil cinasa (PGK) amb una heterozigositat del 30-50%, hipoxantin fosforibosil transferasa (HPRT) amb una heterozigositat del 30-50% i més recentment, el receptor androgènic humà (HUMARA) amb una heterozigositat del 83-90%.

Recentment, Liu i col. [132] van determinar el XCIP a nivell d'ARN, ja que així podien estudiar el patró d'inactivació de les plaquetes. Per realitzar aquest estudi van utilitzar els següents gens: iduronat-2-sulfatasa (IDS), MPP1, G6PD, bruton tirosina cinasa (BTK) i el domini 1 del LIM4 (FHL1). El grau d'heterozigositat obtingut utilitzant tots aquests gens junts és del 90%.

Fins al moment, el gen polimòrfic més utilitzat per estudiar el patró de clonalitat en síndromes mieloproliferatives cròniques és el gen HUMARA, ja que:

- Conté una repetició de tres nucleòtids (CAG), anomenada també seqüència VNTR, al primer exó. Aquesta seqüència és molt polimòrfica ja que cada VNTR conté de 11 a 31 repeticions CAG. Aquest fet permet que es pugui discriminar entre els dos cromosomes X en aproximadament el 90% de les dones (grau d'heterozigositat).

- A 100 parells de bases de l'extrem 5' de la regió VNTR trobem quatre dianes d'acció d'enzims de restricció sensibles a la metilació (dos per Hha I i dos per Hpa II). Aquesta característica és molt útil ja que com que la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) no manté el patró de metilació, abans d'iniciar l'estudi de XCIP es realitzarà una digestió amb un d'aquests dos enzims (ex. Hpa II) que ens permetrà quedar-nos només amb aquells gens que siguin inactius (metilats) i que, per tant, l'enzim no podrà tallar. Posteriorment s'amplificaran amb una PCR i podran ser quantificats, ja sigui per mètodes de marcatge radioactiu o fluorescent.

Avantatges i inconvenients de l'anàlisi de clonalitat mitjançant XCIP

L'anàlisi del XCIP proporciona un mètode per a determinar clonalitat sense el requeriment de cap marcador genètic específic. Per aquest motiu és una eina molt útil en dones afectes de PV o TE.

El polimorfisme del gen HUMARA té l'avantatge que s'estudia a partir d'ADN i que metodològicament no és una tècnica difícil (digestió enzimàtica i PCR). Per altra banda, aquest gen té un alt grau d'heterozigositat (83-90%).

Els estudis previs de clonalitat mitjançant polimorfismes com PGK i HPRT han demostrat que no tots els pacients amb TE tenen una granulopoesi clonal [168-170]. Aquest fet ha estat corroborat més recentment pels estudis realitzats amb el gen HUMARA, ja que es va trobar un percentatge de clonalitat variable entre les pacients afectes de SMPC, fet que indica que la TE i la PV són malalties heterogènies en termes de clonalitat:

- El percentatge de clonalitat entre les pacients afectes de TE oscil·la entre el 18.7% i el 68% [35, 171-178]. Aquestes discrepàncies poden ser degudes a la diferent metodologia utilitzada en cada estudi, al nombre reduït de pacients d'alguns estudis i als diferents criteris utilitzats per definir l'estat de clonalitat (ratio d'al·lels o l'equació d'Asimakopoulos i col. [180].
- Respecte la PV, només hi ha dos estudis fins al moment on s'analitza la clonalitat mitjançant el gen HUMARA. El primer estudi va ser fet per Champion i col. (1997) i van estudiar 30 PV, 8 TE i 3 mielofibrosis. El percentatge de clonalitat per separat de cada malaltia no està especificat a l'article, però 26 d'aquests 41 pacients (63.4%) eren clonals [35]. El segon estudi va ser fet per Mitterbauer i col. (1999) i van estudiar 31 PV. Es va demostrar un patró XCIP clonal en 16 de 22 pacients (73%) [175].

Altres inconvenients que té l'estudi de clonalitat mitjançant el gen HUMARA:

- Quan es realitza un estudi de clonalitat és necessari comparar les cèl·lules patològiques amb unes altres de normals que proporcionen el patró d'inactivació original del cromosoma X del teixit en estudi. Fins el moment, hi ha controvèrsia en el teixit control a utilitzar. Per una banda, els estudis que utilitzen cèl·lules no hemopoètiques (cèl·lules de la mucosa bucal) en paral·lel amb cèl·lules hemopoètiques no implicades en la neoplàsia en estudi (limfòcits T, en el cas de les SMPC) prefereixen aquestes darreres cèl·lules ja que no existeixen diferències significatives entre elles, i perquè la correlació entre mucosa bucal i limfòcits T no és massa bona [177]. Per altra banda, la utilització de limfòcits T com a cèl·lules control en neoplàsies mieloides [171-178], és un tema no exempt de controvèrsia, doncs és difícil excloure completament la implicació dels limfòcits en un procés mioide ja que s'han descrit SMPC originades a nivell d'una cèl·lula mare pluripotent capaç de diferenciar-se en granulòcits i limfòcits T [179].
- L'existència d'un percentatge variable de controls clonals [175, 177]. Champion i col. (1997) van demostrar que aquest fenomen es donava de manera més freqüent en dones sanes d'edat avançada [35]. S'han proposat diverses explicacions per intentar aclarir aquest fet: 1) podria ser un fenomen constitutiu que apareix amb l'edat però sense cap repercussió neoplàsica, 2) que aquestes dones grans tinguin algun factor genètic que produeixi una pressió selectiva sobre un dels al·lels, o 3) que en realitat tinguin una població de cèl·lules clonals no detectada fins aquest moment [35, 181].

Per aquests motius, els limfòcits T són un bon control en les dones joves afectes de SMPC, però no passa el mateix en les dones d'edat avançada, on un XCIP desequilibrat en els granulòcits però no el limfòcits T podria indicar una "falsa" proliferació cel·lular clonal [35]. Per altra banda, l'estudi de XCIP serà de gran utilitat en aquelles dones d'edat avançada en què es demostrï un patró policlonal i no estigui clar si la proliferació cel·lular era reactiva o deguda a un procés neoplàsic [175, 177].

Un últim inconvenient d'aquesta tècnica és que un nombre significatiu de dones, també d'edat avançada, mostren un XCIP clonal tant en granulòcits com en limfòcits T [173, 178]. El fet de trobar alterat el control intern (limfòcits T) fa que l'estudi de clonalitat en aquestes dones no sigui informatiu.

Relació de la clonalitat obtinguda mitjançant l'estudi del gen HUMARA amb la clínica dels pacients

La relació d'un resultat clonal en dones afectes de TE amb una clínica concreta és un tema que, fins el moment, és controvertit. Per un costat s'han realitzat alguns estudis que correlacionaven un resultat clonal mitjançant l'estudi del gen HUMARA amb un major risc de patir complicacions trombohemorràgiques [174, 176, 178] i en canvi, altres estudis no troben aquesta correlació [172]. Les diferències d'aquests resultats podrien ser degudes a la mida de les poblacions estudiades.

Fins el moment no s'ha descrit una situació equivalent en dones afectes de PV, ja que els únics estudis que contemplaven aquesta patologia no van mirar aquesta correlació.

Cal realitzar més estudis de clonalitat en TE i PV que puguin ajudar a establir amb major precisió la patofisiologia d'aquestes malalties i determinar si les implicacions clíniques d'una hematopoesi clonal són realment demostrables. Així com estudis prospectius que contemplin si amb el pas del temps els resultats de policlonalitat obtinguts mitjançant el gen HUMARA poden canviar i la seva implicació clínica en aquest moment.

1.4.4.2. Gen de la policitèmia rubra vera 1 (PRV-1)

El gen PRV-1 codifica per un receptor de superfície relacionat amb la família uPAR/Ly6/CD59 i sembla que la seva expressió està restringida a les cèl·lules hemopoètiques.

És un nou marcador molecular que està sobreexpressat a nivell de l'ARNm dels granulòcits en la majoria de PV i en algunes TE, en canvi, els nivells d'expressió dels granulòcits d'eritrocitosis i trombocitosis secundàries són normals.

Els primers estudis que es van fer mostraven un augment de l'expressió del gen PRV-1 dels granulòcits de les PV i un nivell baix o nul dels granulòcits de LMC, mielofibrosi i la majoria dels pacients amb TE (4 de 6 pacients estudiats) [134]. Estudis posteriors del mateix grup però amb una tècnica més sensible van mostrar que els pacients amb TE i creixement endogen de BFU-E tenien nivells similars als obtinguts en els pacients afectes de PV (això no ho observaven en els pacients que no tenien creixement endogen de BFU-E), aquest grup va suggerir que en aquests casos els pacients podrien presentar

una PV emmascarada més que una TE [130]. Teofili i col. [133] van estudiar 37 pacients afectes de TE i tots ells tenien augmentats els nivells d'expressió del gen PRV-1. Estudis posteriors han obtingut resultats similars; Florensa i col. van demostrar que el 91% de les PV i el 59% de les TE estudiades sobreexpressaven el gen PRV-1. Així mateix van veure que totes les PV que sobreexpressaven PRV-1 tenien creixement endogen de BFU-E i que totes excepte una TE sobreexpressaven PRV-1 i tenien creixement endogen de BFU-E i/o CFU-Meg [182].

El paper del gen PRV-1 en la patogènesi de la PV i la TE no es coneix. Podria ser simplement un marcador indirecte de la presència de cèl·lules (hiper)activades ja que s'ha vist que les cèl·lules mieloides normals estimulades in vivo o in vitro amb factors estimulants de colònies granulocitari mostren un augment dels nivells de ARNm del PRV-1 [134].

El valor del PRV-1 com a marcador discriminatori entre la PV i la majoria de TE, s'ha d'acabar de confirmar amb estudis prospectius, així com la seva correlació amb el pronòstic clínic.

1.4.4.3. Microxips d'expressió

Gràcies a que recentment s'ha completat la seqüenciació del genoma humà i a la creació de noves tecnologies com els microxips que permeten analitzar l'expressió i funció de tots els gens del genoma a la vegada [183], s'ha obert una nova era per a l'anàlisi genètica de la PV i la TE.

Hi ha pocs estudis que analitzin aquestes patologies emprant microxips:

- Pellagatti i col. (2003) estudien l'expressió de 6000 gens d'onze pacients afectes de PV amb microxips d'ADNc i la comparen amb la d'individus control. El resultat ha estat la troballa d'onze gens sobreexpressats en tots els pacients amb PV i no en els controls. La funció d'alguns d'aquests gens és inhibir les proteases que promouen l'apoptosi dels neutròfils (ex. cistatina F), mentre que d'altres són antiapoptòtics o factors de supervivència (ex. adrenomedulina, p38). Es creu que la desregulació d'aquests factors inhibiria l'apoptosi normal dels granulòcits i promouria la seva supervivència en pacients afectes de PV. Aquests gens doncs, representarien la signatura molecular d'aquesta malaltia i tindrien un paper molt important en la patofisiologia de la PV [184].

- Tenedini i col. (2004) estudien els perfils d'expressió gènica en 15 pacients afectes de TE i ho comparen amb els perfils de 15 controls sans. Concretament, comparen la megacariopoesi, ja que seleccionen els precursors hemopoètics CD34+ del moll d'os d'aquests individus. El resultat ha estat que els gens proapoptòtics com BAX, BNIP3 i BNIP3L estan poc expressats en els megacariòcits de la TE, juntament amb altres gens que formen part del complex que confereix permeabilitat a les mitocòndries (mecanisme amb un paper essencial en l'apoptosi). Contràriament, els gens antiapoptòtics com IGF1-R i CFLAR estan sobreexpressats en els megacariòcits de la TE, de la mateixa manera que ho està el gen SDF1 que afavoreix la supervivència cel·lular [185].

Per avaluar les conseqüències biològiques del perfil d'expressió dels gens implicats en la regulació de les vies apoptòtiques dels megacariòcits de la TE, Tenedini E i col. també van realitzar assaigs funcionals com l'exposició a fosfatidilserina, el pic en fase sub-G1 del ADN i la dil·lució limitant de TPO dels megacariòcits normals i en la TE. Aquest estudi funcional va confirmar que els megacariòcits de la TE són més resistents a l'apoptosi que els megacariòcits dels controls. Ara bé, segueix essent una incògnita si la propensió a una apoptosi disminuïda té un paper primordial en la gènesi dels megacariòcits de la TE o sí bé, és una conseqüència de la malaltia [185].

Resumint, els seus resultats suggereixen que els megacariòcits de la TE tenen alterada l'expressió de diferents gens que participen en la regulació de l'equilibri entre proliferació i apoptosi, i com a conseqüència aquests megacariòcits són resistents a l'apoptosi. Aquesta troballa podria tenir un paper molt rellevant en la tumorigènesi de la TE.

Serien molt interessants altres estudis que compararessin els perfils d'expressió de les PV i les TE amb el d'altres SMPC i amb els de pacients afectes de poliblobúlies o trombocitosis secundàries. També seria útil comparar les PV o TE clonals amb les policlonals per veure si existeix alguna diferència en el seu patró d'expressió.

1.4.4.4. Mutacions del gen Janus cinasa 2 (JAK2)

JAK2 és una tirosina cinasa localitzada a 9p24 que forma part de la via de transducció de senyals de molts receptors de creixement hemopoètics. Recentment, han aparegut diversos treballs que han posat de manifest que una mutació puntual en aquesta tirosina cinasa podria ser la responsable de moltes de les característiques de la PV, la TE i la MM [186-190].

La mutació puntual es produeix pel canvi d'una Guanina (G) per una Timina (T) en l'exó 12 que comporta un canvi d'una Valina per una Fenilalanina en l'aminoàcid número 617 (Val617Phe). Es tracta d'una mutació adquirida ja que només s'ha detectat en cèl·lules mieloides (granulòcits, eritroblasts diferenciats a partir de cèl·lules CD34+ i plaquetes) i no en limfòcits T ni cèl·lules de la mucosa bucal.

Baxter i col. (2005) troben aquesta mutació en el 97% de PV, el 57% de TE, el 50% de MM i en cap dels 90 controls estudiats [186]. Levine i col. (2005) identifiquen la mateixa mutació puntual en el 74% de PV, el 33% de TE i el 35% de MM [187]. De la mateixa manera, James i col. (2005) troben la mutació en el 89% de PV, el 43% de TE, el 43% de MM i en cap control ni pacient amb eritrocitosi secundària [188].

Tots aquests articles suggereixen que aquesta mutació és una de les principals causes de proliferació hemopoètica. Es basen en les següents troballes:

- Només els progenitors eritroides portadors de la mutació són capaços de créixer en absència d'EPO, mentre que tant els progenitors mutats com els normals poden créixer en la seva presència [186-188].
- La utilització d'ARN d'interferència (ARNi) redueix l'expressió de JAK2 en un 90% i produeix una gran disminució del número de colònies eritroides capaces de créixer en absència d'EPO [188].
- La introducció de la mutació Val617Phe JAK2 en el moll d'os d'un ratolí comporta l'aparició d'una hiperplàsia de la sèrie eritroide (Hct ~60%) [188].

S'han realitzat estudis d'hibridació in situ amb sondes que cobreixen el gen JAK2, que han demostrat la presència de la mutació en els dos al·lels en els casos estudiats. Aquesta troballa suggereix que l'al·lel mutat es duplicaria bé per recombinació mitòtica o bé per trisomia del cromosoma 9, que és una de les alteracions més freqüents en la PV, mentre que l'al·lel normal es perdria.

Per tant, per desenvolupar una PV serien necessaris com a mínim dos fets: la mutació Val617Phe seguida o bé per la seva duplicació o per algun altre succés genètic desconegut fins el moment [186-188].

La mutació Val617Phe JAK2 té un paper principal, encara que no únic, en la patogènesi de la PV ja que està implicada en la resposta anormal de les citocines i en l'aparició de la policitèmia [188]. Es tracta doncs d'una troballa amb una gran importància diagnòstica i terapèutica en les síndromes mieloproliferatives [186-190] ja que:

- Té un gran valor com a test diagnòstic perquè permet diferenciar els processos neoplàsics dels reactius.
- Podria representar una nova diana terapèutica ja que es podrien utilitzar inhibidors de l'activitat tirosina cinasa, que han demostrat ser molt útils en el tractament d'altres càncers.

2. MATERIAL I MÈTODES

2.1. PACIENTS

En aquest treball s'han estudiat mostres de medul·la òssia o sang perifèrica dels següents grups de malalts:

- 32 malalts afectes de policitèmia vera (articles 1 i 2)
- 53 malalts afectes de trombocitèmia essencial (article 3)
- 44 malalts afectes de trombocitèmia essencial, 18 malalts afectes de policitèmia vera i 64 controls hematològicament sans (article 4)

Les mostres de medul·la òssia per a realitzar l'estudi citogenètic i d'hibridació in situ (articles 1, 2 i 3) han estat recollides entre els anys 1988 i 2002 i provenen de l'Hospital de la Creu Roja, l'Hospital Central l'Aliança, l'Hospital de l'Esperança i l'Hospital del Mar de Barcelona.

Les mostres de sang perifèrica per a realitzar l'estudi de clonalitat mitjançant el polimorfisme del gen HUMARA (article 4) han estat recollides entre els anys 2002 i 2004 i provenen de l'Hospital del Mar de Barcelona.

2.2. MÈTODES

2.2.1. TÈCNIQUES DE CITOGÈNÈTICA CONVENCIONAL

2.2.1.1. Extracció i conservació de les mostres

Les mostres utilitzades per a l'estudi citogenètic han estat de dos tipus: sang perifèrica (per estudiar els individus control) i medul·la òssia (per estudiar els pacients afectes de TE i PV). Tot seguit es descriu com s'ha realitzat la seva extracció i conservació.

A. Mostres de sang perifèrica

L'extracció de sang perifèrica es fa a partir de la vena basilíca o mitjana cefàlica del braç. S'extreuen de 2 a 5 mL de sang perifèrica en condicions estèrils. La sang es recull en un tub amb 1% d'anticoagulant tipus heparina sòdica o heparina de liti, però mai amb EDTA ja que aquest anticoagulant inhibeix el creixement cel·lular. La mostra de sang perifèrica es conservarà a 2-4°C (nevera) fins el moment de posar a créixer el cultiu. Es recomana cultivar tan aviat com sigui possible des del moment de l'extracció, però en cas que no sigui possible, la mostra pot aguantar bé 2-3 dies a la nevera.

B. Mostres de medul·la òssia

Les mostres de medul·la òssia s'obtenen per punció aspirativa, habitualment a nivell esternal o bé de la cresta il·líaca posterosuperior. Després d'anestesiàr la zona, s'efectua la punció, es penetra a la cavitat medul·lar amb un tròcar i es procedeix a aspirar uns 2 mL de medul·la òssia. La primera fracció que s'aspira és la més rica en cèl·lules en divisió, però a mesura que l'extracció continua, la mostra es contamina amb sang medul·lar. Per aquesta raó, és aconsellable utilitzar la primera fracció per al cultiu cel·lular. La mostra es recull en un tub de centrifuga amb 5 mL de medi RPMI-1640 i heparina sòdica o de liti a l'1% i s'ha de posar a cultivar tan aviat com sigui possible després de la seva extracció per obtenir el màxim de cèl·lules en divisió. En cas que la mostra s'hagi de transportar o guardar unes hores abans de cultivar, és recomanable fer-ho a T^a ambient o bé a 37°C un màxim de 10 hores.

2.2.1.2. Composició del medi de cultiu

El medi de cultiu es prepara en una campana de flux laminar prèviament esterilitzada. A una ampolla de 100 mL de medi de cultiu RPMI-1640, s'afegeix 1 mL d'heparina sòdica o de liti (1%). Es treuen 20 mL de la barreja (s'utilitzaran, al·lquotats en tubs de plàstic estèril amb 5 mL, per a recollida de mostres de medul·la òssia). Als 80 mL de medi restants s'afegeixen: 17 mL de sèrum boví fetal (17%), 2 mL de L-Glutamina (2%) i 1 mL de Penicil·lina-Estreptomicina (1%). S'aliquoten 100 mL de medi complet en flascons de cultiu de plàstic estèril de 25 cc, amb 10 mL a cada flascó. Es conserven a -20°C fins el moment del seu ús.

2.2.1.3. Tècniques de processat dels diferents teixits

2.2.1.3.1. Medul·la òssia

A. Manipulació del medi de cultiu i de la mostra

- Descongelar un flascó amb medi complet (RPMI 1640, Sèrum boví fetal, L-Glutamina, Penicil·lina-Estreptomicina, Heparina), a T^a ambient o al bany maria a 37°C.
- Centrifugar la mostra de medul·la òssia durant 8 minuts a 1500 rpm. Un cop centrifugada, extreure la capa blanca (rica en cèl·lules mononucleades) amb una pipeta Pasteur estèril. Depenent de la cel·lularitat de la mostra es posaran de 0.3 a 0.8 mL de la capa blanca per ajustar el cultiu a 2×10^6 cèl·l/mL.
- No s'afegeix mitogen degut a que el tipus de cèl·lules que ens interessen de la medul·la òssia són cèl·lules immadures.

B. Cultiu

- Remenar el cultiu per inversió abans de posar-lo a l'estufa.
- Obrir una mica el tap del flascó i col·locar-lo a l'estufa de cultiu a 37°C i 5% CO₂.
- El temps de cultiu és de 24 hores.

C. Processat de la mostra

- Mitja hora abans d'iniciar el processat de la mostra, cal afegir 100 µl de Colcemid (antimitòtic) al flascó i deixar-lo actuar dins l'estufa, a 37°C.
- Abocar el contingut del flascó a un tub de plàstic estèril per procedir a l'extracció del cultiu.
- Centrifugar la mostra durant 10 minuts a 1500 rpm.
- Descartar el sobrenedant (vigilant perquè el sediment cel·lular pot quedar poc enganxat i es pot perdre), i resuspendre el sediment cel·lular.
- Afegir solució hipotònica de KCl (0.075 M) preescalfada a 37°C al tub amb el sediment cel·lular. Aquesta solució s'afegeix gota a gota i agitant fins els 2 primers mil·lilitres i després a raig fins a 8-10 mL.
- Col·locar el tub al bany maria a 37°C durant 30 minuts.
- Centrifugar 10 minuts a 1500 rpm.
- Descartar el sobrenedant i resuspendre el sediment cel·lular. Afegir fixador Carnoy (3 parts de metanol i 1 part d'àcid acètic), primer gota a gota i agitant fins a 1-2 mL i després a raig fins a 8-10 mL*.
- Centrifugar 10 minuts a 1500 rpm.
- Repetir el procés de fixació (assenyalat anteriorment amb el símbol*) unes 3 vegades fins que el sobrenedant sigui transparent i el sediment cel·lular blanc.
- Fer 3 extensions de cada tub, assecar-les a la planxa de 50°C i envellir-les a la planxa de 100°C durant 1 hora.

D. Tècnica de bandes

Les preparacions obtingudes s'analitzen seguint la tècnica de bandes G amb tampó de Sörensen i colorant de Wright. En aquest cas, es tenyeixen les preparacions amb una solució composta per 3 parts de tampó de Sörensen i 1 part de colorant de Wright (veure apartat 4.3.2) durant 2-6 minuts (dependrà de si el colorant és acabat de fer o és vell), s'esbandeixen amb aigua de l'aixeta i s'assequen amb un paper de filtre.

2.2.1.3.2. Sang perifèrica

Les mostres de sang perifèrica dels individus control seguiran tot el procés de la tècnica de citogenètica convencional (equivalent al procés de la tècnica de medul·la òssia) menys l'envelliment i tinció ja que només les processem per obtenir el material sobre el qual realitzarem la hibridació in situ.

A. Manipulació del medi de cultiu i de la mostra

- Descongelar un flascó amb medi complet (RPMI 1640, Sèrum boví fetal, L-Glutamina, Penicilina-Estreptomycina, Heparina), a T^a ambient o al bany maria a 37°C.
- Afegir la quantitat necessària del mitogen (Fitohemaglutinina (PHA) al 5%).
- Afegir-hi la mostra de sang perifèrica. La quantitat de mostra a afegir està en funció del n^o total de leucòcits de la mostra. És ideal ajustar el cultiu a 2×10^6 cèl·lules/mL, per tant, caldrà procedir a fer un recompte del n^o de leucòcits amb un comptador automàtic o amb una càmera de Neubauer. Un cop s'hagi obtingut la xifra de leucòcits es calcularà el volum de sang necessari per cultiu de forma que la concentració quedi ajustada a 2×10^6 cèl·lules/mL.

B. Cultiu

- Obrir una mica el tap del flascó i col·locar-lo a l'estufa de cultiu a 37°C i 5% CO₂. Cultivar durant 72 hores (si la mostra arriba un dimecres o un dijous, pot arribar a estar de 96 a 120 hores a l'estufa), i barrejar el cultiu per inversió una vegada cada dia.

C. Processat de la mostra

- Mitja hora abans d'iniciar el processat de la mostra, cal afegir 100 µl de Colcemid (antimitòtic) al flascó i deixar-lo actuar dins de l'estufa, a 37°C.
- Abocar el contingut del flascó a un tub de plàstic estèril per procedir amb el procés d'extracció del cultiu.
- Centrifugar la mostra durant 10 minuts a 1500 rpm.
- Descartar el sobrenedant (vigilant perquè el sediment cel·lular pot quedar poc enganxat i es pot perdre), i resuspendre el sediment cel·lular.

- Afegir solució hipotònica de KCl (0.075 M) preescalfada a 37°C al tub amb el sediment cel·lular. Aquesta solució s'afegeix gota a gota i agitant fins els 2 primers mil·lilitres i després a raig fins a 8-10 mL.
- Col·locar el tub al bany maria a 37°C durant 30 minuts.
- Centrifugar 10 minuts a 1500 rpm.
- Descartar el sobrenedant i resuspendre el sediment cel·lular. Afegir fixador Carnoy (3 parts de metanol i 1 part d'àcid acètic), primer gota a gota i agitant fins a 1-2 mL i després a raig fins a 8-10 mL*.
- Centrifugar 10 minuts a 1500 rpm.
- Repetir el procés de fixació (assenyalat anteriorment amb el símbol*) de 3 a 5 vegades fins que el sobrenedant sigui transparent i el sediment cel·lular blanc.
- Fer extensions, 1 de cada tub. Les extensions s'envelleixen 24 hores a temperatura ambient perquè no farem l'estudi de citogenètica convencional doncs aquestes mostres d'individus control només les farem servir per la tècnica d'hibridació in situ.

2.2.1.4. Anàlisi microscòpica i nomenclatura de la citogenètica convencional

S'han estudiat 20 metafases per cada cas al microscopi òptic, amb l'objectiu d'immersió (x100). S'han cariotipat un mínim de 5 metafases i comptat les restants. Per al cariotipatge s'ha utilitzat el sistema d'anàlisi d'imatges digital Cytovision (Applied Imaging).

Les anomalies cromosòmiques s'han descrit seguint la nomenclatura ISCN 1995. Es considera que una alteració cromosòmica és clonal quan la mateixa alteració estructural o guany d'un cromosoma es troba com a mínim en dues metafases o, en cas de ser una pèrdua d'un cromosoma, es troba com a mínim en tres metafases.

2.2.2. TÈCNiques D'HIBRIDACIÓ IN SITU (HIS)

2.2.2.1. Tipus de mostres

El material per a la realització de la tècnica d'hibridació in situ (HIS) procedia de mostres de citogenètica convencional envellides 24 hores a temperatura ambient. Aquestes mostres havien estat emmagatzemades amb solució fixadora de Carnoy (3 parts de metanol i 1 part d'àcid acètic) a una temperatura de -20°C a -80°C . El període d'emmagatzematge de les mostres abans de realitzar la tècnica d'HIS va ser variable, des de pocs mesos fins a 14 anys. La metodologia a seguir és igual tant per mostres de sang perifèrica com de medul·la òssia.

2.2.2.2. Metodologia d'hibridació in situ

En aquest estudi s'han utilitzat dos tipus de marcatge d'hibridació in situ:

- Una tècnica d'HIS amb marcatge de les sondes amb biotina i detecció immunoenzimàtica amb la reacció de la peroxidasa. Aquesta tècnica s'ha aplicat en un pacient afecte de PV per acabar d'establir una translocació entre dos cromosomes que no es veia clarament per citogenètica convencional.
- Una tècnica de HIS amb marcatge de les sondes amb fluorescència. A aquesta tècnica se l'anomena FISH, de l'anglès *Fluorescence in situ hybridization*. Cal esmentar que s'han utilitzat sondes de FISH marcades amb dos tipus de fluorocroms, *Spectrum Green* (color verd) i *Spectrum Orange* (vermell) (Vysis). Aquesta metodologia s'ha aplicat a tots els pacients afectes de TE i PV. Les sondes que s'han utilitzat han estat les centromèriques dels cromosomes 8 (CEP 8) i 9 (CEP 9), i les sondes específiques de locus LSI 13q14.3 i LSI 20q12. En el cas de les TE també s'ha aplicat la sonda LSI BCR/ABL dual colour ES (Vysis).

Els protocols per les esmentades tècniques es detallen a continuació.

2.2.2.2.1. Protocol d'HIS amb marcatge de les sondes amb biotina (Cambio) i detecció amb fluorescència BIO-FITC (Oncor): Sondes de pintat cromosòmic

A. Pretractament de les mostres

- Envellir les extensions durant 30 minuts en 2xSSC a 37°C.
- Deshidratar les extensions en sèries d'etanol al 70%, 85% i 100% durant 3 minuts a temperatura ambient.
- Deixar assecar les extensions a l'aire.

B. Desnaturalització de l'ADN de les mostres i de les sondes

La desnaturalització de l'ADN és el procés pel qual la doble hèlix d'àcid nucleic se separa en dues cadenes senzilles. Aquest procés s'aplica tant a l'ADN de la mostra com a l'ADN de la sonda (en cas que aquesta estigui formada per ADN de cadena doble) per tal que la hibridació entre ells sigui possible.

El mètode més utilitzat per a desnaturalitzar l'ADN és el tractament tèrmic (per cada cas cal establir el temps i la temperatura adequats). En aquest mètode s'utilitza la formamida, un dissolvent orgànic que disminueix la constant dielèctrica de la solució de desnaturalització i redueix l'estabilitat tèrmica de la doble hèlix. La formamida permet, doncs, la desnaturalització de l'ADN a temperatura més baixa, fet que fa mantenir una bona morfologia del nucli i dels cromosomes. La concentració òptima de formamida es troba entre el 50 i el 70%, i és la que proporciona una major taxa de desnaturalització i hibridació posterior sense presentar inespecificitat de marcatge en altres cromosomes.

- **Desnaturalització de les mostres:** Es submergeixen les preparacions en un bany de formamida al 70% en 2xSSC pH7 durant 2 minuts a 72°C. Immediatament es procedeix a submergir les preparacions en un bany d'etanol al 70% fred (0-4°C) durant 5 minuts per aturar en sec el procés de desnaturalització i evitar la renaturalització de l'ADN. Tot seguit es prossegueix amb la resta de banys d'etanol al 85 i 100% per a completar el procés de deshidratació. Les preparacions es deixen eixugar a l'aire com a mínim 30 minuts fins el moment de la hibridació.

- **Desnaturalització de les sondes de pintat cromosòmic:** Abans de desnaturalitzar la sonda cal preescalfar-la, de manera que es col·loca tot el tub de la sonda del cromosoma que es vulgui hibridar durant 5 minuts a 37°C. Tot seguit, es col·loquen 5 µL de sonda (per cada mostra) en un eppendorf i es desnaturalitzen de 5 a 10 minuts en un bany a 72°C. Finalment, es col·loca l'eppendorf amb la sonda en un bany a 37°C durant un període mínim de 30 minuts i fins a 2 hores, abans de prosseguir amb la hibridació.

C. Reacció d'hibridació

S'han utilitzat sondes de pintat cromosòmic de Cambio. Les sondes de pintat cromosòmic estan formades per una bateria o llibreria de sondes que abarquen la totalitat del cromosoma. En el present treball s'han utilitzat les sondes dels cromosomes 2 i 9.

Per tal que tingui lloc la hibridació es col·loquen 5 µL de sonda i tampó d'hibridació sobre cada preparació i es cobreixen amb un cobreobjectes. Es segellen els cobreobjectes amb cola i es col·loquen en una cambra humida (prèviament preescalfada a 37°C) i s'incuben les mostres durant tota la nit a 37°C.

D. Rentats de post-hibridació

Els rentats de posthibridació permeten eliminar l'excés de sonda que no ha hibridat i també dissociar els possibles híbrids no perfectes que s'hagin format entre regions amb una homologia molt elevada però no total. L'eficàcia d'aquests rentats dependrà de la concentració de formamida, la concentració de sals i la temperatura (Hopman i col., 1988). Per les sondes de pintat cromosòmic es realitzen tres rentats en una solució de formamida al 50% durant 5 minuts a 45°C i tres rentats en 0.1xSSC durant 5 minuts a 60°C. A partir d'aquest punt la detecció i amplificació del senyal es farà a la foscor.

E. Detecció i amplificació dels senyals d'hibridació

El procés immunoenzimàtic de detecció de senyals es realitza a través d'una sèrie d'incubacions en cambra humida a 37°C amb diferents anticossos.

- Col·locar 15 µl d'Avidina sobre el portaobjectes. Tapar amb un cubreobjectes de plàstic i incubar en cambra humida durant 10 minuts a l'estufa de 37°C.
- Es realitzen tres rentats en una solució de PBS-tween durant 2 minuts a temperatura ambient.
- Col·locar 15µl d'Antiavidina sobre el portaobjectes. Tapar amb un cubreobjectes de plàstic i incubar en cambra humida durant 10 minuts a l'estufa de 37°C.
- Es realitzen tres rentats en una solució de PBS-tween durant 2 minuts a temperatura ambient.
- Col·locar 15 µl d'Avidina sobre el portaobjectes. Tapar amb un cubreobjectes de plàstic i incubar en cambra humida durant 10 minuts a l'estufa de 37°C.
- Es realitzen tres rentats en una solució de PBS-tween durant 2 minuts a temperatura ambient.
- Col·locar 10 µl de DAPI II sobre el portaobjectes i tapar amb un cubreobjectes net de 20x20mm. No segellar.
- Guardar en una capsula a les fosques a la nevera (2-8°C)

Les zones hibridades es manifesten com a taques de color verd més o menys intens. El colorant DAPI II s'utilitza per a contrastar els nuclis en interfase i els cromosomes de les metafases.

F. Observació al microscopi de fluorescència

Les preparacions s'han examinat en un microscopi de fluorescència Nikon Eclipse e600 utilitzant els objectius de x10 i x100.

2.2.2.3. Metodologia d'hibridació in situ fluorescent (FISH)

2.2.2.3.1. Protocol d'HIS amb marcatge amb fluorescència. Sondes centromèriques i específiques de locus

A. Desnaturalització de l'ADN de les mostres i de les sondes

Amb la incorporació d'una placa de calor (Hybrite, Vysis, Downers Grove, IL, USA) al nostre laboratori, la tècnica de desnaturalització es simplifica molt ja que sobre la placa es desnaturalitza la sonda i la mostra al mateix temps. La tècnica a seguir es descriu a continuació.

Sobre el portaobjectes on hi ha la mostra es col·loquen 5 μ L d'una barreja formada per 0.5 μ L de la sonda, 1 μ L d'aigua destil·lada i 3.5 μ L de tampó d'hibridació (formamida al 65%, dextrà sulfat al 10% i 20xSSC) (quantitats per cada cas). Es cobreix amb un cobreobjectes i es segella amb cola especial perquè la sonda no s'evapori. Una vegada segellats, es col·loquen a l'interior de la placa de calor o, sobre la superfície calenta, on prèviament s'ha col·locat unes tires de paper humit als laterals. Posteriorment, es tanca la tapa i es selecciona el programa que vulguem posar en marxa. En el nostre cas una desnaturalització d'1 minut a 75°C i una hibridació de màxim 30 hores a 37°C (ho deixem durant tota la nit). Cal realitzar el procés en absència de llum ja que les sondes estan marcades directament amb fluorescència.

B. Reacció d'hibridació

La mostra amb les sondes segueixen dins la placa calefactora però durant el procés d'hibridació la temperatura baixa de 75°C a 37°C i es manté constant a aquesta temperatura durant tota la nit.

Les sondes utilitzades han estat les següents:

- Sondes centromèriques:

La sonda centromèrica del cromosoma 8 i la del cromosoma 9 s'hibriden juntes.

- Sonda de la regió centromèrica del cromosoma 8 (CEP 8): aquesta sonda cobreix la regió p11.1-q11.1 del cromosoma 8. S'ha utilitzat marcada directament amb *Spectrum Orange*.
- Sonda de la regió centromèrica del cromosoma 9 (CEP 9): aquesta sonda cobreix la regió p11-q11 del cromosoma 9. S'ha utilitzat marcada directament amb *Spectrum Green*.

- Sondes específiques de locus:

Les sondes específiques de locus LSI 13q14.3 i LSI 20q12 s'hibriden cadascuna d'elles conjuntament amb una sonda específica pel telòmer del braç llarg del cromosoma 13 (Tel(13q)) i amb una sonda específica pel telòmer del braç curt del cromosoma 20 (Tel(20p)), respectivament.

- Sonda específica de locus de la regió 13q14.3 (D13S319): aquesta sonda cobreix la regió 13q14.3, regió de 130 kb situada entre RB1 i el locus D13S25. S'ha utilitzat marcada directament amb *Spectrum Orange*.
- Sonda específica del telòmer de 13q (Tel13q): aquesta sonda es fa servir com a control intern de la sonda específica de locus 13q14.3. S'ha utilitzat marcada directament amb *Spectrum Green*.
- Sonda específica de locus de la regió 20q12 (D20S108): aquesta zona cobreix una regió de 170 Kb a 20q12. Es creu que hi ha un gen supressor de tumors que amb la seva pèrdua proporciona un avantatge proliferatiu a les cèl·lules mieloides. Aquesta regió s'ha descrit com la més comú que es perd en diferents síndromes mieloproliferatives. S'ha utilitzat marcada directament amb *Spectrum Orange*.
- Sonda específica del telòmer de 20p (Tel20p): aquesta sonda es fa servir com a control intern de la sonda específica de locus 20q12. S'ha utilitzat marcada directament amb *Spectrum Green*.
- Sonda BCR/ABL dual colour ES: aquesta sonda està dissenyada per detectar el gen de fusió BCR/ABL tant si el gen BCR del cromosoma 22 es trenca per la regió Major (M) com per la minor (m). La regió del gen ABL, marcada en taronja (*Spectrum Orange*), té aproximadament 650 kb i cobreix una regió compresa entre el gen argininosuccinat sintetasa (ASS) i l'últim exó del gen ABL. La regió BCR, marcada en verd (*Spectrum Green*), té aproximadament 300 kb, comença entre els exons 13 i 14 i arriba més enllà de la regió m-BCR. Aquesta sonda permet veure un senyal taronja addicional quan es dona la translocació entre els cromosomes 9 i 22. Això redueix els problemes d'interpretació que originaven les altres sondes com a conseqüència d'una "fusió" (juxtaposició dels senyals verd i taronja) deguda a l'atzar.

C. Rentats de post-hibridació

Un cop passat el temps d'hibridació es retira la cola dels cobreobjectes i es realitzen tres rentats en una solució de formamida al 50% durant 10 minuts a 45°C (en el primer d'aquests rentats és necessari que el cobreobjectes caigui suaument del portaobjectes perquè la mostra pugui entrar en contacte amb la solució de formamida), un rentat en 2xSSC durant 10 minuts a 45°C i un rentat en 2xSSC/0.1%Tween-20 durant 5 minuts a 45°C. És recomanable que la mostra no s'eixugui del tot abans de posar-hi la contratinció.

D. Contratinció

Per tal de poder observar el fons de la preparació (els cromosomes i els nuclis en interfase) es col·loquen sobre les preparacions 7 µL de DAPI II (DAPI + *Antifade*) a l'àrea seleccionada i un cobreobjectes a sobre. El DAPI és un fluorocrom que s'uneix de forma inespecífica a tot l'ADN i ens permet veure'l de color blau intens amb un filtre de fluorescència adequat. Les preparacions es guarden a -20°C durant 30 minuts, després ja es pot procedir a l'observació.

E. Observació al microscopi de fluorescència i obtenció d'imatges

Les preparacions s'han examinat en un microscopi òptic amb dispositiu d'epifluorescència NIKON Eclipse 600. S'han utilitzat els objectius de x10 i x100. Per obtenir imatges de FISH s'ha utilitzat el sistema d'anàlisi d'imatges digital Cytovision (Applied Imaging).

2.2.2.4. Criteris de valoració de la FISH i establiment dels nivells de tall

A. Nombre de cèl·lules analitzades

- Sondes centromèriques: s'han analitzat 500 nuclis per cas.
- Sondes específiques de locus: s'han analitzat 200 nuclis per cas.

B. Establiment dels nivells de tall per a la determinació de certesa d'existència d'alteracions cromosòmiques

Per cada tipus de sonda (centromèriques dels cromosomes 8 i 9, LSI 13q14.3 i LSI 20q12 i BCR/ABL) s'ha aplicat la tècnica de FISH en una sèrie de 10 individus control sans (mostres de sang perifèrica).

En les sondes centromèriques s'han valorat un total de 500 nuclis per cas, fent un recompte del nombre de nuclis amb dos o tres senyals. Els nivells de tall per establir la diferència entre els resultats veritablement positius i els falsos positius per a trisomies s'obtenen de calcular la mitjana ± 3 vegades la desviació estàndard ($M \pm 3SD$). D'aquesta manera s'ha considerat trisomia 8 quan trobem més d'un 1.2% de nuclis amb tres senyals centromèriques del cromosoma 8 i trisomia 9 quan trobem més d'un 2.3% de nuclis amb tres senyals centromèriques del cromosoma 9.

A les sondes específiques de locus s'han valorat un total de 200 nuclis per cas, fent un recompte del nombre de nuclis amb un o dos senyals o en el cas de la sonda BCR/ABL comprovant si hi havia reordenament o no. Els nivells de tall per establir la diferència entre els resultats veritablement positius i els falsos positius per a delecions de la regió estudiada s'obtenen també de calcular la mitjana ± 3 vegades la desviació estàndard ($M \pm 3SD$). D'aquesta manera s'ha considerat delecio de la regió 13q14.3 quan trobem més d'un 6% de nuclis amb un únic senyal LSI 13q14.3 i dos senyals Tel(13q) i delecio de la regió 20q12 quan trobem més d'un 5% de nuclis amb un únic senyal LSI 20q12 i dos senyals Tel(20p). Per la sonda BCR/ABL dual color ES, es considera que hi ha reordenament d'aquests gens quan es troba més d'un 1% dels nuclis estudiats amb senyal de fusio.

2.2.3. TÈCNICA D'ESTUDI DE CLONALITAT MITJANÇANT EL POLIMORFISME DEL GEN HUMARA

2.2.3.1. Extracció i conservació de les mostres

Les mostres utilitzades per a l'estudi de clonalitat han estat de sang perifèrica tant pels individus controls com pels pacients afectes de TE i PV.

L'extracció de sang perifèrica es fa a partir de la vena basilica o mitjana cefàlica del braç. S'extreuen uns 10 mL de sang perifèrica en condicions estèrils. La sang es recull en un tub amb 1% d'anticoagulant tipus EDTA.

La mostra de sang perifèrica es conservarà a 2-4°C (nevera) fins el moment de la extracció de l'ADN. Es recomana extreure l'ADN tan aviat com sigui possible des del moment de l'obtenció de la sang, però en cas que no sigui possible, la mostra pot aguantar bé 1 dia a la nevera.

2.2.3.2. Separació de les cèl·lules

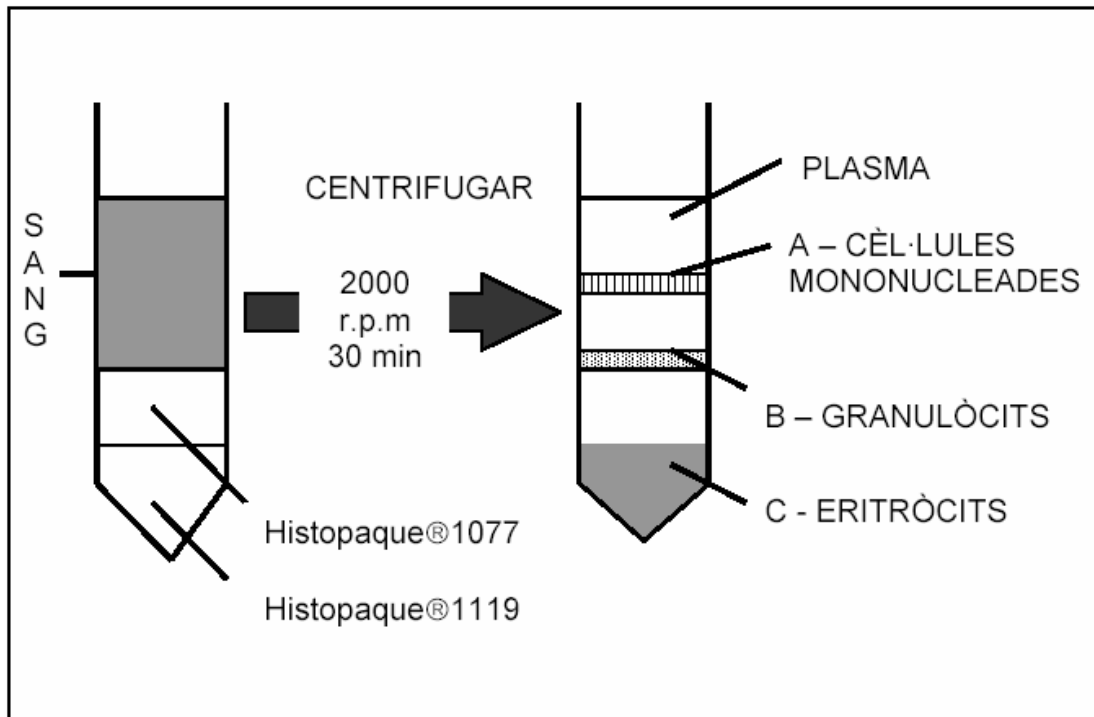
2.2.3.2.1 Obtenció de cèl·lules mononucleades i granulòcits per tècnica de gradient discontinu

Es centrifuga la mostra de sang perifèrica durant 5 minuts a 1000 rpm per separar el plasma ric en plaquetes del paquet cel·lular. El plasma ric en plaquetes es congela per si posteriorment es volen realitzar altres estudis. El paquet cel·lular es resuspèn amb 6 mL de PBS.

Afegim a un tub cònic de 15 mL 3 ml d'Histopaque®-1119 (medi de separació per gradient de densitat de granulòcits). Molt cuidadosament, afegim uns altres 3 ml d'Histopaque®-1077 (medi de separació per gradient de densitat de cèl·lules mononucleades) a sobre de l'Histopaque®-1119 sense que es trenqui la primera capa. A sobre de les dues capes anteriors dipositem, sense trencar la capa, els 6 mL de PBS que contenen el paquet cel·lular de la mostra de sang perifèrica a estudiar.

Centrifugar 30 minuts a 2000 rpm a temperatura ambient (18-26°C). Si la centrifugació es fes a baixes temperatures, com per exemple 4°C, podria produir-se agregats cel·lulars i una recuperació cel·lular baixa.

Treure el tub cònic cuidadosament de la centrífuga. Observarem dues capes opaques diferents (capes A i B en la Figura 5).

Figura 5. Estrategia de doble separació

Aspirar i descartar el líquid fins uns 0.5 cm per sobre de la capa A. Transferir les cèl·lules d'aquesta capa en un tub retolat com a mononucleades. Aspirar i descartar la resta del líquid fins uns 0.5 cm per sobre de la capa B. Transferir les cèl·lules d'aquesta capa a un altre tub retolat com granulòcits. Afegir a les cèl·lules 10 mL de PBS i rentar durant 10 min a 2000 rpm, treure el sobrenedant i descartar-lo. Si les cèl·lules han quedat una mica hemàtiques (sobretot en aquells casos que la sang perifèrica sigui més antiga) es pot afegir 10 mL de tampó de lisi (clorur d'amoní) i deixar actuar durant uns 10 minuts a 37°C. Centrifugar 10 min a 2000 rpm i rentar amb 10 mL de PBS durant 10 minuts més a 2000 rpm. Decantar el sobrenedant i guardar el pellet dels granulòcits resuspès en 150 µL de PBS net dins d'un eppendorf a -80°C fins que es faci l'extracció d'ADN. El pellet de les cèl·lules mononucleades haurà de ser separat en cèl·lules CD3+ i cèl·lules CD3- abans que puguem procedir a l'extracció d'ADN. Tot seguit es descriu com s'ha realitzat aquesta separació.

2.2.3.2.2 Separació de les cèl·lules mononucleades en cèl·lules CD3+ i cèl·lules CD3- amb columnes de selecció positiva

Es fa un recompte del número de cèl·lules mononucleades que hi ha en el pellet obtingut en el pas anterior. Per cada 10^7 cèl·lules s'afegeixen 80 μ l de seroalbúmina al 0.5% amb EDTA 2mM (BSA-EDTA) i 20 μ l d'anticòs CD3. S'incuba 15 minuts a 4°C (nevera).

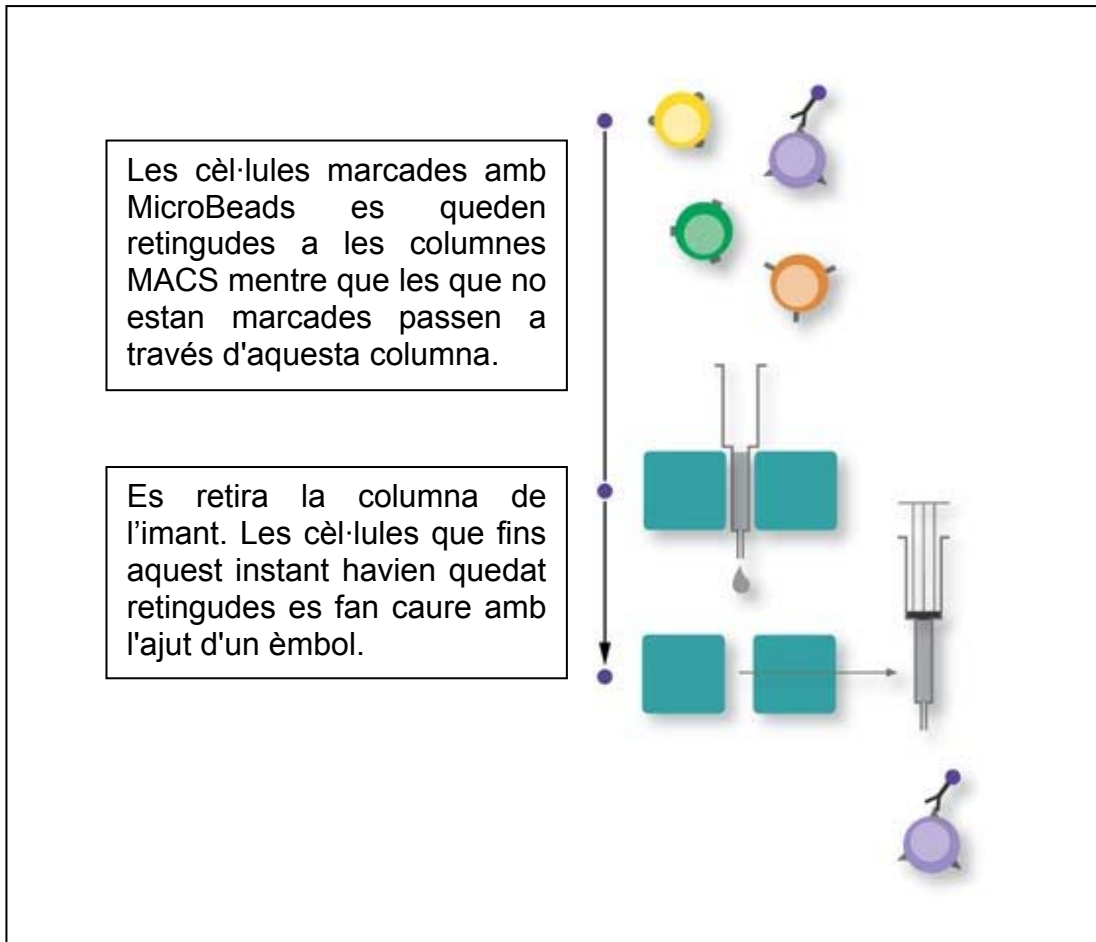
Un cop transcorregut aquest temps, afegir BSA-EDTA de 10 a 20 vegades el volum inicial de la mostra i centrifugar 10 minuts a 1000 rpm (així es renta l'excés d'anticòs que hi hagi en el tub de les cèl·lules mononucleades). Passats els 10 minuts, decantar el sobrenedant i resuspendre les cèl·lules amb 500 μ l de BSA-EDTA.

Col·locar la columna de separació dins de l'imant. Passar 500 μ l de BSA-EDTA per la columna de separació. Repetir el mateix procés amb uns altres 500 μ l. Descartar aquesta solució perquè només serveix per humitejar la columna.

Posar un tub sota la columna retolat com a CD3 negatiu i passar els 500 μ l de cèl·lules per la columna. Fer 3 rentats de 500 μ l de BSA-EDTA abans de passar a recuperar les cèl·lules CD3 positives (Figura 6).

Per recuperar les cèl·lules CD3 positives es posa sota la columna un nou tub retolat com a CD3 positiu, es retira la columna de l'imant, s'afegeix 500 μ l de BSA-EDTA i amb un èmbol que proporciona la mateixa casa comercial es fa pressió sobre la columna de forma ràpida i enèrgica (Figura 6).

El contingut dels dos tubs es centrifuga 10 minuts a 2000 rpm i es decanta el sobrenedant. Es resuspèn amb 150 μ L de PBS i es passa a un eppendorf. En aquest punt tenim les cèl·lules CD3 positives separades de les negatives en dos eppendorf. Fins que no es fa l'extracció d'ADN es guarda aquest material al congelador de -80 °C.

Figura 6. Estrategia de selecció positiva

2.2.3.3. Extracció d'ADN de sang perifèrica

Treure els eppendorf del congelador de -80°C i mantenir-los amb gel fins al moment abans d'introduir-los al "BioRobot M48 Workstation" perquè els $150\ \mu\text{L}$ de PBS on està resuspès l'ADN no es descongeli.

El BioRobot és una estació automatitzada que permet extreure ADN de mostres biològiques amb una major eficiència i rapidesa que el mètode manual. Les mostres es processen en múltiples de sis seguint el següent protocol (les solucions que s'utilitzen vénen ja preparades en forma de Kit, "MagAttract DNA Blood Midi M48 Kit") (Figura 7):

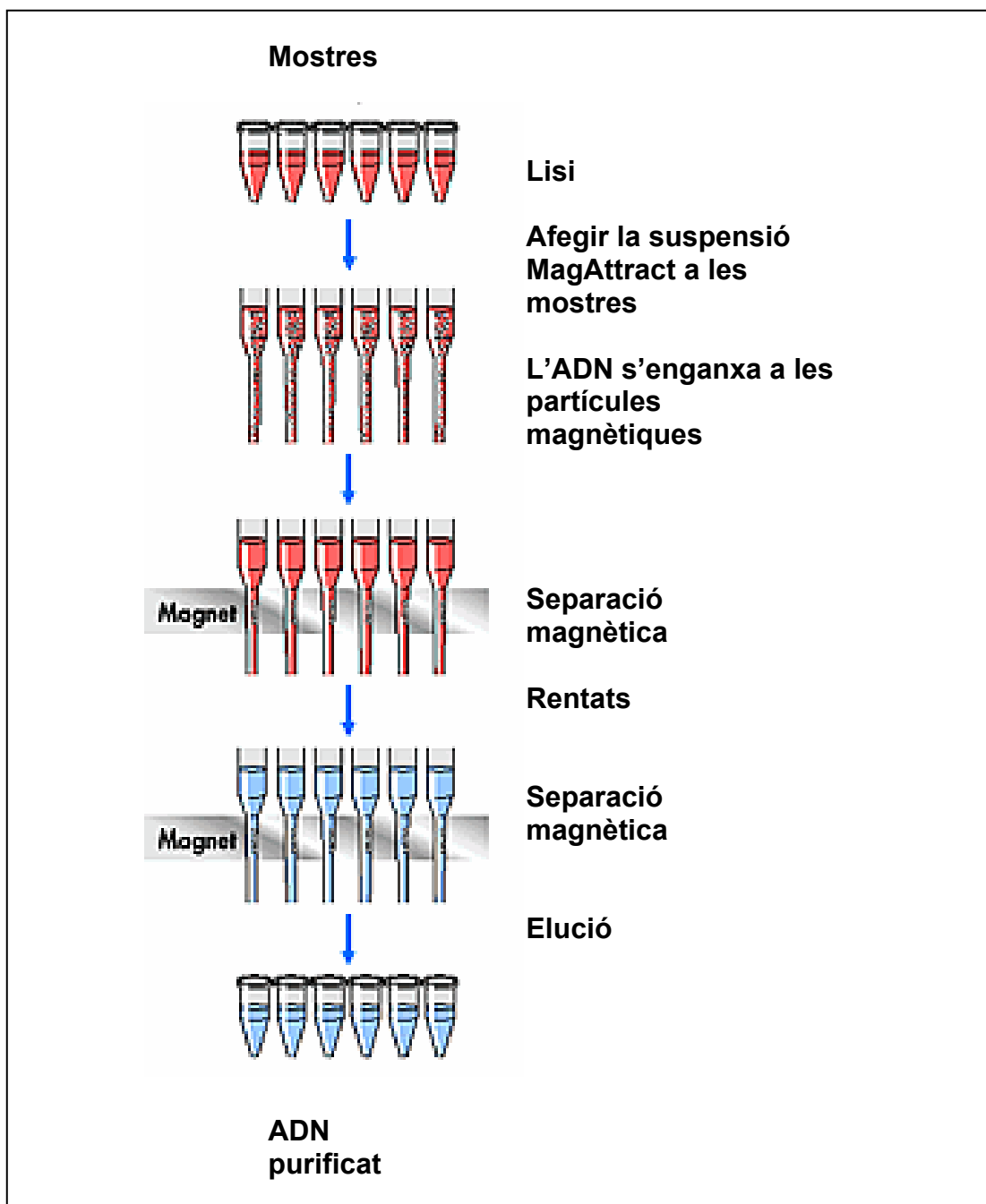
- Lisi cel·lular amb tampó de lisi.
- Separació dels àcids nucleics de la resta de partícules contaminants per acció de la solució anomenada "MagAttract Suspension" (boletes magnètiques que s'intercalen a l'ADN i queden retingudes per l'acció d'un imant).

- Rentats que arrosseguen la resta de partícules que seran eliminades.
- Finalment s'afegeix una solució d'elució que separa les partícules magnètiques de l'ADN.

Després de tot aquest procés obtenim l'ADN, resuspès en un volum programable d'aigua destil·lada, dins d'un nou eppendorff, lliure de qualsevol substància que pugui inhibir la PCR.

La concentració d'aquest ADN s'obté multiplicant per 5 el valor d'absorbància que s'obtingui a l'espectofotòmetre (dil·lució 1:100).

Figura 7. Extracció d'ADN mitjançant el Kit "MagAttract DNA Blood Midi M48"



2.2.3.4. Digestió de l'ADN

Posem 1 µg d'ADN de granulòcits en dos eppendorf, 1µg d'ADN de cèl·lules mononucleades CD3+ en uns altres dos eppendorf i 1µg d'ADN de cèl·lules mononucleades CD3- en uns altres dos eppendorf. En un eppendorf de cada (granulòcits, mononucleades CD3+ i CD3-) afegirem 1 µl de l'enzim de restricció sensible a la metilació HpaII, 1µl del seu tampó 10x i el que falti fins a 10 µl posarem aigua destil·lada estèril. A els altres tres eppendorf amb 1 µg d'ADN de granulòcits, cèl·lules mononucleades CD3+ i CD3- posarem els mateixos reactius però sense l'enzim de restricció sensible a la metilació i ho incubarem durant tota la nit a 37°C.

L'endemà inactivarem l'enzim a 95°C durant 10 minuts i després posarem els eppendorf en gel. Al cap de 2 minuts, farem un pols a 14000 rpm perquè tot el material baixi fins al final de l'eppendorf.

2.2.3.5. Amplificació de l'ADN mitjançant la tècnica de la PCR

Agafem 5µl de l'ADN, tant el que hem digerit amb HpaII com el que hem deixat sense digerir, i el posem dins dels eppendorf que posarem al termociclador per realitzar la PCR.

A continuació preparem una solució mare barrejant tot el necessari per què tingui lloc l'amplificació de l'ADN: 100ng del primer AR1 (5'CAG GCA CCC AGA GGC CGC GAG3'), 100ng del primer AR2 que està marcat amb el fluorocrom FAM (5'CCA GGA CCA GGT AGC CTG TGG GGC3'), 1mM de cada nucleòtid, 3mM de MgCl₂, 0.25U de Taq Gold polimerasa i 2.5µl del Tampó 10x de la Taq Gold polimerassa.

Afegirem 10µl d'aquesta barreja a cada eppendorf i 10µl d'aigua (volum final 25µl).

La PCR es realitza en un termociclador ABI 2700 (Applied-Biosystem). Les condicions són les següents: 8' a 95 °C; 10 cicles: 45" 94 °C, 30" 60 °C, 30" 72 °C; 20 cicles: 45" 94 °C, 30" 57 °C, 30" 72 °C; i una fase final d'extensió de 10' a 72 °C.

2.2.3.6. Anàlisi i interpretació dels resultats

Un cop finalitzada l'amplificació de l'ADN afegim a cada pou d'una placa de 96: 1µl de la mostra, 10µl de formamida i 1µl del marcador de pes molecular fluorescent anomenat ROX (GENESCAN 500HD-ROX Applied).

Es treu qualsevol bombolla que hagi pogut quedar amb l'ajut d'una micropipeta i es fa migrar el producte d'amplificació per les columnes del seqüenciador ABIPrism 3100 (Applied). La interpretació dels resultats es fa amb l'ajut de l'aplicació GeneScan (programa d'anàlisi de fragments) que ens permet saber l'àrea i la mida de cada pic obtingut.

L'ADN que no hem digerit ens serveix per saber si un pacient és homozigot (un pic) o heterozigot (dos pics). L'ADN que hem digerit amb l'enzim de digestió sensible a la metilació ens permet estimar si les cèl·lules del pacient que estem estudiant tenen un origen clonal o policlonal. Per arribar a aquesta determinació hem aplicat la fórmula següent:

- Dividim el valor de l'àrea de l'al·lel menys representat dels granulòcits pel valor de l'àrea de l'al·lel més representat dels granulòcits i s'obté un número; repetim la mateixa operació però ara amb el valor de les àrees dels al·lells major i menor representats de les cèl·lules mononucleades CD3+. D'aquesta manera obtindrem un altre número que dividirem pel valor que hem obtingut pels granulòcits i ho multiplicarem per 100. Si el resultat que obtenim es menor o igual al 30% es considera clonal; si pel contrari el resultat és major al 30% es considera policlonal.

- Exemple de clonalitat:

Nom de l'al·lel digerit	Mida de l'al·lel digerit	Àrea de l'al·lel digerit
Granulòcit A	276.82	18805
Granulòcit B	282.77	2783
Mononucleada CD3+ A	276.98	45201
Mononucleada CD3+ B	282.92	35557

$$\text{Granulòcits: } 2783/18805 = \mathbf{0.15}$$

$$\text{Mononucleades CD3+: } 35557/45201 = \mathbf{0.79}$$

$$(\mathbf{0.15/0.79}) \times 100 = 19\%$$

Com que és menor que un 30% es considera CLONAL

- Exemple de policlonalitat:

Nom de l'al·lel digerit	Mida de l'al·lel digerit	Àrea de l'al·lel digerit
Granulòcit A	276.77	7292
Granulòcit B	291.52	16141
Mononucleada CD3+ A	276.77	3492
Mononucleada CD3+ B	291.52	7211

Granulòcits: $7292/16141 = 0.45$

Mononucleades CD3+: $3492/7211 = 0.48$

$(0.45/0.48) \times 100 = 93.75\%$

Com que és major que un 30% es considera POLICLONAL

2.3. REACTIUS I SOLUCIONS

2.3.1. Components del medi de cultiu

- RPMI-1640 (Biological Industries)
- Heparina sòdica 1% (Rovi)
- Sèrum boví fetal (Biological Industries)
- L-Glutamina 200 mM (Biological Industries)
- Penicil.lina (10.000 UI/mL)-Estreptomicina (10µg/mL) (Gibco)

2.3.2. Tècnica de citogenètica convencional

1. Mitogen

- Fitohemaglutinina (PHA) (Gibco)

2. Antimitòtic

- Colcemid 10µg/mL (Biological Industries)

3. Hipotònic

- Solució de clorur potàssic 0.075 M (Merck)

4. Fixador

- Carnoy
 - .3 parts de metanol p.a. (Merck)
 - .1 part d'àcid acètic p.a. (Merck)

5. Colorant

- Colorant de Wright (Sigma)
 - .0.25% en metanol p.a. (Merck)
 - . Agitar durant una hora a temperatura ambient
 - . Incubar durant 72 hores en estufa a 37°C
 - . Conservar a la nevera fins el moment de ser utilitzat
- Tampó de Sörensen
 - .4,539 mg/mL fosfat monopotàssic (Merck)
 - .5,938 mg/mL fosfat disòdic (Merck)

2.3.3. Tècnica d'hibridació in situ

1. Pretractaments

- Solució de 2xSSC
 - . 100 mL 20xSSC (veure apartat desnaturalització)
 - . 900 mL aigua destil·lada estèril

2. Desnaturalització

- Solució de formamida al 70%
 - . Formamida, p.a. (Merck)
 - . Solució de 20xSSC (pH 6.2-6.3)
 - . 88.23 mg/mL citrat trisòdic dihidratat (Merck)
 - . 175.32 mg/mL clorur sòdic (Merck)

3. Deshidratacions

- Solucions d'etanol, p.a. (Merck) al 70, 90 i 100%

4. Sondes

- Pintat cromosòmic
 - . *Star FISH paint box-Biotin labelled* (Cambio): sondes cromosomes 2 i 9
- Centromèriques
 - . *Alpha satellite 8 DNA probe* marcada amb *Spectrum Orange* (VYSIS)
 - . *Alpha satellite 9 DNA probe* marcada amb *Spectrum Green* (VYSIS)
- Específiques de locus
 - . Sonda LSI 13q14.3 (D13S319) marcada amb *Spectrum Orange* (Vysis)
 - . Sonda LSI 20q12 (D20S108) marcada amb *Spectrum Orange* (Vysis)
 - . Sonda TEL 13q (Tel(13q)) marcada amb *Spectrum Green* (Oncor)
 - . Sonda TEL 20p (Tel(20p)) marcada amb (Oncor)
 - . Sonda LSI BCR/ABL dual color ES marcada amb *Spectrum Orange* i *Spectrum Green* (Vysis)

5. Rentats de posthibridació

- Solució de formamida al 50%
- Solució de 2xSSC (100 mL de 20xSSC i 900 mL d'aigua destil·lada)
- Solució de 0.1xSSC (5 mL de 20xSSC i 995 mL d'aigua destil·lada)
- Solució de 2xSSC/Tween-20 al 0.1% (100 mL de 20xSSC, 900 mL d'aigua destil·lada i 1mL de Tween-20 (Sigma))

6. Detecció de la hibridació. Sondes marcades amb biotina

- Avidina (Oncor)
- Antiavidina (Oncor)
- DAPI II (DAPI+*Antifade*) (Vysis)

7. Detecció de la hibridació. Sondes fluorescents

- DAPI II (DAPI+*Antifade*) (Vysis)

2.3.4. Tècnica d'estudi de clonalitat mitjançant el polimorfisme del gen HUMARA

1. Obtenció de cèl·lules mononucleades i granulòcits per gradient discontinu

- Tampó PBS (Roche)
- Histopaque® 1077 (Axis-Shield)
- Histopaque® 1119 (Sigma)
- Clorur d'amoni (Merck)

2. Separació de les cèl·lules mononucleades en cèl·lules CD3+ i cèl·lules CD3-

- Albumina bovina (BSA) (Sigma)
- EDTA, Titriplex III (Merck)
- MS Columnes de separació (Miltenyi Biotec)
- CD3 Microbeads, human (anticos CD3) (Miltenyi Biotec)

3. Extracció d'ADN de sang perifèrica

- MagAttract DNA-blood Midi M48 (Qiagen)

4. Digestió de l'ADN

- Enzim de restricció HpaI (Invitrogen)
- Tampó de l'enzim de restricció HpaI (Invitrogen)

5. Amplificació de l'ADN mitjançant la tècnica de la PCR

- Primers (Qiagen)
- Clorur de Magnesi (Applied Biosystem)
- Nucleòtids (DNTP 100mM) (Invitrogen)
- Ampli Taq Gold (Applied Biosystem)
- Tampó II de l'Ampli Taq Gold (Applied Biosystem)

6. Anàlisi i interpretació dels resultats

- Formamida (Merck)
- Marcador de Pes molecular 500 ROX (Applied Biosystem)

3. ARTICLES

3.1. ARTICLE 1: “Is FISH a useful method in the diagnosis of Polycythemia Vera patients?”. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;151:139-145.

Is fluorescence in situ hybridization a useful method in diagnosis of polycythemia vera patients?

Lurdes Zamora^{a,b,*}, Blanca Espinet^{a,c}, Lourdes Florensa^{c,d}, Carles Besses^e,
Soledad Woessner^c, Sergi Serrano^{a,d}, Francesc Solé^{a,c}

^aLaboratori de Citogenètica i Biologia Molecular, Servei de Patologia, Hospital del Mar, Passeig Marítim, 25-29, Barcelona 08003, Spain

^bUnitat Antropologia, Departament de Biologia Animal, Vegetal i Ecologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

^cEscola de Citologia Hematològica, Soledad Woessner-IMAS, Hospital del Mar, IMAS, Barcelona, Spain

^dLaboratori de Citologia Hematològica, Servei de Patologia, Hospital del Mar, Passeig Marítim, 25-29, Barcelona 08003, Spain

^eServei d'Hematologia Clínica, Hospital del Mar, Passeig Marítim, 25-29, Barcelona 08003, Spain

Received 3 July 2003; received in revised form 26 August 2003; accepted 8 September 2003

Abstract

Polycythemia vera (PV) is a clonal stem cell disease with trilineage myeloid involvement, characterized by a growth factor-independent erythroid proliferation. At the time of diagnosis, the percentage of cytogenetic abnormalities using conventional cytogenetic techniques is less than 20% of all PV patients. In the present study, we compare the results between conventional cytogenetic methods and fluorescence in situ hybridization (FISH) probes in 31 untreated PV patients. The karyotypes of all 31 cases were obtained from 24-hour bone marrow cell cultures. The fixed material, proceeding from conventional cytogenetics cultures, was analyzed with FISH, using centromeric probes for chromosomes 8 and 9 and locus-specific probes for 13q14 and 20q12 regions. Five cases (17.8%) showed an abnormal karyotype with conventional cytogenetics. When FISH probes were used, three alterations not detected with conventional cytogenetics, were found: two cases with D20S108 deletions and one with a D13S319 deletion, increasing the percentage of abnormal karyotypes to 19.3%. We conclude that, probably, the application of FISH with the mentioned probes, is not very useful to detect cytogenetic aberrations in untreated PV patients. © 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Polycythemia vera (PV) is a clonal myeloproliferative disorder characterized by a clonal increase in red blood cell, granulocytes and platelets, with erythrocytosis being the clinical hallmark of the disease.

Thrombosis and bleeding are major causes of morbidity and death in patients with PV. Other life-threatening complications of PV include disease transformation into agnogenic myeloid metaplasia or acute leukemia. Therefore, the distinction of PV from secondary nonclonal polycythemia represents a critical issue in terms of prognostic significance.

In 1975, the Polycythemia Vera Study Group (PVSG) [1] published a set of diagnostic criteria to standardize the diagnosis of PV and to ensure the exclusion of secondary

polycythemic patients from treatment protocols. Pearson [2] proposed several new diagnostic criteria not incorporated in the original PVSG criteria, including some laboratory techniques such as clonality markers as major diagnostic criteria. Thus, in the absence of specific genetic markers, the finding of an abnormal karyotype in a polycythemic patient makes the diagnosis of PV virtually certain.

At diagnosis, cytogenetic abnormalities are found in 13–18% of cases. The most common recurring aberrations with conventional cytogenetics (reviewed in Table 1), include +8, +9, del(20q), del(13q), and 1q duplications; in some cases, +8 and +9 are found together [3–19]. Chromosomal abnormalities are seen with increasing frequency in disease progression (34%) and in 80–90% of patients with late-stage disease [7,9,10,18,19].

Fluorescence in situ hybridization (FISH) technology allows the enumeration and identification of chromosomes in nondividing cells (interphase FISH). As a result of the

* Corresponding author. Tel: +34-93-248-3035; fax: +34-93-248-3131.

E-mail address: lurdes.zamora@wanadoo.es; e0037@imas.imim.es (L. Zamora).

application of this technology, more cells can be evaluated, and therefore, some abnormalities, particularly small deletions, not previously detected with conventional cytogenetics can be identified.

In the present study, we compare the results from conventional cytogenetics methods with those obtained by the application of FISH probes for the detection of trisomies 8 and 9, and deletions for the long arm of chromosomes 13

Table 1

Review of the literature showing the most common recurring abnormalities in PV, detected with conventional cytogenetics

Reference	No. of patients	No. of patients with abnormal karyotype (%)	Abnormal karyotypes ^a	% Cells abnormal
Koulischer et al., 1967 [4]	4	1	46,XX,Gq-(Ph ₁)	10
Nagy and Yurgutis, 1967 [5]	5	0	—	—
Barnes et al., 1969 [6]	5	0	—	—
Lawler et al., 1970 [7]	32	4	45,X,-X	30
			47,XX,+C/48,XX,+C,+C	25
			47,XX,+C	100
			47,XX,+C	90
Rowley, 1973 [8]	1	1	46,XY,t(12;17)/47,X,mar(Y;1),+9	N/A
Visfeldt et al., 1973 [9]	17	2 (12%)	47,XY,+C	76
			46,XY,-F?	45
Berger et al., 1974 [10]	27	0	—	—
Shiraishi et al., 1975 [11]	3	0	—	—
Gras et al., 1975, [12]	13	2	48,XX,+C,+C/48,XX,+B,+C	75
Wurster-Hill et al., 1976 [13]	131	14 (11%)	46,XX,-15,+t(1;15)	n/a
			47,XX,+A	N/A
			47,XX,+1p-	N/A
			47,XX,+C	N/A
			47,XX,+9	N/A
			44~48,XX,+9	N/A
			47,XY,+C	N/A
			47,XY,+C	N/A
			48,XY,+C,+C	N/A
			47,XX,+C	N/A
			47,XX,+8	N/A
			47,XX,+C	N/A
			47,XX,+mar	N/A
			46,XX,13q-	N/A
Westin et al., 1976 [14]	50	7 (14%)	48,XY,+8,+9	26
			48,XY,+8,+9	98
			45,XY,-16	18
			47,XY,+del(1)(p21)?,del(20)(q11)	100
			47,XX,+t(1;9)(q22;q13)	100
			47,XY,+mar	86
			48,XX,+8,+9	30
Rege-Cambrin et al., 1987 [15]	68	9 (13%)	46,XX,del(20)(q11)	25
			46,XY,13q-	60
			46,XY,13q-	10
			48,XY,+8,+9	80
			47,XY,+9	100
			47,XX,+8	70
			48,XX,+9,+21	50
			47,XY,+9	15
			48,XY,t(7;19)(q21;q12),+8,+9	50
Diez-Martin et al., 1991 [16]	104	9/47 (19%) ^b	46,XX,del(20)(q11q13)	100
			46,XX,dir dup(13)(q22→q34)	100
			47,XY,+8	10
			48,XX,+8,+9	100
			46,XX,del(20)(q11)	100
			47,XY,+mar/48,XY,+der(?)t(1;?)(q12;?),+mar/ .XY,+2mar/49,XY,+der(?)t(1;?)(q12;?),+2mar	3/6/3/3
			46,XY,t(8;13)(p21;q12)/47,XY,(8;13)(p21;q12), +der(13)t(8;13)(p21;q12)/.XY,+X, t(8;13)(p21;q12),+der(13)t(8;13)(p21;q12)	20/30/50
			46,X,-Y,+9	100
			47,XY,+8	100

(continued)

Table 1
(Continued)

Reference	No. of patients	No. of patients with abnormal karyotype (%)	Abnormal karyotypes	% Cells abnormal
Najfeld et al., 2002 [17]	220	52/204 (25.4%) ^c	Alterations of chromosome 9: 10 cases Alterations of chromosome 8: 7 cases Alterations of chromosome 20: 9 cases Alterations of chromosome 13: 5 cases Alterations of chromosome 1: 3 cases Alterations of chromosome 5 or 7: 5 cases Loss of Y: 3 cases Alterations of chromosome 3: 3 cases Other abnormalities: 7 cases	8–100 ^c 15–100 ^c 9–100 ^c 85–100 ^c 30–100 ^c 29–100 ^c 50–100 ^c 50–100 ^c 15–100 ^c

Abbreviation: N/A, not available.

^a Before the publication of the ISCN 1995 [20], some authors used capital letters other than X and Y for the autosomes (i.e., B, C, F, G) when chromosome morphology did not allow a correct classification.

^b We considered only 47 of the 104 cases, because the rest were leukemia—myelodysplastic syndrome, post-PV with myeloid metaplasia, or PV with myelofibrosis.

^c For details, see the original paper.

and 20, in 31 PV patients not previously treated with cytoreductive drugs.

2. Patients and methods

2.1. Subjects

Thirty-one bone marrow samples from patients diagnosed with PV according to the PVSG criteria and who had not previously received cytolytic treatment were studied. There were 15 women and 16 men. Peripheral blood samples from 10 healthy volunteers (5 women and 5 men) were also obtained during the study and were used as assay validation controls.

2.2. Conventional cytogenetics

Chromosome analyses were performed on hematologic cells from 24-hour bone marrow cultures. Cells were incubated for 24 hours at 37°C and harvested after exposure to colchicine for 30 minutes at 37°C. After cells had been treated with a hypotonic solution for 30 minutes at 37°C, three fixative changes were performed before slide preparation. Slides were aged in a slide warmer at 100°C for 1 hour to obtain G-bands, and then were stained with Wright's solution. Karyotypes were described according to the ISCN 1995 [20].

2.3. Fluorescence in situ hybridization

FISH analyses were performed on fixed isolated nuclei proceeding from conventional cytogenetics cultures. Slides were prepared and aged for 24 hours at room temperature. Five microliters of the mixture of probe solution was added to each slide and covered by a coverslip. The slides and probes were denatured for 1 minute at 75°C in a slide-warmer plaque (Hybrite; Vysis, Downers Grove, IL) and then were hybridized at 37°C overnight. Posthybridization washes consisted of three changes for 10 minutes each in 50% formamide solution at 45°C, one change of 10 minutes in 2×

standard saline citrate (SSC) at 45°C and one change of 5 minutes in 2× SSC–0.1% NP-40. Finally, slides were counterstained using a medium containing 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride.

Probes were applied as follows. We simultaneously added fluorophore-labeled α -satellite DNA probes specific for the centromeres of chromosomes 8 (red label) and 9 (green label) to each slide. To detect deletions of the D13S319 locus (13q14 region), we simultaneously added a red fluorophore-labeled DNA probe specific for this region plus a control probe, Tel(13q), located at the telomeric long-arm region of chromosome 13 labeled in green. To detect deletions of the D20S108 locus (20q12 region), we simultaneously added a red fluorophore-labeled DNA probe specific for this region plus a control probe, Tel(20p), located at the telomeric short-arm region of chromosome 20, labeled in green. Probes were obtained from Vysis (no. 8 and no. 9 centromeric probes and D13S319 and D20S108 probes) and from Appligene Oncor (Illkirch, France) (13q and 20p telomeric region probes).

Slides were evaluated in a fluorescence microscope (Eclipse 600; Nikon) by two observers, without knowledge of any previous karyotyping results. The percentages of nuclei bearing one, two, three, or more signals were determined from counts of 500 nuclei when centromeric probes were tested and 200 nuclei when locus-specific probes were studied.

Thresholds for demonstration of abnormalities were established using fixed material from conventional cytogenetics cultures from 10 normal subjects. The mean plus three standard deviations of the percentage of nuclei from normal subjects exhibiting three signals of the centromere of chromosomes 8 and 9 were 0.29% (0.04 + 0.25) and 0.79% (0.02 + 0.19), respectively. The mean plus three standard deviations of the percentage of nuclei bearing one 13q14 or 20q12 signal and two telomeric signals were 6.24% (1.65 + 4.59) and 3.9% (0.87 + 3.03), respectively. For these reasons, we considered a true trisomy when more than 1.2%

or 2.3% of studied nuclei showed three signals and a true monosomy when more than 6 or 5% of studied nuclei presented one signal, respectively.

3. Results

Conventional cytogenetics results were available for 28 of the 31 studied patients; no metaphases were obtained for the other 3. Five of the 28 cases (17.8%) showed abnormalities with conventional cytogenetics (Table 2). Interphase FISH was performed in all cases. Three of the 31 cases (9.7%) showed chromosomal abnormalities. No case showed trisomies of chromosomes 8 and 9; one case (3.2%) showed a 13q14 deletion, detected in 57% of the evaluated cells; and in two cases (6.4%) a 20q12 deletion was found (hemizygous in both cases), detected in 16 and 63% of the cells, respectively. There were no cases with more than one abnormality detected with FISH (Table 3).

The application of FISH increased the detection of some chromosome abnormalities not seen with conventional cytogenetics from 17.8% to 19.3% and additionally allowed

information on the karyotype in the three patients excluded from G-banding study for lack of metaphases (Table 3).

4. Discussion

Our objective in the present study was to ascertain if FISH probes yield more information about chromosomal abnormalities than conventional cytogenetics in nontreated PV patients.

The use of FISH allows detection of specific karyotype abnormalities in nondividing cells. Because FISH is based on the detection of fluorescence signals and not on the interpretation of subtle chromosome morphology, it is considered to be more sensitive, more specific, and easier to apply than conventional cytogenetics for detecting small deletions.

In the present study, we applied FISH to the study of untreated PV patients. The diagnosis of PV depends on the exclusion of secondary erythrocytosis and the finding of nonspecific hematological markers [2,21]. The identification of an abnormal karyotype is particularly useful in those patients with an increased red cell mass and no cause for

Table 2
Conventional cytogenetic and fluorescence in situ hybridization findings in 31 untreated PV patients

Case no.	Karyotype [no. of cells]	Alterations detected with FISH			
		CEP 8	CEP 9	D13S319	D20S108
1	46,XX[5]	N	N	N	N
2	46,XY[20]	N	N	N	N
3	46,XX[17]	N	N	N	N
4	No mitosis	N	N	N	N
5	46,XY[20]	N	N	N	N
6	46,XY[20]	N	N	N	N
7	46,XX[20]	N	N	N	N
8	46,XX[15]	N	N	N	N
9	46,XY[20]	N	N	N	N
10	46,XX[20]	N	N	N	N
11	46~48,XY,add(12)(q24),+15,del(18)(q11),+mar[cp7]/46,XY[13]	N	N	N	N
12	44,XY,-5,add(7)(p22),-17[20]	N	N	57% (deletion)	N
13	46,XY[20]	N	N	N	N
14	46,XX[20]	N	N	N	16% (deletion)
15	46,XY[20]	N	N	N	N
16	46,XX,add(18)(p11)[10]/46,XX[10]	N	N	N	N
17	46,XX[1]	N	N	N	N
18	44,XX,del(6)(q21),t(15;20)(q22;q12)[18]/44,XX[2]	N	N	N	63% (deletion)
19	46,XX[20]	N	N	N	N
20	46,XY[20]	N	N	N	N
21	46,XY[20]	N	N	N	N
22	46,XY[20]	N	N	N	N
23	46,XX,der(14)t(1;14)(q10;q10)[8]/46,XX[12]	N	N	N	N
24	46,XX[20]	N	N	N	N
25	46,XY[20]	N	N	N	N
26	No mitosis	N	N	N	N
27	46,XY[20]	N	N	N	N
28	46,XY[20]	N	N	N	N
29	No mitosis	N	N	N	N
30	46,XY[20]	N	N	N	N
31	46,XX[20]	N	N	N	N

Abbreviations: CEP, centromeric probe; N, normal; ND, not done.

Table 3
Summary of chromosome abnormalities detected with conventional cytogenetics and FISH in 31 PV patients

Karyotype	Conventional cytogenetics, no. of cases (%) ^a	FISH, no. of cases (%)
Normal	23/28 (82.1%)	28/31 (90.3%)
+8	0/28 (0%)	0/31 (0%)
+9	0/28 (0%)	0/31 (0%)
del(13)(q14)	0/28 (0%)	1/31 (3.2%)
del(20)(q12)	0/28 (0%)	2/31 (6.4%)
Abnormal	5/28 (17.8%)	3/31 (9.7%)
Total (conventional cytogenetics + FISH)	6/31 (19.3%) ^b	

^a Conventional cytogenetics results available for only 28 of the 31 cases; for the other 3, no mitoses were observed.

^b See Table 2.

secondary erythrocytosis, in that it makes the diagnosis of PV nearly certain. Unfortunately, with conventional cytogenetics the majority of PV patients have a normal karyotype at diagnosis [22].

When a review of the literature is made, we find that trisomies 8 and 9 and deletions in 13q and 20q are the abnormalities most frequently detected with conventional cytogenetics (Table 1).

Because FISH is known to have a higher sensitivity, we reevaluated the karyotypes of PV patients to see if this technique could help in the detection of more abnormal karyotypes. We selected four markers (trisomy 8, trisomy 9, 13q deletions, and 20q deletions) [3–19]. To detect deletions in 13q and 20q, we selected D13S319 and D20S108 probes because they are loci involved in the common deleted regions of chronic myeloproliferative disorders (CMPD). The use of other probes could generate different positive detection rates.

In our study, FISH revealed cytogenetic alterations in 3 of the 31 PV patients not previously treated with chemotherapy, alterations not seen with G-banding conventional techniques.

These results are in concordance with a recently study by Najfeld et al. [17], who used the same FISH probes. It is remarkable that in both studies the percentage of abnormal cases detected was slightly higher when FISH was used (up from 17.8% to 19.3% in our study and up from 23% to 29% in the Najfeld et al. study [17]).

The percentage of abnormalities in our study differs from two series reported by Amiel et al. [23] and Westwood et al. [24]. In our series, no patient had received cytoreductive treatment, whereas in their studies patients were unselected. Thus, 10 out of 14 patients (71%) from the study of Amiel et al. [23] had trisomy 8 or 9, but all of them had been treated with hydroxyurea, ³²P, or both. In the Westwood et al. study [24], 15 out of 64 patients (23%) presented cytogenetic aberrations detected with FISH (trisomy 8 or 9 or D20S108 deletion); however, 9 of the 15 abnormal cases had been treated at the time of study.

These results may reflect leukemogenic effects of the treatment or may indicate that patients whose disease is

progressive (and therefore requiring more aggressive treatment) are more likely to develop cytogenetic changes [22].

We note that patient 18, who has a t(15;20)(q22;q12), also has a hemizygous deletion of 20q12 chromosome band. This phenomenon occurs in other translocations, such as t(12;21)(p13;q22) or t(9;22)(q34.1;q11.2) [25–28]. In such cases, the translocations involving the *TEL* or *ABL* gene may be accompanied by a deletion of the *TEL* gene not involved in the translocation [25–26] or of the *ABL* gene involved in the translocation [27,28].

Deletions of the long arm of chromosome 20 are widely involved in myeloid malignancies, such as CMPD, myelodysplastic syndromes, and acute myeloid leukemia [29–32], but are rarely seen in lymphoid diseases [33]. This association suggests that deletions of 20q point to the possible localization of one or more genes that are lost or inactivated in the hemopoietic progenitors. Although studies about the relation of prognosis to 20q deletions are limited, no differences between rates of survival in patients with and without the above-mentioned chromosomal aberration have been found [34,35]. This makes the 20q deletion, as a sole abnormality, an alteration with a relatively good prognosis [36,37]. Deletions of 13q are more common in idiopathic myelofibrosis than in other CMPD and no data are yet available for the prognostic value of 13q deletions in PV [19].

To sum up, our experience, in concordance with other studies [17], corroborates that interphase FISH analysis can detect some karyotypic abnormalities that are not detected with conventional cytogenetics. If we add the alterations detected with FISH to those with an abnormal karyotype under conventional cytogenetics, 19.3% of patients had altered karyotypes in untreated PV patients, which is slightly higher than the 17.8% found with conventional cytogenetics.

It will be of interest to follow these patients with cytogenetic aberrations detected with FISH to establish the prognostic value of these karyotypic abnormalities. New studies using other probes would be needed to find more cases with cytogenetic alterations in untreated PV patients.

Nonetheless, although the application of FISH expanded the utility of cytogenetics, the small magnitude of the increase in percentage of abnormalities (1.5% in our study; 6% in the Najfeld et al. study [17]) makes us wonder whether other, newer technologies, such as detection of clonality by using the polymorphism of the *AR* gene (alias *HUMARA*) [38–42] or the recent description of the *PRV1* gene overexpression in PV and essential thrombocythemia [42–44], would be more useful than FISH probes or conventional cytogenetics to detect clonality in PV patients.

Acknowledgments

This work was supported by grant FIS 01/1424 from the “Ministerio de Sanidad y Consumo” and grant SAF-2001-4947 from the “Ministerio de Ciencia y Tecnología,” Spain. The authors wish to thank Rosa M^a Vilà, Rosa Navarro, and Carme Melero for their excellent technical assistance.

References

- [1] Berlin NI. Diagnosis and classification of the polycythemia. *Semin Hematol* 1975;12:339–51.
- [2] Pearson TC. Evaluation of diagnostic criteria in polycythemia vera. *Semin Hematol* 2001;38(suppl 2):21–4.
- [3] Dewald GW, Wright PI. Chromosome abnormalities in the myeloproliferative disorders. *Semin Oncol* 1995;22:341–54.
- [4] Koulischer L, Frühling J, Henry J. Cytogenetic findings in Vaquez' disease. [in French]. *Eur J Cancer* 1967;3:193–201.
- [5] Nagy G, Yurgutis RP. Chromosome studies on patients with polycythemia vera. *Haematologia* 1968;2:179–86.
- [6] Barnes CA, Holmes HL, Ilbery PLT. Chromosome aberrations following radiophosphorus treatment of polycythemia. *Australas Radiol* 1969;13:396–417.
- [7] Lawler SD, Millard RE, Kay HEM. Further cytogenetical investigations in polycythemia vera. *Eur J Cancer* 1970;6:223–33.
- [8] Rowley JD. Acquired trisomy 9. *Lancet* 1973;2(7825):390.
- [9] Visfeldt J, Franzén S, Nielsen A, Tribukait B. Primary polycythemia. 3. Studies of the significance of the history of the disease and of the treatment for the development of clones in bone marrow cells. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1973;81:195–203.
- [10] Berger R, Parmentier C, Droz JP. Karyotype studies in primary polycythemia vera [in French]. *Nouv Rev Fr Hematol* 1974;14:705–12.
- [11] Shiraiishi Y, Hayata I, Sakurai M, Sandberg AA. Chromosomes and causation of human cancer and leukemia. XII. Banding analysis of abnormal chromosomes in polycythemia vera. *Cancer* 1975;36:199–202.
- [12] Gras L, Cowling DC, Sullivan J, Hurley TH. Unusual chromosomal changes in polycythemia vera. *Med J Aust* 1975;1:37–8.
- [13] Wurster-Hill D, Whang-Peng J, McIntyre OR, Hsu LYF, Hirschhorn K, Modan B, Pisciotta AV, Pierre R, Balcerzak SP, Murphy S, Weinfeld A. Cytogenetic studies in polycythemia vera. *Semin Hematol* 1976;13:13–32.
- [14] Westin J, Wahlström J, Swolin B. Chromosome studies in untreated polycythaemia vera. *Scand J Haematol* 1976;17:183–96.
- [15] Rege-Cambria G, Mecucci C, Tricot G, Michaux JL, Louwagie A, Van Hove W, Francart H, Van den Berghe H. A chromosomal profile of polycythemia vera. *Cancer Genet Cytogenet* 1987;25:233–45.
- [16] Diez-Martin JL, Graham DL, Pettitt RM, Dewald GW. Chromosome studies in 104 patients with polycythemia vera. *Mayo Clin Proc* 1991;66:287–99.
- [17] Najfeld V, Montella L, Scalise A, Fruchtman S. Exploring polycythaemia vera with fluorescence in situ hybridization: additional cryptic 9p is the most frequent abnormality detected. *Br J Haematol* 2002;119:558–66.
- [18] Swolin B, Weinfeld A, Westin J. A prospective long-term cytogenetic study in polycythemia vera in relation to treatment and clinical course. *Blood* 1988;72:386–95.
- [19] Bench AJ, Cross NC, Huntly BJ, Nacheva EP, Green AR. Myeloproliferative disorders. [Review]. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001;14:531–51.
- [20] Mitelman F, editor. An international system for human cytogenetic nomenclature. Basel: S. Karger, 1995.
- [21] Pearson TC. Diagnosis and classification of erythrocytoses and thrombocytoses. [Review]. *Baillieres Clin Haematol* 1998;11:695–720.
- [22] Bench AJ, Nacheva EP, Champion KM, Green AR. Molecular genetics and cytogenetics of myeloproliferative disorders. [Review]. *Baillieres Clin Haematol* 1998;11:819–48.
- [23] Amiel A, Gaber E, Manor Y, Fejgin M, Joseph-Lerner N, Ravid M, Lishner M. Fluorescence in situ hybridization for the detection of trisomies 8 and 9 in polycythemia vera. *Cancer Genet Cytogenet* 1995;79:153–6.
- [24] Westwood NB, Gruszka-Westwood AM, Pearson CE, Delord CF, Green AR, Huntly BJ, Lakhani A, McMullin MF, Pearson TC. The incidences of trisomy 8, trisomy 9 and D20S108 deletion in polycythaemia vera: an analysis of blood granulocytes using interphase fluorescence in situ hybridization. *Br J Haematol* 2000;110:839–46.
- [25] Raynaud S, Cave H, Baens M, Bastard C, Cacheux V, Grosgeorge J, Guidal-Giroux C, Guo C, Vilmer E, Marynen P, Grandchamp B. The 12;21 translocation involving *TEL* and deletion of the other *TEL* allele: two frequently associated alterations found in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1996;87:2891–9.
- [26] Kempski HM, Sturt NT. The *TEL-AML1* fusion accompanied by loss of the untranslocated *TEL* allele in B-precursor acute lymphoblastic leukaemia of childhood. *Leuk Lymphoma* 2000;40:39–47.
- [27] Sinclair PB, Nacheva EP, Leversha M, Telford N, Chang J, Reid A, Bench A, Champion K, Huntly B, Green AR. Large deletions at the t(9;22) breakpoint are common and may identify a poor-prognosis subgroup of patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000;95:738–43.
- [28] Huntly BJ, Reid AG, Bench AJ, Campbell LJ, Telford N, Shepherd P, Szer J, Prince HM, Turner P, Grace C, Nacheva EP, Green AR. Deletions of the derivative chromosome 9 occur at the time of the Philadelphia translocation and provide a powerful and independent prognostic indicator in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2001;98:1732–8.
- [29] Dewald GW, Schad CR, Lilla VC, Jalal SM. Frequency and photographs of *HGM11* chromosome anomalies in bone marrow samples from 3,996 patients with malignant hematologic neoplasms. *Cancer Genet Cytogenet* 1993;68:60–9.
- [30] Fenaux P, Morel P, Lai JL. Cytogenetics of myelodysplastic syndromes. *Semin Hematol* 1996;33:127–38.
- [31] Solé F, Espinet B, Sanz GF, Cervera J, Calasanz MJ, Luno E, Prieto F, Granada I, Hernandez JM, Cigudosa JC, Diez JL, Bureo E, Marques ML, Arranz E, Rios R, Martinez Climent JA, Vallespi T, Florensa L, Woessner S. Incidence, characterization and prognostic significance of chromosomal abnormalities in 640 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 2000;108:346–56.
- [32] Heim S, Mitelman F. Cytogenetic analysis in the diagnosis of acute leukemia. *Cancer* 1992;70:1701–9.
- [33] Mitelman F, Mertens F, Johansson B. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat Genet* 1997;15:417–74.
- [34] Davis MP, Dewald GW, Pierre RV, Hoagland HC. Hematologic manifestations associated with deletions of the long arm of chromosome 20. *Cancer Genet Cytogenet* 1984;12:63–71.
- [35] Campbell LJ, Garson OM. The prognostic significance of deletion of the long arm of chromosome 20 in myeloid disorders. *Leukemia* 1994;8:67–71.
- [36] Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D, Ohyashiki K, Toyama K, Aul C, Muftic G, Bennett J. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. [Erratum: *Blood* 1998;91:1100.] *Blood* 1997;89:2079–88.
- [37] Wattel E, Lai JL, Hebban M, Preudhomme C, Grahek D, Morel P, Bauters F, Fenaux P. De novo myelodysplastic syndrome (MDS) with deletion of the long arm of chromosome 20: a subtype of MDS with distinct hematological and prognostic features? *Leuk Res* 1993;17:921–6.
- [38] El Kassab N, Hetet G, Li Y, Briere J, Grandchamp B. Clonal analysis of haemopoietic cells in essential thrombocythaemia. *Br J Haematol* 1995;90:131–7.
- [39] Champion KM, Gilbert JGR, Asimakopoulos FA, Hinshelwood S, Green AR. Clonal haemopoiesis in normal elderly women: implications for the myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1997;97:920–6.
- [40] Lucas GS, Padua RA, Masters GS, Oscier DG, Jacobs A. The application of X-chromosome gene probes to the diagnosis of myeloproliferative disease. *Br J Haematol* 1989;72:530–3.

- [41] Gilliland DG, Blanchard KL, Levy J, Perrin S, Bunn HF. Clonality in myeloproliferative disorders: analysis by means of the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:6848–52.
- [42] Liu E, Jelinek J, Pastore YD, Guan Y, Prchal JF, Prchal JT. Discrimination of polycythemia and thrombocytoses by novel, simple accurate clonality assays and comparison with PRV-1 expression and BFU-E response to erythropoietin. *Blood* 2003;101:3294–301 [electronic publication <http://www.bloodjournal.org>2002: DOI 10.1182/blood-2002-07-2287].
- [43] Temerinac S, Klippel S, Strunck E, Röder S, Lübbert M, Lange W, Azemar M, Meinhardt G, Schaefer HE, Pahl HL. Cloning of PRV-1, a novel member of the uPAR receptor superfamily, which is overexpressed in polycythemia rubra vera. *Blood* 2000;95:2569–76.
- [44] Teofili L, Martini M, Luongo M, Di Mario A, Leone G, De Stefano V, Larocca LM. Overexpression of the polycythemia rubra vera-1 gene in essential thrombocythemia. *Blood* 2002;20:4249–54.

3.2. ARTICLE 2: “Is the gain of 9p involved in the pathogenesis of polycythemia vera? A purpose of a case”. *Haematologica* 2002;87:(01)ECR05.

Is the gain of 9p involved in the pathogenesis of polycythemia vera?

A case report.

Lurdes Zamora,^{1,2} Elisabet Lloveras,¹ Blanca Espinet,² Carmen Muñoz,³
Cristina Perez,¹ Alberto Plaja¹

¹ Departament de Citogenètica, General-Lab. Laboratoris d'anàlisi,

²Laboratori de Citogenètica i Biologia Molecular, Departament de Patologia, Hospital del Mar; ³Servei d'Hematologia Clínica. Hospital del Sagrat Cor; Barcelona, Spain.

Correspondence: Dr Lurdes Zamora, Departament de Citogenètica, General-lab. Laboratoris d'anàlisi, C/ Londres, 45, 08036 Barcelona (SPAIN). Tel. +34-93-405.35.55. Fax: +34-93-248.31.31. E-mail: e0037@imas.imim.es

We present a woman affected by polycythemia vera with a bone marrow culture showing a 46,XX,add(2)(p25)[20] karyotype. FISH demonstrated that the additional material on chromosome 2 belongs to chromosome 9. This finding is in concordance with those of other authors who suggest that the amplification of a gene or genes on 9p may contribute to the pathogenesis of PV.

Polycythemia vera (PV) is a clonal myeloproliferative disorder characterized by an excessive bone marrow production of red cells, granulocytes and platelets leading to an increased red-cell mass in peripheral blood.

Clonal chromosomal abnormalities have been reported in 15% of patients with PV at diagnosis and in 40% of treated patients.¹ In both cases the same recurrent changes can be found: del(20q) is reported in about 27% of patients, other common aberrations being +8, +9, del(13q) and partial trisomy 1q.¹⁻³ Trisomy 9 can be complete or partial and is often associated with trisomy 1q; however, at present no correlation of this abnormality and a specific phase of the disease has been demonstrated. Recently a partial tetrasomy of the short arm of chromosome 9.⁴⁻⁷ has also been reported. We present a 70-year old woman referred to study polyglobulia. Physical examination revealed no abnormalities but ultrasonography showed an enlarged spleen. Laboratory findings revealed: leukocyte count 15.3x10⁹/L, Hb 20.7 g/dL, MCV 91fL, hematocrit 69.8%, erythrocytes 7.66x10⁹/L and platelets 552x10⁹/L. The biochemical profile showed a lactic dehydrogenase of 576 U/L. Arterial O₂ saturation was 96%. Leukocyte alkaline phosphatase activity was 134 in the absence of reactive conditions. Bone marrow aspirate showed hypercellularity with increased hypersegmentated megakaryocytes. Bone marrow histology showed hypercellularity with increased granulomonopoietic precursors and diffuse reticulin fibrosis. A 24-hour non-stimulated bone marrow culture showed a 46,XX[20] karyotype ([Figure 1](#) and [Table 1](#)).

Figure 1. Composite figure showing a) conventional karyotype 46,XX,add(2)(p25).ish der(2)t(2;9)(p25;p?); b) painting probe of chromosome 9 showing the extra material of this chromosome located in chromosome 2 and painting probe of chromosome 2 showing the absence of fluorescence at the end of one of this chromosome.

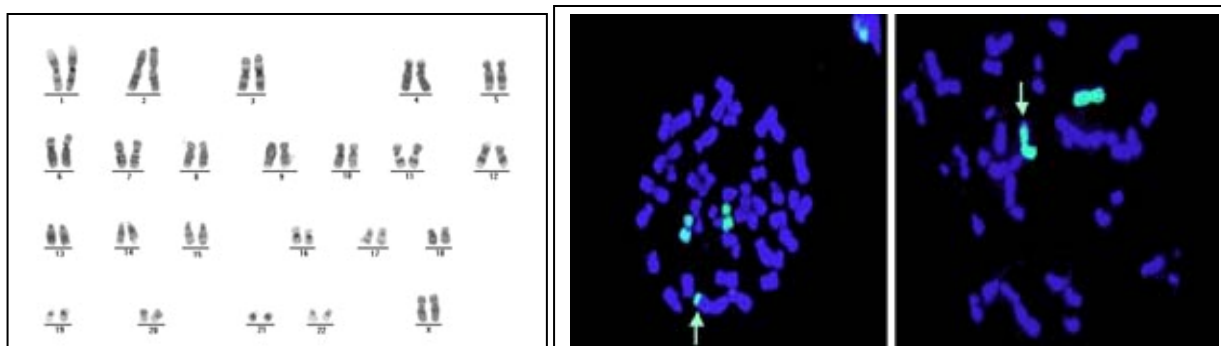


Table 1. Summary of partial and hole trisomies of chromosome 9 found in PV patientes.

Van de Loosdrecht (4)	Case 1:46,XX,add(15)(p13),add(21)(p13).ish der(15)t(9;15)(p13;p13)(wcp9+),der(21)(9;21)(p13;p13)(wcp9+)[16]/46,XX[4]
Nijs van Weert (5)	Case 1: 47,XX,+der(1)t(1q;9p)[25] Case 2: 47,XX,+9[6]/47,XX,+der(1)t(1q;9p)[2]/46,XX[7]
Blij-Philipsen (6)	Case 1: 46,XX,add(2)(p25).ish der(2)t(2;9)(p25;p')[24]/46,XX[9]
Chen Z (7)	Case 1: 47,XY,+9,i(9)(p10)[18]/46,XY[2] Case 2: 47,XY,+9,i(9)(p10)[17]/46,XY[3] Case 3: 46,XY,add(18)(p11.2).ish der(18)t(9;18)(p12;p11.2)(pcp9+)[3]/46,XY[17] Case 4: 47,XX,+1[18],add(1)(p12).ish der(1)t(1;9)(p12;p12)(pcp9+)[18],add(3)(p21)[7],del(7)(q22)[3],-13[3],del(20)(q11.2)[12],+mar[3][cp18]/46,XX[2]

A diagnosis of myeloproliferative disorder, compatible with PV, was established. The patient started treatment with hydroxyurea and phlebotomies followed by ^{32}P . A second cytogenetic analysis demonstrated a 46,XX,add(2)(p25)[20] karyotype. FISH with whole chromosome painting probes demonstrated that the additional material on chromosome 2 belonged to chromosome 9. G banding patterns strongly suggested 9p. The bcr/abl fusion gene was negative by fluorescence *in situ* hybridization. Our report and that by Blij-Philipsen⁶ suggest the existence of a new non-random chromosome structural abnormality in PV. What is more, the fact that trisomy 9 is found either at diagnosis or in treated patients and the discovery of the same aberration by Blij-Philipsen in an untreated PV patient might suggest that the amplification of a gene or genes on 9p may contribute to the pathogenesis of PV.

Interestingly Dai and Krantz demonstrated, in 11 PV patients, a marked increase in the expression of p16INK4a and p14ARF. This two genes are located in the INK4a/ARF locus from chromosome 9p.⁸ There have been descriptions of other candidate genes on 9p that could play a crucial role in the pathogenesis of PV, for example: interferon genes, endothelial-specific protein receptor tyrosine kinase gene (TEK), human interleukin-11 receptor alpha-chain gene (IL11RA), LTG9 or AF-9 gen, cyclin-dependent kinase inhibitor-2A Gene (CDKN2A).^{9,10} More reports of patients with partial trisomy or tetrasomy 9 are needed to determine the exact prognostic value of this new non-random chromosome anomaly and to study the exact role of these genes in the pathogenesis of PV.

Acknowledgments

This study was partially supported by the grants FIS 01/1424 from the Spanish "Ministerio de Sanidad y Consumo".

Key words: trisomy 9, polycythaemia vera

References

1. Rege-Cambrin G, Mecucci C, Tricot G, et al. A chromosome profile of polycythemia vera. *Cancer Genet Cytogenet* 1987;25:233-45.
2. Diez-Martin JL, Graham DL, Pettitt RM, Dewald GE. Chromosome studies in 104 patients with polycythemia vera. *Mayo Clin Proc* 1991;66:287-99.
3. Amiel A, Gaber E, Manor Y, et al. Fluorescence in situ hybridization for the detection of trisomies 8 and 9 in polycythemia vera. *Cancer Genet Cytogenet* 1995;79:153-6.
4. Van de Loosdrecht AA, De Wolf JTM, Noordhoek L, Van den Berg E. Partial tetrasomy of 9p: a rare chromosomal abnormality in polycythaemia vera. *Br J Haematol* 2001;112:1083-4.
5. Nijs van Weert JI, Beverstock G, Kievits T, Haak HL, Havik-Bogaard FCT, Leeksa CHW. der(1)t(1;9): a specific chromosome abnormality in polycythaemia vera? Cytogenetic and in situ hybridization studies. *Cancer Genet Cytogenet* 1989;40:121-7.
6. Blij-Philipsen MVD, Stellink F, Vlasveld LTH. Partial trisomy 9 in a patient with polycythemia vera. *Cancer Genet Cytogenet* 1997;97:81-2.
7. Chen Z, Notohamiprodjo M, Guan XY et al. Gain of 9p in the pathogenesis of polycythemia vera. *Genes Chromosom Cancer* 1998;22:321-4.
8. Dai C, Krantz SB. Increased expression of the INK4a/ARF locus in polycythemia vera. *Blood* 2001;97:3424-32.
9. Dumont DJ, Anderson L, Breitman ML, Duncan AMV. Assignment of the endothelial-specific protein receptor tyrosine kinase gene (TEK) to human chromosome 9p21. *Genomics* 1994;23:512-3.
10. Van Leuven F, Stas L, Hillider C, Miyake Y, Bilinski P, Gossler A. Molecular cloning and characterization of the human interleukin-11 receptor alpha-chain gene, IL11RA, located on chromosome 9p13. *Genomics* 1996;31:65-70.

3.3. ARTICLE 3: "Incidence of trisomy 8 and 9, deletion of D13S319 and D20S108 loci and BCR/ABL translocation in non-treated essential thrombocythaemia patients: an analysis of bone marrow cells using interphase fluorescence in situ hybridization". *Haematologica* 2003;88:110-111.

analysis, the International Prognostic Scoring System (IPSS),⁹ percentage of blasts, M/E ratio, FAB subtype, but not cyclin E IR, were significantly associated with survival (Table 1). Multivariate analysis showed that IPSS ($p=0.0068$) and RAEB-t subtype ($p=0.001$) were independent predictors of survival. Interestingly, when the survival analysis was restricted to the low-risk subset of RA/RARS, the variables of age ($p=0.0287$), IPSS ($p=0.0113$) and FAB subtype (RA vs. RARS, $p=0.0563$) were associated with survival. At multivariate analysis, the variable of age ($p=0.0284$) was the only independent predictor of survival in RA/RARS. Although cyclin E IR was more prevalent in RA/RARS with an adverse clinical course, this trend did not achieve statistical significance, either at univariate ($p=0.0759$), or multivariate ($p=0.0604$) analysis, possibly because of the relatively small number of cases.

Giancarlo Pruneri,* Nicola Fracchiolla,# Agostino Cortelezzi,#
Maurilio Ponzoni,@ Patrick Maisonneuve,@
Giorgio Lambertenghi-Delilieri#

*Division of Pathology and Laboratory Medicine, @Epidemiology and Biostatistics, European Institute of Oncology, University of Milan, School of Medicine: #Division of Hematology, Ospedale Maggiore Policlinico, IRCCS, University of Milan, School of Medicine: @Division of Pathology, S. Raffaele H Scientific Institute, Milan, Italy

Key words: p27, cyclin E, myelodysplastic syndromes.

Correspondence: Giancarlo Pruneri, M.D., Department of Pathology and Laboratory Medicine, European Institute of Oncology, via Ripamonti 435, 20141, Milan, Italy.

Fax: international +39.02.57489417.

E-mail: giancarlo.pruneri@ieo.it

Acknowledgments: we thank Francesco Bertolini and Giuseppe Viale for their useful comments and Nadia Carboni, Rita Mazza and Elisabetta Zappone for collecting clinico-pathologic data. GP and NF contributed equally to the work. GP was primarily responsible for the publication. PM was primarily responsible for Table 1.

Manuscript processing

This manuscript was peer-reviewed by two external referees and by Professor Mario Cazzola, Editor-in-Chief. The final decision to accept this paper for publication was taken jointly by Professor Cazzola and the Editors. Manuscript received May 7, 2002; accepted November 13, 2002.

References

- Erlanson M, Portin C, Linderholm B, Lindh J, Roos G, Landberg G. Expression of cyclin E and the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in malignant lymphomas-prognostic implications. *Blood* 1998;92:770-7.
- Yokozawa T, Towatari M, Iida H, Takeyama K, Tanimoto M, Kiyoi H, et al. Prognostic significance of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2000;14:28-33.
- Taniguchi T, Endo H, Chikatsu N, Uchimar K, Asano S, Fujita T, et al. Expression of p21(Cip1/Waf1/Sdi1) and p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitors during human hematopoiesis. *Blood* 1999;93:4167-78.
- Burger C, Wick M, Muller R. Lineage-specific regulation of cell cycle expression in differentiating myeloid cells. *J Cell Sci* 1994;107:2047-54.
- Furukawa Y, Kikuchi J, Nakamura M, Iwase S, Yamada H, Matsuda M. Lineage-specific regulation of cell cycle control gene expression during haematopoietic cell differentiation. *Br J Haematol* 2000;110:663-73.
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 1999;17:3835-49.
- Mazumder S, Gong B, Almasan A. Cyclin E induction by genotoxic stress leads to apoptosis of hematopoietic cells. *Oncogene* 2000;19:2828-35.
- Shetty V, Hussaini S, Broady-Robinson L, Allampallam K, Mundle S, Borok R, et al. Intramedullary apoptosis of hematopoietic cells in myelodysplastic syndrome patients can be massive: apoptotic cells recovered from high-density fraction of bone marrow aspirates. *Blood* 2000;96:1388-92.
- Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997;89:2079-88.

Incidence of trisomy 8 and 9, deletion of D13S319 and D20S108 loci and BCR/ABL translocation in non-treated essential thrombocythemia patients: an analysis of bone marrow cells using interphase fluorescence *in situ* hybridization

We compare conventional cytogenetics (CC) with fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in 53 untreated patients with essential thrombocythemia. CC revealed no abnormalities. When FISH was used, no BCR/ABL rearrangement nor trisomy 8 was found, but one trisomy 9, two del(13)(q14) and five del(20)(q12) were observed. FISH detected chromosome abnormalities in 15% of patients in which no alteration was found by CC.

Haematologica 2003;88:110-111

(http://www.haematologica.org/2003_01/88110.htm)

Essential thrombocythemia (ET) is a chronic myeloproliferative disorder (CMPD) with megakaryocytic proliferation in bone marrow resulting in a persistent increase in platelets in peripheral blood. In ET patients chromosome abnormalities detected by G-banding are rare, and no specific abnormality has been identified.¹ Only about 5% of patients show an abnormal karyotype at diagnosis.² The most frequent cytogenetic anomalies detected by conventional cytogenetics (CC) are trisomies of chromosomes 8 and 9 and deletions in 13q and 20q.¹

The finding of an abnormal karyotype would be useful to distinguish ET from secondary thrombocytosis as it gives a clonal hallmark to the disease. For this reason, we re-evaluated genetic findings obtained by CC using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) probes, with the aim of yielding more information about chromosomal abnormalities in ET patients.

Herein, we present 53 cases diagnosed as having ET according to the *Polycythemia Vera Study Group* (PVSG) criteria³ and who had not previously received cytolytic treatment. Samples from ten healthy volunteers were used as assay validation controls. Chromosome analyses were carried out on hematologic cells from 24-hour bone marrow cultures. Karyotypes were described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature.⁴

FISH studies were performed on fixed nuclei from CC following the standard procedures (Table 1). CC results were available in 49/53 patients, all showing a normal karyotype; in the remaining four cases no metaphases were obtained. When FISH was performed, no patient showed BCR/ABL rearrangement nor trisomy 8. One patient showed trisomy 9 in 30% of studied cells, in 2/53 patients a 13q14 deletion was found (frequencies 16% to 26.5%) and 5/53 patients presented a 20q12 deletion (frequencies 10.5% to 13.5%). Both monosomies were hemizygous. There were no cases with more than one abnormality. FISH probes detected chromosomal abnormalities in 8/53 ET patients (15.1%) (Table 2).

FISH studies have been done in ET patients in order to search for chromosome 8 and 9 abnormalities.^{5,6} Elis *et al.*⁵ reported

Table 1. Probes and controls used in the study.

Probes	Controls	Studied nuclei	Control values* ($\bar{X} \pm 3$ S.D.)
CEN #8	—	500	Trisomy >2.3%
CEN #9	—	500	Trisomy >1.2%
D13S319	tel(13q)	200	Monosomy >5%
D20S108	tel(20p)	200	Monosomy >6%
BCR/ABL	internal	200	Rearrangement <1%

*Control values were established based on peripheral blood of 10 controls. $\bar{X} \pm 3$ S.D. = mean plus three standard deviations.

Table 2. Summary of chromosome abnormalities detected by conventional cytogenetics and FISH in 53 ET patients.

	Conventional Cytogenetics* Number of cases (%)	FISH Number of cases (%)
Normal	49/49 (100%)	45/53 (84.9%)
+8	0/49 (0%)	0/53 (0%)
+9	0/49 (0%)	1/53 (1.9%)
del(13)(q14)	0/49 (0%)	2/53 (3.8%)
del(20)(q12)	0/49 (0%)	5/53 (9.4%)
Total (abnormal)	0/49 (0%)	8/53 (15.1%)

*In four cases no mitoses were observed.

an increased detection of trisomies 8 and 9 by FISH in ET patients with a normal karyotype by CC. They detected 5/18 patients with trisomy 8 and 5/18 with trisomy 9. Swolin *et al.*,⁶ however, did not find any new cases of trisomy 8 or 9, not previously found by CC, in a series of 22 patients. Two possible reasons could explain the differences between the results of the studies by Elis *et al.*,⁵ Swolin *et al.*,⁶ and ours. First, in the series examined by Elis *et al.*,⁵ patients had a long follow-up (range 1–13 years), while in our study and that by Swolin *et al.*,⁶ cytogenetic investigations were performed at diagnosis, in previously untreated patients. Second, the work of Elis *et al.*⁵ was carried out using peripheral blood, whereas ours and that by Swolin *et al.*,⁶ evaluated bone marrow cells. Additionally 7/10 patients with trisomies 8 and 9 in the series studied by Elis *et al.*⁵ were maintained on hydroxyurea at the time of cytogenetic investigation. As the number of cytogenetic abnormalities is greater in treated than in untreated patients,¹ this may reflect leukemogenic effects of treatment itself or may indicate that patients whose disease requires more aggressive treatment are more likely to develop cytogenetic changes.

The fact that FISH did not detect new cases of trisomy 8 in our series or in that of Swolin *et al.*⁶ corroborates the hypothesis that cells with trisomy 8 have a proliferative advantage over disomy 8 cells in culture, since the frequency of trisomy 8 cells is greater in bone marrow metaphases than in interphase nuclei.⁷

To our knowledge, no other studies have been conducted to test 13q14 and 20q12 probes in ET patients. We identified 2 and 5 patients with a hemizygous deletion in the 13q14 and 20q12 locus, respectively. These results encourage the use not only of centromeric probes from chromosome 8 and 9, but also probes from 13q14 and 20q12 loci, given the relatively high frequency of both deletions.

Although some papers⁸ have described ET patients with BCR/ABL rearrangement, we did not find this rearrangement in any patient in our series. Based on our previous experience⁹ and

present data we can not confirm the presence of BCR/ABL-positive ET cases.

In conclusion, our experience corroborates that interphase FISH allows a higher detection (15%) of cytogenetic abnormalities than CC, and therefore, we suggest that FISH should be incorporated in addition to CC for the detection of specific chromosomal abnormalities in ET.

It will be of interest to follow patients with cytogenetic aberrations in order to establish the prognostic value of these abnormalities.

Lurdes Zamora,* Blanca Espinet,^{†§} Lourdes Florensa,^{‡§} Carles Besses,[#] Marta Salido,* Francesc Solé^{§§}

^{*}Unitat Antropològica, Dept. Biologia Animal, Vegetal i Ecologia; Universitat Autònoma de Barcelona; [†]Laboratori de Citologia Hematològica, Servei de Patologia;

[‡]Servei d'Hematologia Clínica;

[§]Escola de Citologia Hematològica Soledad Woessner, Hospital del Mar, IMAS, Barcelona, Spain

Funding: this work was supported by grant FIS 01/1424 from the "Ministerio de Sanidad y Consumo", Spain.

Acknowledgments: the authors wish to thank Rosa M^ª Vilà, Rosa Navarro and Carme Melero for their excellent technical assistance.

Key words: essential thrombocythemia, FISH, conventional cytogenetics.

Correspondence: Lurdes Zamora, MD, Laboratori de Citogenètica i Biologia Molecular, Servei de Patologia, Hospital del Mar, Pg Marítim, 25–29, Barcelona 08003, Spain. Phone: international +34.93.2483035.

Fax: international +34.93.2483131.

E-mail: e0037@imas.imim.es

Manuscript processing

This manuscript was peer-reviewed by two external referees and by Professor Mario Cazzola, Editor-in-Chief. The final decision to accept this paper for publication was taken jointly by Professor Cazzola and the Editors. Manuscript received August 13, 2002; accepted November 7, 2002.

References

- Bench AJ, Nacheva EP, Champion KM, Green AR. Molecular genetics and cytogenetics of myeloproliferative disorders. *Baillieres Clin Haematol* 1998;11:819–48.
- Anonymous. Report on essential thrombocythemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1981;4:138–42.
- Murphy S, Peterson P, Iland H, Laszlo J. Experience of the Polycythemia Vera Study Group with essential thrombocythemia: a final report on diagnostic criteria, survival, and leukemic transition by treatment. *Semin Hematol* 1997;34:29–39.
- ISCN. Guidelines for Cancer Cytogenetics, Supplement to an International System for Human Cytogenetic Nomenclature. F Mitelman, editor. Basel: S. Karger; 1995.
- Elis A, Amiel A, Manor Y, Tangi I, Fejgin M, Lishner M. The detection of trisomies 8 and 9 in patients with essential thrombocytosis by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 1996;92:14–7.
- Swolin B, Safai-Kutti S, Anghem E, Kutti J. No increased frequency of trisomies 8 and 9 by fluorescence in situ hybridization in untreated patients with essential thrombocythemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;126:56–9.
- Bench AJ, Cross NC, Huntly BJ, Nacheva EP, Green AR. Myeloproliferative disorders. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001;14:531–51.
- Corradini P, Palumbo AP, Battaglio S, Ponzio G, Boccadoro M, Pileri A. Analysis of the breakpoint cluster region in essential thrombocythemia. *Haematologica* 1990;75:573–5.
- Solé F, Florensa L, Espinet B, Besses C, Lloveras E, Woessner S. Absence of bcr/abl rearrangement in 41 patients with essential thrombocythemia. *Haematologica* 2000;85:215–6.

3.4. ARTICLE 4: “Clonality analysis by HUMARA-PCR assay in a cohort of spanish females with essential thrombocythemia and polycythemia vera”.
Haematologica 2005;90:259-261.

*Unitat de Bioquímica, Departament de Ciències Fisiològiques I, Facultat de Medicina, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Spain;
 °Unitat d'Eritropatologia, IDIBAPS, Hospital Clínic, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Spain

Funding: this work was supported by Ministerio de Ciencia y Tecnología (Grants 99PM0040 and SAF-2001-1205) and by FIS (Instituto de Salud Carlos III, Red de Centros RCMN C03/08). We thank Miss Christine O'Hara for language revision.

Key words: phosphoglycerate mutase, PGAM, BB isoenzyme.

Correspondence: Fernando Climent, Unitat de Bioquímica, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Casanova 143, 08036 Barcelona, Spain. E-mail: fcliment@ub.edu

References

1. Fothergill-Gilmore L, Watson, H. The phosphoglycerate mutases. *Adv Enzymol* 1989;62:227-313.
2. Toscano A, Tsujino S, Vita G, Shanske S, Messina C, Di Mauro S. Molecular basis of muscle phosphoglycerate mutase (PGAM-M) deficiency in the Italian kindred. *Muscle Nerve* 1996;19:1134-7.
3. Tsujino S, Shanske S, Sakoda S, Toscano A, DiMauro S. Molecular genetic studies in muscle phosphoglycerate mutase (PGAM-M) deficiency. *Muscle Nerve* 1995;Suppl 3:S50-S3.
4. Repiso A, Pérez de la Ossa P, Avilés X, Oliva B, Juncá J, Oliva R, et al. Red blood cell phosphoglycerate mutase. Description of the first human BB isoenzyme mutation. *Haematologica* 2003;88:ECR07.
5. Castellá J, Ureña J, Ludevid D, Carreras J, Climent F. Immunological properties of rat phosphoglycerate mutase isozymes. *Biochim Biophys Acta* 1988;956:97-102.
6. Minakami S, Suzuki C, Saito T, Yoshikawa H. Studies on erythrocyte glycolysis. Determination of the glycolytic intermediates in human erythrocytes. *J Biol Chem* 1965;58:543-50.
7. Andrés V, Carreras J, Cussó R. Regulation of muscle phosphofructokinase by physiological concentrations of bisphosphorylated hexoses: effect of alkalization. *Biochem Biophys Res Comm* 1990;172:238-334.

Chronic Myeloproliferative Disorders

Clonality analysis by HUMARA assay in Spanish females with essential thrombocythemia and polycythemia vera

Analysis of the human androgen receptor gene (HUMARA) allows clonality to be assessed in essential thrombocythemia (ET) and polycythemia vera (PV). We studied clonality in 44 patients with ET, 18 with PV and in 64 healthy controls. The X-chromosome inactivation pattern was analyzed by HUMARA-polymerase chain reaction on DNA from purified granulocytes, T lymphocytes and the CD3⁻ fraction of mononuclear cells.

haematologica 2005; 90:259-261

(<http://www.haematologica.org/journal/2005/2/259.html>)

Essential thrombocythemia (ET) and polycythemia vera (PV) are clonal myeloproliferative disorders without consistent karyotypic and molecular markers. HUMARA analysis, an assay based on X-chromosome inactivation patterns (XCIP), allows clonality to be assessed in ET and PV. There is controversy over the percentage of clonal hematopoiesis in ET and little is known about this feature in PV patients.

The present study was conducted in a cohort of Spanish ET and PV patients to determine: (i) the percentage of

clonality in these disorders; (ii) differences in frequencies of clonality depending on whether granulocytes or CD3⁻ mononuclear cells are taken as the pathologic tissues and, (iii) the relationship between clonality status and the appearance of thrombotic and hemorrhagic complications. One hundred and twenty-six people were included in this study; 44 had ET, 18 had PV and 64 were healthy, age-matched controls. The diagnoses of ET and PV were established according to the PVSG criteria.

Mononuclear cells and granulocytes were isolated from peripheral blood. CD3⁺ lymphocytes were then separated from the CD3⁻ fraction by magnetic beads. Genomic DNA was extracted from each fraction. The HUMARA assay was performed according to normal procedures in our laboratory. Clonality was calculated after correcting for the degree of lyonization in CD3⁺ cells. Cells were considered to be clonally derived when the corrected allele ratio was <0.25. The sensitivity and specificity of the HUMARA assay in our study were 39% and 94%, respectively. The rate of heterozygosity of the HUMARA gene in our Spanish women was 88%. Table 1 shows the clinical data and HUMARA results from the ET and PV patients and the controls. We found significant differences in clonality results between controls and patients ($p < 0.001$). Clonality in normal controls has also been reported by other authors¹⁻⁹ (Table 2). Champion *et al.* suggested that this phenomenon could be more frequent in elderly women, probably due to constitutive skewing, age-related acquired skewing or genetic factors leading to selective pressure.² This might suggest that imbalanced myeloid XCIP in the presence of balanced T cell XCIP in elderly patients (>65 years) should not be certainly interpreted as clonal hematopoiesis.

A wide range of positivity for clonality has been reported in ET patients (18.7-68%).¹⁻⁹ These differences might be attributed to methodology, number of studied patients and criteria used to define a clonal pattern (allele ratios or the equation of Asimakopoulos *et al.*¹⁰) (Table 2). There are two studies reporting on clonality in PV. In one, 26/41 patients (8 ET, 30 PV and 3 primary myelofibrosis) had clonal proliferation,² and in the other, in which 31 PV patients were studied, hematopoiesis was clonal in 16/22.⁶

Clonality analysis in ET and PV has mainly been performed using granulocytes and platelets as target cells. A major limitation of platelets is that the study has to be performed on mRNA instead of DNA, using polymorphisms that are less heterozygous than the HUMARA gene. For this reason, we investigated not only granulocytes but also CD3⁻ mononuclear cells as these have been suggested to share a common abnormal hematopoietic precursor cell. Our data show that when CD3⁻ cells were tested instead of granulocytes, clonality was not detected in 13 patients and therefore a substantial number of clonal results could be missed ($p < 0.001$) (Table 1).

Although no significant correlation was found between clonality status and the patients' age, there was a statistical trend to more clonal cases among elderly (>65 year) women than among younger women ($p = 0.180$). This trend, not significant in our study, had been found to be statistically significant by other authors.^{4,9} When skewed cases were considered, there was statistical trend of more skewed cases in elderly women ($p = 0.075$).

It is known that the prevalence of thrombotic complications is strongly influenced by a patient's age and duration of follow-up. In addition, some authors observed that thrombosis occurred more frequently in clonal than in polyclonal ET patients.^{5,7,9} In contrast, El-Kassar *et al.*³

Table 1. Clinical data and HUMARA results from ET and PV patients.

Disease	Age in years (mean)	CD3 ⁺ /CD3 ⁻	CD3 ⁺ /granulocytes	Thrombohemorrhagic complications	Treatment*
Essential Thrombocythemia (n=44)	32-91 (61.4)	6 homozygous 4 clonal 27 polyclonal 7 skewed	6 homozygous 11 clonal 20 polyclonal 7 skewed	11 patients (2 homozygous, 3 clonal, 4 polyclonal, 2 skewed)	21 patients
Polycythemia Vera (n=18)	30-86 (62.6)	1 homozygous 1 clonal 14 polyclonal 2 skewed	1 homozygous 7 clonal 8 polyclonal 2 skewed	4 patients (1 homozygous, 3 clonal)	7 patients
Controls (n=64)	30-91 (62)	8 homozygous 2 clonal 50 polyclonal 4 skewed	8 homozygous 3 clonal 49 polyclonal 4 skewed	0 patients	0 patients

*Patients were receiving myelosuppressive/platelet-lowering agents as follows: hydroxyurea ± acetylsalicylic acid (ASA) (n=19); anagrelide ± ASA (n=8) and busulfan (n=1). Twelve patients only received ASA. Phlebotomy was performed when packed red cell volume was higher than 0.42 L/L.

Table 2. Review of the literature concerning clonality in ET and PV studied by the HUMARA assay.

Study	Cases	Age in years	CD3 separation methods	Definition of clonality	Cut-off level of clonality	Homozygous	Treated	Clonal	Non informative	Clonal controls	Complications ¹
El-Kassar ¹	26 ET ²	29-81	No separation	Allele ratios ⁶	80%	10	10/16	3/16	9/16	5/23	NA
Champion ²	8 ET 30 PV 3 PM	60-88	Magnetic beads	Asimakopoulos equation ⁷	>50% (Rg <0.33 and Rt= 1.0) ⁷	0	NA	26/41	1/41	15/65	NA
El-Kassar ³	17 ET ³	13-70	Magnetic beads	Allele ratios ⁶	80%	0	11/17	9/17	4/17	4/44	5/9 clonal 2/4 polyclonal
El-Kassar ⁴	53 ET	13-80	Magnetic beads	Allele ratios ⁶	80%	4	18/30	31/49	5/49	NA	NC
Harrison ⁵	43 ET ⁴	11-89	Magnetic beads	Allele ratios ⁶	80%	0	NA	10/43	20/43	0/9	6/10 clonal ⁵ 2/13 polyclonal
Mitterbauer ⁶	23 ET 31 PV	27-88	NA	Allele ratios ⁶	75% (allele ratio >3:1)	3 ET 9 PV	NA	17/20 16/22	0/20 0/22	22/242 ⁶	NA
Chiusolo ⁷	40 ET	20-63	Magnetic beads	Allele ratios ⁶	75% (allele ratio >3:1)	0	34/40	17/40	8/40	NA	7/17 clonal ⁵ 1/15 polyclonal
Shih ⁸	73 IT	18-92	RBC rosetting	Asimakopoulos equation ⁷	>50%(Rg <0.33 and Rt= 1.0) ⁷	9	NA	42/64	10/64	12/43	NA
Shih ⁹	89 ET	15-92	RBC rosetting	Asimakopoulos equation ⁷	>50%(Rg <0.33 and Rt= 1.0) ⁷	10	NA	54/79	10/79	NA	24/54 clonal ⁵ 1/15 polyclonal
Present study	44 ET 18 PV	32-91 30-86	Magnetic beads	Allele ratios ⁶	75% (allele ratio >3:1)	6 ET 1 PV	21/44 9/18	11/38 7/17	7/38 1/17	3/64	3/11 clonal ET 4/20 polyclonal ET 3/7 clonal PV 0/8 polyclonal PV

¹Thrombotic or hemorrhagic; ²we excluded 16 patients because the HUMARA assay had been performed in DNA from unfractionated blood; ³we excluded 29 patients because polymorphisms (P55, IDS, G6PD) other than the HUMARA gene were used to study clonality in these patients; ⁴we excluded 3 patients because polymorphisms other than the HUMARA gene were used to study clonality in these patients; ⁵thrombotic complications were significantly higher in clonal ET (p<0.05); ⁶control subjects included healthy women, those with secondary neutrophilia and reactive thrombocytosis; ⁷percentage of clonal granulocytes (Gc) was calculated using the following equation,¹⁰ when Rt (T-cell ratio) > Rg (granulocyte ratio); Gc: Rt-Rg / Rt(Rg+1) × 100; when Rt < Rg Gc: Rg-Rt / Rg+1 × 100. This equation divides XCIP into 3 categories: 1) clonal, when Gc>50% (corresponds to a Rg <0.33 in the presence of an Rt: 1.0); 2) polyclonal, when Gc<50% and Rt>0.33; 3) ambiguous, when Gc<50% and Rt<0.33; ⁸Expression of the lower allele after correcting for the degree of lyonization in T-lymphocytes. ET: essential thrombocythemia; PV: polycythemia vera; PM: primary myelofibrosis; IT: idiopathic thrombocytosis; NA: not available; NC: not conclusive.

found no correlation between the incidence of ischemic or hemorrhagic episodes and XCIP. Our data do not show a significant relationship between clonality status and retrospectively analyzed thrombohemorrhagic events in ET (p=0.676). These discrepant results are probably due to differences in the size of the populations studied. Among PV patients, we found a statistical trend of more clinical complications in clonal than in polyclonal patients (p=0.075). This observation has not been reported before and should be confirmed in future larger series. In addition, for the

whole group (ET and PV patients), no relationship was found between clonal or polyclonal hematopoiesis and platelet lowering treatments. Further studies of clonality in ET and PV patients should be prospectively done in order to determine the pathophysiology of these diseases in detail and to ascertain the possible clinical implications of clonal or polyclonal hematopoiesis.

Lurdes Zamora,^{*C#} Blanca Espinet,^{**@} Lourdes Florensa,^{**@^} Carles Besses,^{^#} Beatriz Bellosillo,^{**} Francesc Solé^{**@}

*Laboratori de Citogenètica i Biologia Molecular, Servei de Patologia, Hospital del Mar, Barcelona; °Unitat d'Antropologia, Departament de Biologia Animal, Vegetal i Ecologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra; *Unitat de Recerca Translacional en Neoplasies Hematològiques (URNHE-PRBB); °Escola de Ciències Hematològiques S. Woessner-IMAS; *Laboratori de Ciències Hematològiques, Servei de Patologia; °Servei d'Hematologia Clínica, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

Key words: HUMARA, essential thrombocythemia, polycythemia vera, clonality.

Acknowledgments: the authors wish to express their gratitude to Dr. M. Albitar (University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston) for his valuable advice on the development of the HUMARA assay and to Mercè Musset, Rosa M. Vila, Carme Melero and Rosa Navarro for their valuable technical contribution to the study. Finally, Joan Vila (IMIM) helped in the statistical analysis.

Funding: this work was supported by grants PI030345 from the "Ministerio de Sanidad y Consumo", SAF-2001-4947 from the "Ministerio de Ciencia y Tecnología", and Red de Centros de Cáncer C03/07 from the "Instituto de Salud Carlos III", Spain.

Correspondence: Lurdes Zamora, Laboratori de Citogenètica i Biologia Molecular, Servei de Patologia, Hospital del Mar, Pg Marítim, 25-29, Barcelona 08003, Spain. Phone: international +34.93.248.30.35. Fax: international +34.93.2483131. E-mail: lurdes.zamora@wanadoo.es

References

1. El-Kassar N, Hetet G, Li Y, Briere J, Grandchamp B. Clonal analysis of haemopoietic cells in essential thrombocythaemia. *Br J Haematol* 1995;90:131-7.
2. Champion KM, Gilbert JG, Asimakopoulos FA, Hinshelwood S, Green AR. Clonal haemopoiesis in normal elderly women: implications for the myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1997;97:920-6.
3. El-Kassar N, Hetet G, Briere J, Grandchamp B. Clonality analysis of hematopoiesis in essential thrombocythemia: advantages of studying T lymphocytes and platelets. *Blood* 1997; 89: 128-34.
4. El-Kassar N, Hetet G, Briere J, Grandchamp B. Clonality analysis of hematopoiesis and thrombopoietin levels in patients with essential thrombocythemia. *Leuk Lymphoma* 1998; 30:181-8.
5. Harrison CN, Gale RE, Machin SJ, Linch DC. A large proportion of patients with a diagnosis of essential thrombocythemia do not have a clonal disorder and may be at lower risk of thrombotic complications. *Blood* 1999;93:417-24.
6. Mitterbauer G, Winkler K, Gisslinger H, Geissler K, Lechner K, Mannhalter C. Clonality analysis using X-chromosome inactivation at the human androgen receptor gene (HUMARA). Evaluation of large cohorts of patients with chronic myeloproliferative diseases, secondary neutrophilia, and reactive thrombocytosis. *Am J Clin Pathol* 1999;112:93-100.
7. Chiusolo P, La Barbera EO, Laurenti L, Piccirillo N, Sora F, Giordano G, et al. Clonal hemopoiesis and risk of thrombosis in young female patients with essential thrombocythemia. *Exp Hematol* 2001;29:670-6.
8. Shih LY, Lin TL, Dunn P, Wu JH, Tseng CP, Lai CL, et al. Clonality analysis using X-chromosome inactivation patterns by HUMARA-PCR assay in female controls and patients with idiopathic thrombocytosis in Taiwan. *Exp Hematol* 2001; 29: 202-8.
9. Shih LY, Lin TL, Lai CL, Dunn P, Wu JH, Wang PN, et al. Predictive values of X-chromosome inactivation patterns and clinicohematologic parameters for vascular complications in female patients with essential thrombocythemia. *Blood* 2002; 100:1596-601.
10. Asimakopoulos FA, Gilbert JG, Aldred MA, Pearson TC, Green AR. Interstitial deletion constitutes the major mechanism for loss of heterozygosity on chromosome 20q in polycythemia vera. *Blood* 1996;88:2690-8.

Chronic Myeloproliferative Disorders

Safety profile of hydroxyurea in the treatment of patients with Philadelphia-negative chronic myeloproliferative disorders

The efficacy of hydroxyurea (HU) in myeloproliferative disorders is well documented. HU controls thrombocytosis both in polycythemia vera (PV) and in essential thrombocythemia (ET), while reducing the risk of thrombosis.¹ Despite many anecdotal reports, no evaluation of the prevalence and type of side effects of HU exists in large series of patients.

haematologica 2005; 90:261-262

(<http://www.haematologica.org/journal/2005/2/261.html>)

This is a retrospective study of 75 patients with ET and 54 with PV (53 males, 76 females, mean age 58,12±14,68 years) diagnosed in agreement with the Polycythemia Vera Study Group criteria^{2,3} and treated with HU (median follow-up 7.18 years) at our Department over the last 20 years. HU (Oncocarbide®, 500 mg) was given to reduce platelet count (induction dosage 30 mg/kg/day and maintenance 15 mg/kg/day), for one or more of the following reasons: (i) age over 60 years; (ii) previous major thrombotic event; and (iii) platelet count over 1,500×10⁹/L.¹ The achievement of a platelet count <600×10⁹/L was considered a complete response (CR), while, if the platelet count remained >600×10⁹/L within 6 months of HU therapy, the drug treatment was considered to have failed. All side effects and toxic effects of HU were recorded; if a side effect did not require drug withdrawal it was considered a minor effect.

One hundred and twenty patients (93%) achieved a CR in a median time of 1 month (range 1-13 months). In 9 cases the drug treatment failed (7%). In 106 patients (88% of CR) HU was successfully continued without relevant complications over a median follow-up of 6.74 years to date (median 3.67 years). No hemorrhages but 15 thrombotic complications (4 cerebrovascular, 5 coronary, 1 peripheral arteries and 5 deep vein thrombosis in 2 cases with pulmonary embolism) were documented during HU therapy.

Minor effects. An increase of MCV (>98 fL) over normal levels occurred in 54 patients (45% of responders) within the first 6 months of therapy; this is a well known and usually negligible side effect of HU. However, 19 females and 13 males developed severe macrocytosis (MCV > 110 fL) within one year of treatment. One of these patients had black nail pigmentation which disappeared within three months after drug discontinuation; two more patients had black nail pigmentation, which was stable over time. This is an uncommon finding of not paramount importance.

Major effects. In 2 patients the drug was withdrawn because of symptomatic anemia (Hb less than 85 g/L) with MCV >130 fL occurred.⁴ In both cases, more than 20 mg/kg/day HU was given. Twelve patients came off the drug because of toxic effects certainly or probably due to HU (2 fevers, 2 allergies, 4 leg ulcers, 3 acute leukemias, 1 cancer) (Table 1). This rate of necessary HU discontinuation was 1.6×100 patients/year.

Fever occurred after 2 and 3.5 days of therapy in 2 patients. In both cases, we made another treatment attempt which again resulted in fever. Fever can be

4. DISCUSSIÓ

4.1. Citogenètica convencional i hibridació in situ en la policitèmia vera (article 1)

Per poder diagnosticar un pacient de PV, primer s'han d'excloure causes d'eritrocitosi secundària. Una manera de fer-ho és trobar algun marcador biològic. Per tant, en aquells pacients amb un hematòcrit augmentat i sense cap causa d'eritrocitosi secundària aparent, trobar alguna alteració citogenètica fa que el diagnòstic de PV sigui gairebé segur. Malauradament, la majoria de pacients afectes de PV són cromosòmicament normals per citogenètica convencional al moment del diagnòstic [85]. En la nostra experiència el 17.8% afectes de PV presentaven un cariotip alterat per citogenètica convencional al moment del diagnòstic.

L'objectiu d'aquest estudi va ser comprovar si amb l'aplicació de sondes de FISH obtenim un major nombre d'alteracions cromosòmiques que el que ens proporciona la citogenètica convencional en pacients afectes de PV al moment del diagnòstic i sense tractar. Donat que la FISH permet detectar anomalies cromosòmiques específiques sense que faci falta que la cèl·lula entri en divisió, juntament amb el fet que es basa en la detecció de senyals fluorescents i no en la interpretació de la morfologia cromosòmica, fa que es consideri una tècnica més sensible, específica i fàcil d'interpretar que la citogenètica convencional quant a la detecció d'alteracions específiques.

Les alteracions més freqüentment detectades amb les tècniques de citogenètica convencional en la PV són les trisomies 8 i 9 i les delecions a 13q i 20q [76-82]. Per aquesta raó es van aplicar sondes que cobrien aquestes regions (centròmer dels cromosomes 8 i 9 i les regions D13S319 i D20S108 que són uns dels loci involucrats en la mínima regió comú delecionada a 13q i 20q en les síndromes mieloproliferatives cròniques).

Al nostre estudi, la tècnica de FISH va demostrar alteracions cromosòmiques en tres dels 31 pacients afectes de PV no detectades per la citogenètica convencional.

Aquests resultats concorden amb un estudi recent fet per Najfeld i col. [126] on utilitzen les mateixes sondes de FISH. En tots dos estudis el percentatge de casos alterats és lleugerament superior quan s'utilitzen tècniques de FISH (de 17.8% a 19.3% en el nostre estudi i de 23% a 29% en el de Najfeld i col. [126]).

Pel contrari, el percentatge d'alteracions del nostre estudi és inferior al trobat en dos estudis previs realitzats per Amiel i col. [122] i Westwood i col. [124]. El motiu d'aquesta discrepància és que cap dels nostres pacients havia rebut tractament citoreductor, mentre que els dels altres dos estudis sí. En la sèrie d'Amiel i col. [122], 10 dels 14 pacients (71%) que presentaven trisomia 8 o 9 havien estat previament tractats amb hidroxiurea i/o ^{32}P i en la sèrie de Westwood i col. [124], 9 dels 15 pacients (60%) amb alguna alteració cromosòmica (trisomia 8 o 9 o deleció de D20S108) havien rebut algun tipus de tractament abans del moment de l'estudi. Aquests resultats podrien reflexar els efectes leucemogènics del tractament per sí, o també podrien indicar que els pacients amb una malaltia en progressió (i per tant que necessiten un tractament més agressiu) són més propensos a desenvolupar canvis citogenètics [85].

Les delecions del braç llarg del cromosoma 20 han estan molt descrites en patologies mieloides (síndromes mieloproliferatives cròniques, síndromes mielodisplàsiques i leucèmies agudes mieloides) [191, 192] però rarament es troben en patologies limfoides [193]. Aquesta associació suggereix que les delecions a 20q podrien indicar la possible localització d'un o més gens que es perdrien o inactivarien en un progenitor hemopoètic mioide. Tot i que no hi ha massa estudis realitzats en els quals s'estudiï el valor pronòstic de les delecions a 20q, no s'han trobat diferències entre la supervivència d'aquells pacients que presenten aquesta alteració i la dels que no la presenten [104, 162]. Un estudi fet per Aatola i col. en 18 pacients afectes de SMPC [103] tampoc va trobar correlació entre el percentatge de metafases portadores de delecions a 20q i la taxa de supervivència.

Per altra banda, les delecions a 13q són més comuns en la mielofibrosi idiopàtica que en altres síndromes mieloproliferatives cròniques. Fins el moment no hi ha cap estudi que tingui en compte el valor pronòstic d'aquestes delecions en la PV [137].

Seria interessant fer un seguiment dels pacients que presenten alteracions cromosòmiques per poder establir el seu valor pronòstic. També seria oportú fer nous estudis amb altres sondes per a poder incrementar el nombre de pacients amb alteracions cromosòmiques.

L'aplicació de la tècnica de FISH millora molt poc els resultats obtinguts per citogenètica convencional. Contràriament amb el que ha passat amb la implementació de la FISH en altres patologies com la LLC-B (on va permetre passar del 50 al 80% de casos alterats), el lleuger increment en el percentatge d'alteracions detectades (1.5% en el nostre estudi i 6% en l'estudi de Najfled i col. [126]) fa pensar que probablement altres tecnologies com els cultius de progenitors eritroides [60, 182], la detecció de clonalitat mitjançant l'estudi del gen HUMARA [35, 170, 171] o la sobreexpressió del gen PRV1 [132-134] són més útils que la FISH o la citogenètica convencional com a marcadors biològics en pacients afectes de PV.

4.2. Importància dels guanys de 9p en la patogènesi de la policitemia vera (article 2)

En la PV, s'han identificat trisomies completes del cromosoma 9, però també és freqüent trobar guanys de 9p, ja sigui en forma de trisomia o tetrasomia. La trisomia de 9p també s'ha associat a la trisomia parcial o total d'1q ja que fins el moment s'han descrit dotze casos de t(1;9) en pacients afectes de PV [68, 73, 74, 143-146).

Najfeld i col. és l'únic grup que ha estudiat les alteracions de 9p mitjançant la tècnica de FISH. En la seva sèrie van trobar guanys de 9p en el 53% dels pacients cromosòmicament alterats. Això representa que el guany de 9p era l'alteració genòmica més freqüent del seu estudi en pacients afectes de PV [126].

El nostre cas, juntament amb el de Blij-Philipsen i col. [194], suggereixen l'existència d'una nova alteració present en la PV que implica una trisomia parcial del cromosoma 9p formant part d'un derivatiu del cromosoma 2.

Aquests resultats i el fet que gairebé no es troben trisomies 9 per FISH o hibridació genòmica comparada en la trombocitèmia essencial, recolzen la hipòtesi de Chen i col. [146] que suggereixen que l'amplificació d'un o diversos gens de 9p, i no de 9q, tindrien un paper important en la patogènesi de la PV. S'han proposat alguns gens localitzats a 9p com a possibles candidats: l'alfa interferó [147], el receptor de la tirosina cinasa específic de proteïna endotelial (*TEK*) [148], el receptor de cadenes alfa de la interleucina 11 humana (*IL11RA*) [149, 150] i l'inhibidor-2A de cinasa dependent de ciclina (*CDKN2A* o *p16*) [151]. Les delecions o mutacions d'alguns d'aquests gens, com del gen *CDKN2A*, ja han estat descrites en una gran varietat de càncers.

Fan falta, però, més casos amb trisomia o tetrasomia 9 per poder determinar exactament el valor pronòstic d'aquesta alteració, i per seguir fent més estudis moleculars que identifiquin exactament quins gens estarien implicats en la patogènesi de la PV.

4.3. Incidència de trisomia 8 i 9, deleció dels loci D13S319 i D20S108 i presència de la translocació BCR/ABL en pacients afectes de trombocitèmia essencial no tractada: estudi de cèl·lules de la medul·la òssia per hibridació in situ fluorescent (article 3)

El diagnòstic de la TE depèn de l'exclusió de trombocitosis secundàries i d'altres síndromes mieloproliferatives cròniques que puguin anar acompanyades de trombocitosi. La detecció d'un cariotip alterat seria de gran ajuda per diferenciar les TE de trombocitosis secundàries ja que confereix un patró clonal a la malaltia. Malauradament, la majoria de pacients afectes de TE presenten un cariotip normal per citogenètica convencional, ja que només el 5% dels casos presenten una alteració cromosòmica al diagnòstic [86, 109]. En la nostra experiència cap dels 49 pacients afectes de TE que es van poder estudiar per citogenètica convencional van presentar un cariotip alterat.

En el nostre estudi ens vam plantejar reavaluar els cariotips obtinguts per citogenètica convencional amb l'ajuda de sondes de FISH, ja que ofereixen una major sensibilitat en la detecció d'alteracions cromosòmiques específiques.

Es van seleccionar sondes que detectessin la trisomia 8, la trisomia 9 i les delecions de 13q (D13S319) i 20q (D20S108), que són les alteracions que han estat més descrites per citogenètica convencional en la TE [75, 83, 85, 152]. Amb aquest estudi s'ha demostrat que el 15% de les TE al moment del diagnòstic presenten alguna alteració cromosòmica per FISH mentre que la citogenètica convencional no en detecta cap.

Fins el moment, només hi ha referits dos estudis on s'ha utilitzat la tècnica de FISH per analitzar els cromosomes 8 i 9 en la TE [102, 136]. Elis i col. [136], en una sèrie de 18 TE amb cariotips normals per citogenètica convencional, van descriure un 55% de trisomies 8 i 9 detectades per FISH. Aquests resultats no es van reproduir en l'estudi de Swolin i col. [102], en el qual, en una sèrie de 22 pacients, no es va trobar cap nova trisomia 8 o 9 per FISH que no s'hagués trobat ja per citogenètica convencional.

La raó més probable que explicaria aquestes diferències entre els resultats obtinguts per Elis i col. [136], Swolin i col. [102] i el nostre estudi, és que a la sèrie d'Elis i col. [136] el 72% dels malalts havien estat tractats amb hidroxiurea (7 dels 10 pacients que presentaven trisomia 8 o 9 encara rebien aquest tractament quan es va realitzar l'estudi). En la nostra sèrie i en la de Swolin i col. [102] l'estudi s'ha dut a terme al moment del diagnòstic en pacients que no havien estat prèviament tractats.

Com que se sap que el nombre d'alteracions citogenètiques es major en pacients tractats que en els no tractats [85], aquests resultats podrien reflexar l'efecte leucemogènic del tractament en si, però també podrien ser indicatius que aquells pacients que tenen la malaltia en progressió, i que per tant necessiten un tractament més agressiu, tenen més possibilitats de desenvolupar alteracions citogenètiques.

El fet que ni en el nostre estudi ni en l'estudi de Swolin i col. [102] es trobessin casos nous de trisomia 8 per FISH corrobora la hipòtesi que les cèl·lules amb trisomia 8 tenen una avantatge proliferativa sobre les cèl·lules amb disomia 8, com a mínim a nivell de cultiu, ja que la freqüència de trisomies 8 és major si s'estudien metafases (citogenètica convencional) que nuclis en interfase (FISH) [85, 123, 138, 139].

De totes les sèries referides a la literatura, no n'hi ha cap (a part de la nostra) on s'estudiïn les regions 13q14 i 20q12 per FISH en pacients afectes de TE. En el nostre estudi hem trobat dos pacients que presentaven una deleció hemizigòtica a 13q14 i cinc pacients que presentaven una deleció hemizigòtica a 20q12. Aquests resultats orientarien a no només fer servir sondes centromèriques pels cromosomes 8 i 9, sinó també pels loci 13q14 i 20q12.

Com ja hem comentat a la discussió de l'article 1, les delecions al braç llarg del cromosoma 20 han estat molt descrites en patologies mieloides (síndromes mieloproliferatives cròniques, síndromes mielodisplàsiques i leucèmies agudes mieloides) [191, 192] però rarament es troben en patologies limfoides [193]. Aquest fet suggeriria que a 20q es localitzarien un o més gens, la pèrdua o inactivació dels quals es produiria en un progenitor hemopoètic mioide. No s'han trobat diferències entre la supervivència dels pacients amb delecions a 20q i la dels que no en tenen. S'haurien de realitzar, però, més estudis ja que n'hi ha pocs on s'estudiï el valor pronòstic de les delecions a 20q [104, 162].

Això fa que les delecions de 20q tinguin un pronòstic relativament bo, sempre i quan es presenti com a única alteració [104, 162].

Respecte les delecions a 13q, aquestes són més freqüents en la mielofibrosi idiopàtica que en altres síndromes mieloproliferatives cròniques. Fins el moment no hi ha cap estudi on es contempli el valor pronòstic d'aquestes delecions en la TE [137].

Tot i que en alguns articles anteriors [110-112] es descriu que alguns pacients afectes de TE mostraven el reordenament BCR/ABL, en la nostra sèrie, a l'igual que en la majoria de sèries de TE [113, 114, 117], cap dels pacients presentava aquest reordenament ni per FISH ni per citogenètica convencional. És improbable que aquestes discrepàncies s'expliquin per diferències tècniques entre els estudis. La raó més factible que ho explicaria seria la inclusió de pacients que no compleixen els criteris diagnòstics de TE. Per tant, basant-nos en la nostra experiència prèvia [117] i l'actual, cap dels nostres pacients afectes de TE és positiu pel reordenament BCR/ABL.

Seria interessant fer un seguiment dels pacients que presenten alteracions cromosòmiques per poder establir el valor pronòstic d'aquestes alteracions. Així mateix, també seria oportú fer nous estudis amb altres sondes per si així es pogués incrementar el número de pacients amb alteracions cromosòmiques.

4.4. Estudi de clonalitat mitjançant el gen HUMARA en una població de dones afectes de trombocitèmia essencial i policitèmia vera (article 4)

El patró d'inactivació del cromosoma X (XCIP) és una eina per establir clonalitat sense la necessitat de tenir cap marcador citogenètic. És una tècnica que permet detectar l'existència d'una mielopoesi clonal en dones afectes de PV o TE. El gen HUMARA és molt útil perquè es pot estudiar per PCR i perquè la seva heterozigositat és del 83-90%. La nostra experiència mostra que l'heterozigositat del gen HUMARA en dones espanyoles és del 88%.

En alguns estudis previs on s'analitzava la clonalitat mitjançant altres polimorfismes com PGK o HPRT, es va demostrar que no tots els pacients amb TE tenien una granulopoesi clonal [168-170]. Més recentment, amb el gen HUMARA s'ha posat de manifest que existeix una variabilitat en el percentatge de clonalitat entre els pacients afectes de SMPC, indicant que la TE i la PV són unes malalties heterogènies.

- En la TE, el percentatge de pacients clonals referit a la literatura oscil·la entre el 18.7% i el 68% en funció de la sèrie [35, 171- 178]. En la nostra experiència, en 11 de 38 (28.9%) pacients afectes de TE es va demostrar clonalitat mitjançant l'estudi del gen HUMARA. Les discrepàncies en els percentatges de clonalitat en les diferents sèries poden ser degudes a que s'han utilitzat diferents metodologies d'anàlisi, al petit nombre de pacients analitzats en alguns estudis, i als diferents criteris emprats per establir un patró clonal (ratios d'al·lels o l'equació descrita per Asimakopoulos i col. [180]).
- En la PV, només hi ha dos estudis on determinen el patró de clonalitat. El primer és de Champion i col. [35] i 26 dels 41 pacients (3 MI, 8 TE i 30 PV) són clonals, però el percentatge de clonalitat només per les PV no està especificat. Al segon estudi realitzat per Mitterbauer i col. analitzen 31 pacients afectes de PV i demostren que 16 de 22 (73%) tenen un patró d'inactivació del cromosoma X clonal [175]. Nosaltres vam demostrar que 7 de 17 pacients afectes de PV (41.2%) eren clonals.

- En la nostra sèrie vam trobar que tres dels 64 controls (4.6%) eren clonals. Aquest fet també ha estat descrit per altres autors [35, 175, 177]. Champion i col. va demostrar que aquest fenomen és més freqüent en dones d'edat avançada [35]. S'han proposat diferents teories per explicar el fet de trobar individus sans clonals: 1) que sigui constitutiu, 2) que s'adquireix amb l'edat, 3) que hi hagi algun factor genètic que exerceixi una pressió selectiva sobre la inactivació d'una de les dues X amb preferència, o 4) que hi hagi una població de cèl·lules patològiques d'una malaltia en estadi molt inicial i per tant que encara no hagi donat clínica per ser detectada [35, 181]. Per tant, en dones d'edat avançada (>65 anys), cal ser molt prudent a l'hora d'interpretar un desequilibri al·lèlic en els granulòcits i no en els limfòcits com un patró de clonalitat, ja que es podria tractar d'un fals positiu. Per altra banda, sí que ens serà útil trobar un patró de policlonalitat en dones grans quan no sigui clar si la proliferació cel·lular que tenen és reactiva o clonal [35, 175, 177].

El motiu del perquè, a més dels granulòcits, vam estudiar els limfòcits B (CD3-) com a cèl·lula patològica és perquè fins ara en els altres estudis de SMPC només havien utilitzat granulòcits i plaquetes com a cèl·lules problema. Les plaquetes tenen una limitació molt gran ja que l'estudi s'ha de fer en ARN (no tenen nucli per tant, no hi ha ADN), i els polimorfismes que han estat descrits en l'ARN no tenen tanta heterozigositat com el gen HUMARA (per exemple: IDS 51%, P55 37%, PGK 33%, HPRT 29%, G6PD 17%) [132]. L'elecció dels limfòcits B per analitzar clonalitat en la TE i la PV es va basar en estudis que amb l'ajut de l'isoenzim G6PD, com a marcador de clonalitat, demostraven que els granulòcits, monòcits, eritròcits i limfòcits B comparteixen un precursor hematopoètic [195, 196].

En la nostra experiència, la utilització de limfòcits CD3- no va detectar clonalitat en 13 pacients que si que mostraven un patró clonal quan s'estudiaven els granulòcits. Això comportava la pèrdua d'un nombre significatiu de pacients amb mielopoesi clonal ($p < 0.001$). Davant d'aquests resultats, la millor combinació per aconseguir el màxim percentatge de clonalitat amb l'estudi del gen HUMARA, s'obté utilitzant els limfòcits CD3+ com a cèl·lula control i els granulòcits com a cèl·lula patològica.

Tot i que a la nostra sèrie no s'ha trobat cap correlació entre l'edat dels pacients i el XCIP, al considerar la PV i la TE juntes trobem una tendència estadística ($p=0.180$) de més casos clonals en dones d'edat avançada (>65 anys) i policlonals en dones joves. Aquests resultats van ser significatius en els estudis de El-Kassar i col. [173] i Shih i col. [178] i podrien indicar que la fisiopatologia de la malaltia seria diferent en les dones joves que en les grans. El menor nombre de pacients de la nostra sèrie podria explicar el perquè els nostres pacients no es comporten d'igual manera que el de les dues sèries anteriorment mencionades.

Respecte a la relació entre clonalitat i complicacions trombohemorràgiques, Harrison i col. [174], Chiusolo i col. [176] i Shih i col. [178] van observar que el fenomen de trombosi, en els pacients afectes de TE, es donava de manera més freqüent quan mostraven un patró de XCIP clonal que policlonal. Pel contrari, El-Kassar i col. [172] no van trobar correlació entre clonalitat i la incidència d'episodis d'isquèmia o hemorràgia. Els nostres resultats tampoc mostren relació entre clonalitat i complicacions trombohemorràgiques en la TE. Aquesta discrepància de resultats probablement és deguda al diferent nombre de pacients inclosos en cada sèrie.

En els pacients afectes de PV, els nostres resultats mostren per primer cop a la literatura, una tendència estadística al fet de trobar més complicacions clíniques en aquells pacients amb un XCIP clonal que policlonal ($p=0.075$). Aquesta troballa s'hauria de confirmar en series més grans.

Tampoc vam trobar cap relació entre una hemopoesi clonal o policlonal i la classe de tractament citoreductor rebut.

S'haurien de realitzar nous estudis prospectius en pacients afectes de TE i PV per determinar en més detall la fisiopatologia d'aquestes malalties i per aclarir les implicacions clíniques de trobar una hematopoesi clonal.

5. CONCLUSIONS

La policitèmia vera i la trombocitèmia essencial són neoplàsies hematològiques que, en determinades situacions, poden ser difícils de diferenciar de poliglobúlies i trombocitosis reactives. La caracterització biològica d'aquestes dues entitats citogenèticament i molecular ha mostrat les següents peculiaritats:

1. Policitèmia Vera

• Citogenètica convencional:

- La citogenètica convencional és capaç de detectar alteracions cromosòmiques en un número baix de pacients (17.8%) en el moment del diagnòstic i sense tractament previ.
- La troballa d'un pacient afecte de PV amb trisomia parcial de 9p recolza la hipòtesi de que trisomies o tetrasomies de 9p podrien estar implicades en la patogènesi de la PV.

• Hibridació in situ fluorescent:

- El percentatge d'alteracions detectades per FISH en el nostre estudi (19.3%) és molt similar al d'aquelles sèries que estudien PV no tractades al moment del diagnòstic.
- L'aplicació de la tècnica de FISH no ha incrementat la detecció d'alteracions cromosòmiques. Per tant, no és la tècnica més apropiada per posar de manifest un patró de clonalitat en pacients afectes de PV.

• Estudi de clonalitat mitjançant el polimorfisme del gen HUMARA:

- L'anàlisi del patró d'inactivació del cromosoma X mitjançant el gen HUMARA ha estat la millor tècnica, de les emprades en aquest treball, per detectar clonalitat en la PV (41.2% vs 19.3% FISH vs 17.8% citogenètica convencional).
- És recomanable realitzar l'estudi de clonalitat en limfòcits CD3+ com cèl·lula control i granulòcits com cèl·lula patològica i no en limfòcits CD3- perquè la utilització d'aquesta última població cel·lular augmenta el número de falsos negatius.

- La detecció de clonalitat en pacients majors de 65 anys s'ha d'interpretar amb precaució. Tant en el nostre treball (4.6%) com en la literatura s'han detectat casos control clonals (falsos positius) en aquesta franja d'edat.
- Les pacients afectes de PV que mostren un patró d'inactivació del cromosoma X clonal tenen una major tendència estadística de presentar complicacions trombohemorràgiques.

2. Trombocitèmia essencial

• Citogenètica convencional:

- La citogenètica convencional no ha permès detectar cap alteració cromosòmica en els nostres pacients. Per tant, aquesta tècnica no ens permet distingir els casos reactius dels clonals.

• Hibridació in situ fluorescent:

- En la TE, la FISH permet detectar un 15% d'alteracions cromosòmiques que no han estat detectades per citogenètica convencional al moment del diagnòstic. Aquest percentatge de detecció continua essent molt baix, fet que desaconsella l'ús d'aquesta tècnica en el diagnòstic de la TE.
- En el nostre treball cap pacient amb TE presentava la t(9;22)(q34.1;q11.2) per citogenètica convencional ni el reordenament BCR/ABL per FISH, tal i com posen de manifest la majoria de sèries de TE.

• Estudi de clonalitat mitjançant el polimorfisme del gen HUMARA:

- Tal i com s'ha vist en la PV, l'anàlisi del patró d'inactivació del cromosoma X mitjançant el gen HUMARA ha estat la millor tècnica, de les emprades en aquest treball, per detectar clonalitat en la TE (28.9% vs 15% FISH vs 0% citogenètica convencional).
- És recomanable realitzar l'estudi de clonalitat en limfòcits CD3+ com cèl·lula control i granulòcits com cèl·lula patològica i no en limfòcits CD3- perquè la utilització d'aquesta última població cel·lular augmenta el número de falsos negatius.
- La detecció de clonalitat en pacients majors de 65 anys s'ha d'interpretar amb precaució. Tant en el nostre treball (4.6%) com en la literatura s'han detectat casos control clonals (falsos positius) en aquesta franja d'edat.

- En la TE, no trobem significació estadística entre fenomens de trombosi i un determinat patró d'inactivació del cromosoma X.

- Analitzant conjuntament els pacients amb TE i els pacients afectes de PV:
 - s'han registrat més casos clonals en dones grans que en joves, amb una tendència estadística.
 - no s'ha trobat cap relació entre una hematopoesi clonal o policlonal i el tipus de tractament citoreductor rebut.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, McGlave P. Hematology Basic Principles & Practice (4th edition). Elsevier Churchill, Pensilvania, USA, 2005.
2. Sachs L. The molecular control of blood cell development. *Science* 1987;238:1374-1379.
3. Hogge DE, Sutherland HJ, Cashman J, Lansdorp PM, Humphries RK, Eaves CJ. Cytokines acting early in human haematopoiesis. *Baillière's Clin Haematol* 1994;1:49-63.
4. Han ZC, Caen JP. Cytokines acting on committed haematopoietic progenitors. *Baillière's Clin Haematol* 1994;1:65-89.
5. Metcalf D. Thrombopoietin at last. *Nature* 1994;369:519-552.
6. Eaves AC, Eaves CJ. Erythropoiesis in culture. *Cell culture techniques. Clin Haematol* 1984;13:371-391.
7. Pike BL, Robinson WA. Human bone marrow colony growth in agar. *Cell Physiol* 1970;76:77-84.
8. Denburg JA, Messner H, Lim B, Jamal N, Telizyn S, Bienenstrak. Clonal origin of human basophil/mast cell from circulating multipotent hemopoietic progenitors. *Exp Haematol* 1985;13:185-188.
9. Hoffman R. Regulation of megakaryocytopoiesis. *Blood* 1989;74:1196-1212.
10. Briddell RA, Brandt JE, Straneva JE, Hoffman R. Characterization of the human burst forming unit megakaryocyte. *Blood* 1989;74:145-151.
11. Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 1993;81:2844-2853.
12. Ploemacher R. Characterization and biology of normal human haematopoietic stem cells. *Haematologica* 1999;84:4-7.
13. Bain BJ. The bone marrow aspirate of healthy subjects. *Br J Haematol* 1996;94:206-209.
14. Pearson TC. Diagnosis and classification of erythrocytoses and thrombocytoses. *Baillière's Clin Haematol* 1998;11:695-720.
15. Berlin NI. Diagnosis and classification of the polycythemia. *Semin Hematol* 1975;12:339-351.
16. Pearson TC, Messinezy M. The diagnostic criteria of polycythemia rubra vera. *Leuk Lymphoma* 1996;22:87-93.

17. World Health Organization. Tumours of the Hemopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press, Lyon, France, 2001.
18. Briere J, El-Kassar N. Clonality markers in polycythaemia and primary thrombocythaemia. *Baillière's Clin Haematol* 1998;11:787-801.
19. Silva M, Richard C, Benito A, Sanz C, Olalla I, Fernández-Luna JK. Expression of Bcl-x_L in erythroid precursors from patients with polycythemia vera. *N Engl J Med* 1998;338:564-571.
20. Moliterno AR, Hankins WD, Spirak JL. Impaired expression of the thrombopoietin receptor by platelets from patients with polycythemia vera. *N Engl J Med* 1998;338:572-580.
21. Bilgrami S, Greenberg BR. Polycythemia Rubra Vera. *Semin Oncol* 1995;22:307-326.
22. Barbui T, Finazzi G. Risk factors and prevention of vascular complications in polycythemia vera. *Semin Thromb Hemost* 1997;23:455-461.
23. Schafer AI. Bleeding and thrombosis in myeloproliferative disorders. *Blood* 1994;64:1-9.
24. Ferrant A. What clinical and laboratory data are indicative of polycythemia and when are blood volume studies needed? *Nouv Rev Fr Hematol* 1994;36:151-154.
25. Woessner S, Florensa L. La citología óptica en el diagnóstico hematológico. Acción Médica, Madrid, España, 2000.
26. Florensa L, Besses C, Almarcha J, Lafuente R, Palou L, Pedro C, Sans-Sabrafen J, Woessner S. Circulating erythroid and megakaryocytic progenitors in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *Eur J Haematol* 1989;43:417-422.
27. Kralovics R, Prchal JT. Haematopoietic progenitors and signal transduction in polycythaemia vera and primary thrombocythaemia. *Baillière's Clin Haematol* 1998;11:803-817.
28. Najean Y, Rain JD. The very long-term evolution of polycythemia vera: an analysis of 318 patients initially treated by phlebotomy or ³²P between 1969 and 1981. *Semin Hematol* 1997;34:6-16.
29. Murphy S. Polycythemia Vera. *Disease-a-Month* 1992;38:157-212.

30. Najean Y, Mugnier P, Dresch C, Rain JD. Polycythaemia vera in young people: an analysis of 58 cases diagnosed before 40 years. *Br J Haematol* 1987;67:285-291.
31. Murphy S, Iland H, Rosenthal D, Laszlo J. Essential thrombocythemia: an interim report from the Polycythemia Vera Study Group. *Semin Hematol* 1986;23:177-182.
32. Murphy S, Peterson P, Iland H, Laszlo J. Experience of the Polycythemia Vera Study Group with essential thrombocythemia: a final report on diagnostic criteria, survival, and leukemic transition by treatment. *Semin Hematol* 1997;34:29-39.
33. Gunz FW. Hemorrhagic thrombocythemia: a critical review. *Blood* 1960;15:706-723.
34. Ozer FL, Truass WE, Miesch DC, Levin WC. Primary hemorrhagic thrombocythemia. *Am J Med* 1960;28:807-823.
35. Champion KM, Gilbert JGR, Asimakopoulos FA, Hinshelwood S, Green AR. Clonal haemopoiesis in normal elderly women: implications for the myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1997;97:920-926.
36. Fielder PJ, Hass P, Nagel M, Stefanich E, Widmer R, Bennett GL, Keller GA, de Sauvage FJ, Eaton D. Human platelets as a model for the binding and degradation of thrombopoietin. *Blood* 1997;89:2782-2788.
37. Ichikawa N, Ishida F, Shimodaira S, Tahara T, Kato T, Kitano K. Regulation of serum thrombopoietin levels by platelets and megakaryocytes in patients with aplastic anaemia and idiopathic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost* 1996;76:156-160.
38. Tahara T, Usuki K, Sato H, Ohashi H, Morita H, Tsumura H, Matsumoto A, Miyazaki H, Urabe A, Kato T. A sensitive sandwich ELISA for measuring thrombopoietin in human serum: serum thrombopoietin levels in healthy volunteers and in patients with haemopoietic disorders. *Br J Haematol* 1996;93:783-788.
39. Yoon SY, Li CY, Tefferi A. Megakaryocyte c-Mpl expression in chronic myeloproliferative disorders and the myelodysplastic syndrome: immunoperoxidase staining patterns and clinical correlates. *Eur J Haematol* 2000;65:170-174.

40. Harrison CN, Gale RE, Pezella F, Mire-Sluis A, MacHin SJ, Linch DC. Platelet c-mpl expression is dysregulated in patients with essential thrombocythaemia but this is not of diagnostic value. *Br J Haematol* 1999;107:139-147.
41. Horikawa Y, Matsumura I, Hashimoto K, Shiraga M, Kosugi S, Tadokoro S, Kato T, Miyazaki H, Tomiyama Y, Kurata Y, Matsuzawa Y, Kanakura Y. Markedly reduced expression of platelet c-mpl receptor in essential thrombocythemia. *Blood* 1997;90:4031-4038.
42. Sakamaki S, Hirayama Y, Matsunaga T, Kuroda H, Kusakabe T, Akiyama T, Konuma Y, Sasaki K, Tsuji N, Okamoto T, Kobune M, Kogawa K, Kato J, Takimoto R, Koyama R, Niitsu Y. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) induces thrombopoietin from bone marrow stromal cells, which stimulates the expression of TGF-beta receptor on megakaryocytes and, in turn, renders them susceptible to suppression by TGF-beta itself with high specificity. *Blood* 1999;94:1961-1970.
43. Axelrad AA, Eskinazi D, Correa PN, Amato D. Hypersensitivity of circulating progenitor cells to megakaryocyte growth and development factor (PEG-rHu MGDF) in essential thrombocythemia. *Blood* 2000;96:3310-3321.
44. Cerutti A, Custodi P, Duranti M, Noris P, Balduini CL. Thrombopoietin levels in patients with primary and reactive thrombocytosis. *Br J Haematol* 1997;99:281-284.
45. Wang JC, Chen C, Novetsky AD, Lichter SM, Ahmed F, Friedberg NM. Blood thrombopoietin levels in clonal thrombocytosis and reactive thrombocytosis. *Am J Med* 1998;104:451-455.
46. Cazzola M, Skoda RC. Translational pathophysiology: a novel molecular mechanism of human disease. *Blood* 2000;110:441-448.
47. Ballmaier M, Germeshausen M, Schulze H, Welte K, Flohr T, Beiske K, Storm-Mathisen I, Abrahamsen TG. C-mpl mutations are the cause of congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Blood* 2001;97:139-146.
48. Allen AJ, Gale RE, Harrison CN, Machin SJ, Linch DC. Lack of pathogenic mutations in the 5'-untranslated region of the thrombopoietin gene in patients with non-familial essential thrombocythaemia. *Eur J Haematol* 2001;67:232-237.

49. Mesa RA, Hanson CA, Li CY, Yoon SY, Rajkumar SV, Schroeder G, Tefferi A. Diagnostic and prognostic value of bone marrow angiogenesis and megakaryocyte c-Mpl expression in essential thrombocythemia. *Blood* 2002;99:4131-4137.
50. Gugliotta L, Marchioli R, Fiacchini M, Vianelli N, Baravelli S, Valdre L. Epidemiological, diagnostic, therapeutic and prognostic aspects of essential thrombocythemia in a retrospective study of the GIMMC group in two thousand patients. *Blood* 1997;90:348.
51. Besses C, Cervantes F, Pereira A, Florensa L, Solé F, Hernández-Boluda JC, Woessner S, Sans-Sabrafen J, Rozman C, Montserrat E. Major vascular complications in essential thrombocythemia: a study of the predictive factors in a series of 148 patients. *Leukemia* 1999;13:150-154.
52. Michiels JJ, Ten Kate FJW, Erythromelalgia in thrombocythemia of various myeloproliferative disorders. *Am J Hematol* 1992;39:131-136.
53. Griesshammer M, Heimpel H, Pearson TC. Essential thrombocythemia and pregnancy. *Leuk Lymphoma* 1996;22:57-63.
54. Shafer AI. Bleeding and thrombosis in myeloproliferative disorders. *Blood* 1994;64:1-9;
55. Landolfi R, Rocca B, Patrono C. Bleeding and thrombosis in myeloproliferative disorders: mechanisms and treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995;20:203-222.
56. Van Genderen PJJ, Michiels JJ. Erythromelalgic, thrombotic and haemorrhagic manifestations of thrombocythaemia. *Presse Med* 1994;23:73-77.
57. Jabally J, Iland HJ, Laszlo J, Massey EW, Faguet GB, Briere J, Landaw SA, Pisciotta AV. Neurologic manifestations of essential thrombocythemia. *Ann Intern Med* 1983;99:513-518.
58. Michiels JJ, Koudstaal PJ, Mulder AH, Van Vilet HHDM. Transient neurologic and ocular manifestations in primary thrombocythemia. *Neurology* 1993;43:1107-1110.
59. Iland HJ, Laszlo J, Peterson P, Murphy S, Brière J, Weinfeld A, Rosenthal DS, Landaw SA, Ellis JT, Silverstein MN. Essential thrombocythemia: clinical and laboratory characteristics at presentation. *Trans Assoc Am Physicians* 1983;96:165-174.

60. Florensa L, Besses C, Woessner S, Solé F, Acín P, Pedro C, Sans-Sabrafen J. Endogenous megakaryocyte and erythroid colony formation from blood in essential thrombocythaemia. *Leukemia* 1995;9:271-273.
61. Juvonen E, Ikkala E, Oksanen K, Ruutu T. Megakaryocyte and erythroid colony formation in essential thrombocythaemia and reactive thrombocytosis: diagnostic value and correlation to complications. *Br J Haematol* 1993;83:192-197.
62. Sedlacek SM, Curtis JL, Weintraub J, Levin J. Essential thrombocythemia and leukemic transformation. *Medicine* 1986;65:353-364.
63. Shibata K, Shimamoto Y, Suga K, Sano M, Matsuzaki M, Yamaguchi M. Essential thrombocythemia terminating in acute leukemia with minimal myeloid differentiation--a brief review of recent literature. *Acta Haematol* 1994;91:84-88.
64. Sterkers Y, Preudhomme C, Lai JL, Demory JL, Caulier MT, Wattel E, Bordessoule D, Bauters F, Fenaux P. Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes following essential thrombocythemia treated with hydroxyurea: high proportion of cases with 17p deletion. *Blood* 1998;91:616-622.
65. Mesa RA, Silverstein MN, Jacobsen SJ, Wollan PC, Tefferi A. Population-based incidence and survival figures in essential thrombocythemia and agnogenic myeloid metaplasia: an Olmsted County Study, 1976-1995. *Am J Hematol* 1999;61:10-15.
66. Gugliotta L, Marchioli R, Fiacchini M, Vianelli N, Baravelli S, Valdre L, de Vivo A, Marfisi R, Radaelli F, Gargantini L, Ambrosetto A, Mazzucconi MG, Russo D, Bazzan M, Zaccaria A, Finazzi G, Grossi A, Ruggeri M, Pogliani E, Sacchi S, Martinelli V, Barbui T, Lazzarino M. Epidemiological, diagnostic, therapeutic and prognostic aspects of essential thrombocythemia in a retrospective study of the GIMMC group in two thousand patients. *Blood* 1997;90:348.
67. Wurster-Hill D, Whang-Peng J, McIntyre OR, Hsu LY, Hirschhorn K, Modan B, Pisciotta AV, Pierre R, Balcerzak SP, Murphy S, Weinfeld A. Cytogenetic studies in polycythemia vera. *Semin Hematol* 1976;13:13-32.

68. Lawler SD. Cytogenetic studies in Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative disorders, particularly polycythaemia rubra vera. *Clin Haematol* 1980;9:159-174.
69. Kay HE, Lawler SD, Millard RE. The chromosomes in polycythaemia vera. *Br J Haematol* 1966;12:507-528.
70. Swolin B, Weinfeld A, Westin J. A prospective long-term cytogenetic study in polycythemia vera in relation to treatment and clinical course. *Blood* 1988;72:386-395.
71. Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique. Cytogenetics of acutely transformed chronic myeloproliferative syndromes without a Philadelphia chromosome. A multicenter study of 55 patients. *Cancer Genet Cytogenet* 1988;32:157-168.
72. Berger R, Bernheim A, Le Coniat M, Vecchione D, Flandrin G, Dresch C, Najean Y. Chromosome studies in polycythemia vera patients. *Cancer Genet Cytogenet* 1984;12:217-223.
73. Rege-Cambrin G, Mecucci C, Tricot G, Michaux JL, Louwagie A, Van Hove W, Francart H, Van den Berghe H. A chromosomal profile of polycythemia vera. *Cancer Genet Cytogenet* 1987;25:233-245.
74. Westin J, Wahlstrom J, Swolin B. Chromosome studies in untreated polycythaemia vera. *Scand J Haematol* 1976;17:183-196.
75. Diez-Martin JL, Graham DL, Pettit RM, Dewald GW. Chromosome studies in 104 patients with polycythemia vera. *Mayo Clin Proc* 1991;66:287-299.
76. Dewald GW, Wright PI. Chromosome abnormalities in the myeloproliferative disorders. *Semin Oncol* 1995;22:341-354.
77. Lawler SD, Millard RE, Kay HEM, Cameron CB. Further cytogenetical investigations in polycythemia vera. *Eur J Cancer* 1970;6:223-233.
78. Koulischer L, Frühling J, Henry J. Observations cytogénétiques dans la maladie de Vazquez. *Eur J Cancer* 1967;3:193-201.
79. Nagy G, Yurgutis RP. Chromosome studies on patients with polycythemia vera. *Haematologica* 1968;2:179-186.
80. Barnes CA, Holmes HL, Ilbery PLT. Chromosome aberrations following radiophosphorus treatment of polycythemia. *Aust Radiol* 1969;13:396-417.
81. Rowley JD. Acquired trisomy 9. *Lancet* 1973;II:390.

82. Visfeldt J, Franzén S, Nielsen A, Tribukait B. Primary polycythemia. Studies of the significance of the history of the disease and of the treatment for the development of clones in bone marrow cells. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1973;81:195-203
83. Mertens F, Johansson B, Heim S, Kristoffersson U, Mitelman F. Karyotypic patterns in chronic myeloproliferative disorders: report on 74 cases and review of the literature. *Leukemia* 1991;5:214-220.
84. Tanzer J. Clonality and karyotype studies in polycythemia vera. *Rev Fr Hematol* 1994;36:167-172.
85. Bench AJ, Nacheva EP, Champion KM, Green AR. Molecular genetics and cytogenetics of myeloproliferative disorders. *Ballière's Clin Haematol* 1998;11:819-847.
86. Sessarego M, Defferrari R, Dejana AM, Rebutato AM, Fugazza G, Salvidio E, Ajmar F. Cytogenetic analysis in essential thrombocythemia at diagnosis and at transformation: a 12-year study. *Cancer Genet Cytogenet* 1989;43:57-65.
87. Knuutila S, Ruutu T, Partanen S, Vuopio P. Chromosome 1q+ in erythroid and granulocyte-monocyte precursors in a patient with essential thrombocythemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1983;9:245-249.
88. Lofvenberg E, Nordenson I, Wahlin A. Cytogenetic abnormalities and leukemic transformation in hydroxyurea-treated patients with Philadelphia chromosome negative chronic myeloproliferative disease. *Cancer Genet Cytogenet* 1990;49:57-67.
89. Richard C, Conde E, Garijo J, Iriondo A, Bello C, Zubizarreta A. Trisomy 1q in a case of essential thrombocythemia with long survival. *Cancer Genet Cytogenet* 1987;25:185-186.
90. Horsman DE, Kalousek DK. Acquired Robertsonian translocations in hematologic malignancy. A rare mechanism of clonal evolution. *Cancer Genet Cytogenet* 1990;45:193-196.
91. Willem P, Pinto M, Bernstein R. Translocation t(1;7) revisited. Report of three further cases and review. *Cancer Genet Cytogenet* 1988;36:45-54.
92. Sandberg AA, Morgan R, Hecht BK, Hecht F. Translocation (1;7)(p11;p11): a new myeloproliferative hematologic entity. *Cancer Genet Cytogenet* 1985;18:199-206.

93. Charrin C, Belhabri A, Treille-Ritouet D, Theuil G, Magaud JP, Fiere D, Thomas X. Structural rearrangements of chromosome 3 in 57 patients with acute myeloid leukemia: clinical, hematological and cytogenetic features. *Hematol J* 2002;3:21-31.
94. Killick S, Matutes E, Swansbury J, Catovsky D. Case 17: Essential thrombocythaemia with inversion 3 terminating in acute leukaemia. *Leuk Lymphoma* 1998;30:661-664.
95. Hollings PE. Molecular heterogeneity at the breakpoints of smaller 20q deletions. *Genes Chromosomes Cancer* 1994;11:21-28.
96. Johansson B, Billstrom R, Broberg K, Fioretos T, Nilsson PG, Ahlgren T, Malm C, Samuelsson BO, Mitelman F. Cytogenetic polyclonality in hematologic malignancies. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;24:222-229.
97. Cournoyer D, Noel P, Schmidt MA, Dewald GW. Trisomy 9 in hematologic disorders: possible association with primary thrombocytosis. *Cancer Genet Cytogenet* 1987;27:73-78.
98. Hirose Y, Masaki Y, Sugai S. Leukemic transformation with trisomy 8 in essential thrombocythemia: a report of four cases. *Eur J Haematol* 2002;68:112-116.
99. Uozumi K, Ohno N, Shimotakahara S, Suzuki S, Takeuchi S, Hanada S, Arima T. Trisomy 8 in essential thrombocythemia in leukemic transformation. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;116:84-86.
100. Kurtin PJ, Dewald GW, Shields DJ, Hanson CA. Hematologic disorders associated with deletions of chromosome 20q: a clinicopathologic study of 107 patients. *Am J Clin Pathol* 1996;106:680-688.
101. Hirst WJ, Czepulkowski B, Mufti GJ. Consistent interstitial chromosomal deletions in myeloid malignancies and their correlation with fragile sites. *Cancer Genet Cytogenet* 1993;65:51-57.
102. Swolin B, Safai-Kutti S, Anghem E, Kutti J. No increased frequency of trisomies 8 and 9 by fluorescence in situ hybridization in untreated patients with essential thrombocythemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;126:56-59.
103. Aatola M, Armstrong E, Teerenhovi L, Borgstrom GH. Clinical significance of the del(20q) chromosome in hematologic disorders. *Cancer Genet Cytogenet* 1992;62:75-80.

104. Campbell LJ, Garson OM. The prognostic significance of deletion of the long arm of chromosome 20 in myeloid disorders. *Leukemia* 1994;8:67-71.
105. Palka G, Spadano A, Calabrese G, Parruti G, Guanciali Franchi P, Di Sante O, Recchia A, Di Lorenzo R, Torlontano G. Cytogenetic survey of sixty-one patients with preleukemic syndrome including myeloproliferative and myelodysplastic diseases. *Ann Genet* 1990;33:214-218.
106. Nacheva E, Holloway T, Carter N, Grace C, White N, Green AR. Characterization of 20q deletions in patients with myeloproliferative disorders or myelodysplastic syndromes. *Cancer Genet Cytogenet* 1995;80:87-94.
107. Wilkens L, Tchinda J, Burkhardt D, Nolte M, Werner M, Georgii A. Analysis of hematologic diseases using conventional karyotyping, fluorescence in situ hybridization (FISH), and comparative genomic hybridization (CGH). *Hum Pathol* 1998;29:833-839.
108. Huret JL, Schoenwald M, Gabarre J, Vaugier GL, Tanzer J. Two additional cases of isochromosome 21q or translocation 21q21q in hematological malignancies. *Acta Haematol* 1991;86:111-114.
109. Third International Workshop on Chromosomes in Leukemia. Report on essential thrombocythemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1981;4:138-142.
110. Morris CM, Fitzgerald PH, Hollings PE, Archer SA, Rosman I, Beard ME, Heaton DC, Newhook CJ. Essential thrombocythaemia and the Philadelphia chromosome. *Br J Haematol* 1988;70:13-19.
111. Corradini P, Palumbo AP, Battaglio S, Ponzio G, Boccadoro M, Pileri A. Analysis of the breakpoint cluster region in essential thrombocythemia. *Haematologica* 1990;75:573-575.
112. Blickstein D, Aviram A, Luboshitz J, Prokocimer M, Stark P, Bairey O, Sulkes J, Shaklai M. BCR-ABL transcripts in bone marrow aspirates of Philadelphia-negative essential thrombocythemia patients: clinical presentation. *Blood* 1997;90:2768-2771.
113. Marasca R, Luppi M, Zucchini P, Longo G, Torelli G, Emilia G. Might essential thrombocythemia carry Ph anomaly? *Blood* 1998;91:3084-3085.
114. Hackwell S, Ross F, Cullis JO. Patients with essential thrombocythemia do not express BCR-ABL transcripts. *Blood* 1999;93:2420-2421.

115. Damaj G, Delabesse E, Bihan CL, Asnafi V, Rachid M, Lefrere F, Radford-Weiss I, Macintyre E, Hermine O, Varet B. Typical essential thrombocythaemia does not express bcr-abl fusion transcript. *Br J Haematol* 2002;116:812-816.
116. Owen RG, Dickinson H, Evans PAS, O'Connor SJM, Swirsky DM, Jack AS. What is the role of cytogenetic and molecular genetic analysis in the diagnosis of chronic myeloproliferative disorders? *Br J Haematol* 2003;120:717-718.
117. Solé F, Florensa L, Espinet B, Besses C, Lloveras E, Woessner S. Absence of bcr/abl rearrangement in 41 patients with essential thrombocythemia. *Haematologica* 2000;85:215-216.
118. Richards EM, Bloxham DM, Nacheva E, Marcus RE, Green AR. BCR rearrangement in apparent essential thrombocythemia. *Br J Haematol* 1993;85:625-626.
119. Dewald G. Interphase FISH studies for chronic myeloid leukemia. *Molecular cytogenetics: protocols and applications*. Humana Press, Totowa USA, 2002.
120. Morrison-DeLap SJ, Kuffel DG, Dewald GW, Letendre L. Unbalanced 1;7 translocations and therapy-induced hematologic disorders: a possible relationship. *Am J Hematol* 1986;21:39-47
121. Jenkins RB, Le Beau MM, Kraker Wj, Borell TJ, Stalboerger PG, Davis EM, Penland L, Fernald A, Espinosa R III, Schaid DJ, Noel P, Dewald GW. Fluorescence in situ hybridization: a sensitive method for trisomy 8 detection in bone marrow specimens. *Blood* 1992;79:3307-3315.
122. Amiel A, Gaber E, Manor Y, Fejgin M, Joseph-Lerner N, Ravid M, Lishner M. Fluorescence in situ hybridization for the detection of trisomies 8 and 9 in polycythemia vera. *Cancer Genet Cytogenet* 1995;79:153-156.
123. Najfeld V. FISHing among myeloproliferative disorders. *Seminars in Hematology* 1997;34:55-63.
124. Westwood NB, Gruszka-Westwood AM, Pearson CE, DeLord CF, Green AR, Huntly BJP, Lakhani A, McMullin MF, Pearson TC. The incidences of trisomy 8, trisomy 9 and D20S108 deletion in polycythaemia vera: an analysis of blood granulocytes using interphase fluorescence in situ hybridization. *Br J Haematol* 2000;110:839-846.

125. Asimakopoulos FA, Holloway TL, Nacheva EP, Scott MA, Fenaux P, Green AR. Detection of chromosome 20q deletions in bone marrow metaphases but not peripheral blood granulocytes in patients with myeloproliferative disorders or myelodysplastic syndromes. *Blood* 1996;87:1561-1570.
126. Najfeld V, Montella L, Scalise A, Fruchtman S. Exploring polycythemia vera with fluorescence in situ hybridization: additional cryptic 9p is the most frequent abnormality detected. *Br J Haematol* 2002;119:558-566.
127. Najfeld V, Fuchs S, Merando P, Lezon-Geyda K, Fruchtman S. Fluorescence in situ hybridization analysis of the PRV-1 gene in polycythemia vera: implications for its role in diagnosis and pathogenesis. *Exp Hematol* 2003;31:118-121.
128. Tefferi A, Lasho TL, Wolanskyj AP, Mesa RA. Neutrophil PRV-1 expression across the chronic myeloproliferative disorders and in secondary or spurious polycythemia. *Blood* 2004;103:3547-3548.
129. Johansson P, Ricksten A, Wennstrom L, Palmqvist L, Kutti J, Andreasson B. Increased risk for vascular complications in PRV-1 positive patients with essential thrombocythaemia. *Br J Haematol* 2003;123:513-516.
130. Klippel S, Strunck E, Temerinac S, Bench AJ, Meinhardt G, Mohr U, Leichtle R, Green AR, Griesshammer M, Heimpel H, Pahl HL. Quantification of PRV-1 mRNA distinguishes polycythemia vera from secondary erythrocytosis. *Blood* 2003;102:3569-3574.
131. Kralovics R, Buser AS, Teo SS, Coers J, Tichelli A, van der Maas AP, Skoda RC. Comparison of molecular markers in a cohort of patients with chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2003;102:1869-1871.
132. Liu E, Jelinek J, Pastore YD, Guan Y, Prchal JF, Prchal JT. Discrimination of polycythemias and thrombocytoses by novel, simple, accurate clonality assays and comparison with PRV-1 expression and BFU-E response to erythropoietin. *Blood* 2003;101:3294-3301.
133. Teofili L, Martini M, Luongo M, Di Mario A, Leone G, De Stefano V, Larocca LM. Overexpression of the polycythemia rubra vera-1 gene in essential thrombocythemia. *J Clin Oncol* 2002;20:4249-4254.

134. Temerinac S, Klippel S, Strunck E, Roder S, Lubbert M, Lange W, Azemar M, Meinhardt G, Schaefer HE, Pahl HL. Cloning of PRV-1, a novel member of the uPAR receptor superfamily, which is overexpressed in polycythemia rubra vera. *Blood* 2000;95:2569-2576.
135. Strunck E, Bliestle H, Temerinac S, Pahl HL. Characterization of the promoter PRV-1, a gene overexpressed in polycythemia vera. *Blood* 2000;96:511a.
136. Elis A, Amiel A, Manor Y, Tangi I, Fejgin M, Lishner M. The detection of trisomies 8 and 9 in patients with essential thrombocytosis by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 1996;92:14-17.
137. Bench AJ, Cross NC, Huntly BJ, Nacheva EP, Green AR. Myeloproliferative disorders. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001;14:531-551.
138. Kibbelaar RE, van Kamp H, Dreef EJ, Wessels JW, Beverstock GC, Raap AK, Fibbe WE, den Ottolander GJ, Kluin PM. Detection of trisomy 8 in hematological disorders by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1991;56:132-136.
139. Fugazza G, Bruzzone R, Dejana AM, Patrone F, Sessarego M. Trisomy 8 detection in Ph+ CML patients using conventional cytogenetic and interphase fluorescence in situ hybridization techniques. *Cancer Genet Cytogenet* 1994;72:24-27.
140. Price CM, Kanfer EJ, Colman SM, Westwood N, Barrett AJ, Greaves MF. Simultaneous genotypic and immunophenotypic analysis of interphase cells using dual-color fluorescence: a demonstration of lineage involvement in polycythemia vera. *Blood* 1992;80:1033-1038.
141. Nacheva E, Grace C, Holloway TL, Green AR. Comparative genomic hybridization in acute myeloid leukemia. A comparison with G-banding and chromosome painting. *Cancer Genet Cytogenet* 1995;82:9-16.
142. Fugazza G, Bruzzone R, Puppo L, Patrone F, Sessarego M. Amplified c-MYC sequences localized by fluorescence in-situ hybridization on double minute chromosomes in acute myeloid leukemias. *Leuk Res* 1997;21:703-709.

143. Nowell P, Jenmsen J, Gardner F, Murphy S, Chaganti RS, German J. Chromosomes studies in preleukemia. III. Myelofibrosis. *Cancer* 1976;38:1873-1881.
144. Swolin B, Weinfeld A, Westin J. Trisomy 1q in polycythemia vera and its relation to disease transition. *Am J Hematol* 1986;22:155-167.
145. Rege-Cambrin G, Speleman F, Kerim S, Scaravaglio P, Dal Cin P, Michaux JL, Offner F, Saglio G, Van den Berghe H. Extra translocation +der(1q9p) is a prognostic indicator in myeloproliferative disorders. *Leukemia* 1991;5:1059-1063.
146. Chen Z, Notohamiprodijom M, Guan XY, Paietta E, Blackwell S, Stout K, Turner A, Richkin K, Trent JM, Lamb A, Sandberg AA. Gain of 9p in the pathogenesis of polycythemia vera. *Genes Chromosomes Cancer* 1998;22:321-324.
147. Diaz MO, Pomykala HM, Bohlander Sk, Maltepe E, Malik K, Brownstein B, Olopade OI. Structure of the human type I-interferon gene cluster determined from a YAC clone contig. *Genomics* 1994;22:540-552.
148. Dumont DJ, Anderson L, Breitman ML, Duncan AMV. Assignment of the endothelial-specific protein receptor tyrosine kinase gene (TEK) to human chromosome 9p21. *Genomics* 1994;23:512-513.
149. Van Leuven F, Stas L, Hilliker C, Miyake Y, Bilinki P, Gossler A. Molecular cloning and characterization of the human interleukin-11 receptor alpha-chain gene, IL11RA, located on chromosome 9p13. *Genomics* 1996;31:65-70.
150. Dai C and Krantz SB. Increased expression of the INK4a/ARF locus in polycythemia vera. *Blood* 2001;97:3424-3432.
151. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993;366:704-707.
152. Asimakopoulos FA, Green AR. Deletions of chromosome 20q and the pathogenesis of myeloproliferative disorders. *Br J Haematol* 1996;95:219-226.
153. Asimakopoulos FA, White NJ, Nacheva E, Green AR. Molecular analysis of chromosome 20q deletions associated with myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood* 1994;84:3086-3094.

-
154. Roulston D, Espinosa III R, Stoffel M, Bell GI, Le Beau MM. Molecular genetics of myeloid leukemia: Identification of the commonly deleted segment of chromosome 20. *Blood* 1993;82:3424-3429.
155. Bench AJ, Aldred MA, Humphray SJ, Champion KM, Gilbert JG, Asimakopoulos FA, Deloukas P, Gwilliam R, Bentley DR, Green AR. A detailed physical and transcriptional map of the region of chromosome 20 that is deleted in myeloproliferative disorders and refinement of the common deleted region. *Genomics* 1998;49:351-362.
156. Wang PW, Iannantuoni K, Davis EM, Espinosa R III, Stoffel M, Le Beau MM. Refinement of the commonly deleted segment in myeloid leukemias with a del(20q). *Genes Chromosomes Cancer* 1998;21:75-81.
157. Bench AJ, Nacheva EP, Hood TL, Holden JL, French L, Swanton S, Champion KM, Li J, Whittaker P, Stavrides G, Hunt AR, Huntly BJ, Campbell LJ, Bentley DR, Deloukas P, Green AR. Chromosome 20 deletions in myeloid malignancies: reduction of the common deleted region, generation of a PAC contig and identification of candidate genes. *Oncogene* 2000;19:3902-3913.
158. Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc natl Acad Sci USA* 1971;68:820-823.
159. Herman JG, Latif F, Weng Y, Lerman MI, Zbar B, Liu S, Samid D, Duan DS, Gnarr JR, Linehan WM, Baylin SB. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:9700-97004.
160. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9821-9826.
161. Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* 1995;1:686-692.
162. Davis MP, Dewald GW, Pierre RV, Hoagland HC. Hematologic manifestations associated with deletions of the long arm of chromosome 20. *Cancer Genet Cytogenet* 1984;12:63-71.

163. Hawthorn L, Cowell JK. Integration of the physical and genetic linkage map for human chromosome 13. *Genomics* 1995;27:399-404.
164. Gardiner AC, Corcoran MM, Oscier DG. Cytogenetic, fluorescence in situ hybridisation, and clinical evaluation of translocations with concomitant deletion at 13q14 in chronic lymphocytic leukaemia. *Genes Chromosomes Cancer* 1997;20:73-81.
165. Lyon MF. X-chromosome inactivation and developmental patterns in mammals. *Biological Reviews* 1972;47:1-35.
166. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Feinberg AP. Use of restriction fragments length polymorphisms to determine the clonal origin of human tumors. *Science* 1985;227:642-645.
167. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Preisinger AC, Willard HF, Michelson AM, et al. Clonal analysis using recombinant DNA probes from the X-chromosome. *Cancer Res* 1987;47:4806-4813.
168. Anger B, Janssen JWG, Schrezenmeier H, Hehlmann R, Heimpel H, Bartram CR. Clonal analysis of chronic myeloproliferative disorders using X-linked DNA polymorphisms. *Leukemia* 1990;4:258-261.
169. Tsukamoto N, Morita K, Maehara T, Okamoto K, Sakai H, Karasawa M, et al. Clonality in chronic myeloproliferative disorders defined by X-chromosome linked probes: demonstration of heterogeneity in lineage involvement. *Br J Haematol* 1994;86:253-258.
170. Lucas GS, Padua RA, Masters GS, Oscier DG, Jacobs A. The application of X-chromosome gene probes to the diagnosis of myeloproliferative disease. *Br J Haematol* 1989;72:530-533.
171. El-Kassar N, Hetet G, Li Y, Briere J, Grandchamp B. Clonal analysis of haemopoietic cells in essential thrombocythaemia. *Br J Haematol* 1995;90:131-137.
172. El-Kassar N, Hetet G, Briere J, Grandchamp B. Clonality analysis of hematopoiesis in essential thrombocythemia: advantages of studying T lymphocytes and platelets. *Blood* 1997;89:128-134.
173. El-Kassar N, Hetet G, Briere J, Grandchamp B. Clonality analysis of hematopoiesis and thrombopoietin levels in patients with essential thrombocythemia. *Leuk Lymphoma* 1998;30:181-188.

174. Harrison CN, Gale RE, Machin SJ, Linch DC. A large proportion of patients with a diagnosis of essential thrombocythemia do not have a clonal disorder and may be at lower risk of thrombotic complications. *Blood* 1999;93:417-424.
175. Mitterbauer G, Winkler K, Gisslinger H, Geissler K, Lechner K, Mannhalter C. Clonality analysis using X-chromosome inactivation at the human androgen receptor gene (HUMARA). Evaluation of large cohorts of patients with chronic myeloproliferative diseases, secondary neutrophilia, and reactive thrombocytosis. *Am J Clin Pathol* 1999;112:93-100.
176. Chiusolo P, La Barbera EO, Laurenti L, Piccirillo N, Sora F, Giordano G, et al. Clonal hemopoiesis and risk of thrombosis in young female patients with essential thrombocythemia. *Exp Hematol* 2001;29:670-676.
177. Shih LY, Lin TL, Dunn P, Wu JH, Tseng CP, Lai CL, et al. Clonality analysis using X-chromosome inactivation patterns by HUMARA-PCR assay in female controls and patients with idiopathic thrombocytosis in Taiwan. *Exp Hematol* 2001;29:202-208.
178. Shih LY, Lin TL, Lai CL, Dunn P, Wu JH, Wang PN, et al. Predictive values of X-chromosome inactivation patterns and clinicohematologic parameters for vascular complications in female patients with essential thrombocythemia. *Blood* 2002;100:1596-1601.
179. Malcovati L, La Starza R, Merante S, Pietra D, Mecucci C, Cazzola M. Hypereosinophilic syndrome and cyclic oscillations in blood cell counts. A clonal disorder of hematopoiesis originating in a pluripotent stem cell. *Haematologica* 2004;89:497-499.
180. Asimakopoulos FA, Gilbert JGR, Aldred MA, Pearson TC, Green AR. Interstitial deletion constitutes the major mechanism for loss of heterozygosity on chromosome 20q in polycythemia vera. *Blood* 1996;88:2690-2698.
181. Gale RE. Evaluation of clonality in myeloid stem-cell disorders. *Semin Hematol* 1999;36:361-372.

182. Florensa L, Besses C, Zamora L, Bellosillo B, Espinet B, Serrano S, Woessner S, Solé F. Endogenous erythroid and megakaryocytic circulating progenitors, HUMARA clonality assay, and PRV-1 expression are useful tools for diagnosis of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood* 2004;103:2427-2428.
183. Fields S. The future is function. *Nat Genet* 1997;15:325-327.
184. Pellagatti A, Vetrie D, Langford CF, Gama S, Eagleton H, Wainscoat JS, Boulwood J. Gene expression profiling in polycythemia vera using cDNA microarray technology. *Cancer Res* 2003;63:3940-3944.
185. Tenedini E, Fagioli ME, Vianelli N, Tazzari PL, Ricci F, Tagliafico E, Ricci P, Gugliotta L, Martinelli G, Tura S, Baccarani M, Ferrari S, Catani L. Gene expression profiling of normal and malignant CD34-derived megakaryocytic cells. *Blood* 2004;104:3126-3135.
186. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005;16:365:1054-1061.
187. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S, Adelsperger J, Koo S, Lee JC, Gabriel S, Mercher T, D'Andrea A, Frohling S, Dohner K, Marynen P, Vandenberghe P, Mesa RA, Tefferi A, Griffin JD, Eck MJ, Sellers WR, Meyerson M, Golub TR, Lee SJ, Gilliland DG. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005;7:387-397.
188. James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garcon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005;27:1-5.
189. Shannon K, Van Etten RA. JAKing up hematopoietic proliferation. *Cancer Cell* 2005;7:291-293.
190. Kaushansky K. On the Molecular Origins of the Chronic Myeloproliferative Disorders: It All Makes Sense. *Blood* 2005;7:Epub ahead of print.

191. Fenaux P, Morel P, Lai JL. Cytogenetics of myelodysplastic syndromes. *Semin Hematol* 1996;33:127-138.
192. Heim S, Mitelman F. Cytogenetic analysis in the diagnosis of acute leukemia. *Cancer* 1992;70:1701-1709.
193. Mitelman F, Mertens F, Johansson B. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat Genet* 1997;15:417-474.
194. Blij-Philipsen MVD, Stellink F, Vlasveld LTH. Partial trisomy 9 in a patient with polycythemia vera. *Cancer Genet Cytogenet* 1997;97:81-82.
195. Fialkow PJ, Faguet GB, Jacobson RJ, Vaidya K, Murphy S. Evidence that essential thrombocythemia is a clonal disorder with origin in a multipotent stem cell. *Blood* 1981;58:916-919.
196. Gaetani GF, Ferraris AM, Galiano S, Giutinti P, Canepa L, D'Urso M. Primary thrombocythemia: clonal origin of platelets, erythrocytes and granulocytes in A Gd^b:Gd^{Mediterranean} subjects. *Blood* 1982;59:76-79.