



# PONENCIAS SEHH

Palacio de Congresos 17-19 octubre

SEVILLA 2013

LV Congreso Nacional de la SEHH  
XXIX Congreso Nacional de la SETH

LV

Congreso Nacional  
de la Sociedad Española de  
Hematología y Hemoterapia

XXIX

Congreso Nacional  
de la Sociedad Española de  
Trombosis y Hemostasia

Sevilla 2013

17-19 octubre

Palacio de Congresos



# Sumario

## **XXVI LECCIÓN CONMEMORATIVA ANTONIO RAICHS** ..... 1

<b>Valor de la investigación aplicada en enfermedades poco frecuentes. Las mastocitosis como ejemplo</b> .....	2
Luis Escribano Mora	

## **SIMPOSIOS** ..... 5

<b>Nuevas terapias en las leucemias agudas</b> .....	6
--	---

<b>La célula madre leucémica. Biología, identificación e implicaciones terapéuticas</b> .....	7
Ruth M. Risueño, Meritxell Nomdedeu, Marta Pratcorona, María Carmen Lara-Castillo	

<b>Clinical decision making in acute myeloid leukemia based on the genetic disease profile</b> .....	11
Richard F. Schlenk	

<b>Papel de la enfermedad residual en el algoritmo terapéutico de la leucemia aguda linfoblástica</b> .....	17
Josep María Ribera Santasusana, Mireia Morgades, Olga García, Albert Oriol, Jordi Juncà, Montserrat Batlle, Blanca Xicoy, Juan-Manuel Sancho, Christelle Ferrá, Susana Vives, Miriam Moreno, Alonso Flores, Jordi Ribera, Eulàlia Genescà, Isabel Granada, Lurdes Zamora, Fuensanta Millá, Evarist Feliu	

<b>El fenómeno de la transformación histológica en los síndromes linfoproliferativos: mecanismos y tratamiento</b> .....	24
--	----

<b>Patología y mecanismos moleculares de transformación y transdiferenciación de los linfomas B de bajo grado</b> .....	25
Santiago Montes Moreno	

<b>La leucemia linfática crónica y su transformación a linfoma difuso de célula grande. Bases moleculares y tratamiento</b> .....	30
Eva Giné Soca, L.C. Magnano	

<b>Transformación a linfoma B difuso de células grandes en el linfoma folicular. Bases moleculares y tratamiento</b> .....	34
Silvia Montoto Almirall	

<b>Leucemia mieloide crónica: mirando hacia el futuro</b> .....	38
<b>Biology of the leukemic stem cell in chronic myeloid leukemia</b> .....	39
Mhairi Copland	
<b>Estado actual del tratamiento de la leucemia mieloide crónica</b> .....	43
Francisco Cervantes Requena	
<b>¿Se puede curar la leucemia mieloide crónica? Estrategias actuales y futuras</b> .....	47
Juan Luis Steegmann Olmedillas	
<b>Las técnicas de laboratorio y sus avances en el contexto clínico: ¿qué debe saber el clínico?</b> .....	51
<b>La biopsia ósea en la hematología actual</b> .....	52
María Rozman Jurado	
<b>Avances tecnológicos y conceptuales en citometría de flujo</b> .....	56
Juan Flores-Montero, Antonio López, Juana Ciudad, Julia Almeida, Martín Pérez-Andrés, Sergio Matarraz, Susana Barrena, Arancha Rodríguez Caballero, Cristina Teodosio, Quentin Lecrevisse1, Lourdes Martín, Carlos Fernández-Jiménez, Paloma Bárcena, Luz Sánchez, Rosa Ana Rivas-Amoedo, Miriam Fierro, Alberto Orfao	
<b>Aplicación asistencial de técnicas citogenéticas y moleculares experimentales</b> .....	62
Juan Cruz Cigudosa, Sara Álvarez de Andrés	
<b>Actualización de las anemias hemolíticas inmunes</b> .....	66
<b>Anemias hemolíticas inmunes, actualización clínico-biológica</b> .....	68
Fernando Ataúlfo González Fernández, Maribel Sáez Serrano, María Paz Martín Hernández	
<b>Enfermedad hemolítica por anticuerpos fríos</b> .....	75
Montserrat López Rubio	
<b>Hemolisis inmune asociada a trasplante</b> .....	80
N. Carpio Martínez, F Moscardó, P Solves, MA Sanz	
<b>Tratamiento de las anemias hemolíticas autoinmunes. Papel de los anticuerpos monoclonales</b> .....	85
F. Javier Peñalver Párraga	
<b>Evolución clonal y su importancia en el tratamiento del mieloma múltiple</b> .....	91
<b>Clonal competition and dominance and its role in the treatment of multiple myeloma</b> .....	92
P. Leif Bergsagel	
<b>Optimización del tratamiento en primera línea del mieloma múltiple</b> .....	97
M.ª Victoria Mateos, E. Ocio, R. García-Sanz, B. Paiva, N. Gutiérrez, J.F. San Miguel	
<b>Optimización del tratamiento de rescate (refractariedad/recaída) en el mieloma múltiple</b> .....	102
Laura Rosiñol Dachs	

<b>Estrategias de tratamiento en los estadios localizados de los linfomas</b> .....	106
<b>Introducción a los estadios precoces de los linfomas</b> .....	107
Miguel Ángel Canales Albendea	
<b>Current strategies for the treatment of localized-stage Hodgkin lymphoma</b> .....	110
Andreas Engert	
<b>Tratamiento del linfoma folicular <i>in situ</i>, del linfoma del manto indolente y de los estadios localizados del linfoma folicular</b> .....	111
Armando López-Guillermo, Jordina Rovira	
<b>Treatment of localized diffuse large B cell lymphoma</b> .....	116
Christian Gisselbrecht	
<b>Papel actual del análisis genético y molecular en el diagnóstico y tratamiento de las neoplasias hematológicas</b> .....	120
<b>Cytogenetics and molecular biology of acute myeloid leukemia: towards an individualized therapy?</b> .....	121
María D. Otero	
<b>Integración del diagnóstico y la terapia en las neoplasias linfoides. Aplicación de la secuenciación masiva</b> .....	125
Miguel Ángel Piris Pinilla	
<b>Alteraciones genéticas en la leucemia linfática crónica: nuevas dianas y estrategias terapéuticas</b> .....	126
Mónica López-Guerra, Sílvia Xargay-Torrent, Dolors Colomer	
<b>La hematología en tiempos de crisis</b> .....	130
<b>El servicio de hematología como unidad de gestión clínica</b> .....	131
Ana Isabel Heiniger Mazo	
<b>Nuevos modelos de gestión en hematología y hemoterapia: readaptarse a la actual situación de crisis económica</b> .....	135
Ramon Salinas i Argente, Maria del Mar Pujol Balaguer, Maricel Subirá Casellas	
<b>El hospital innovador</b> .....	146
Lluís Blanch Torra	
<b>La troncalidad en la formación MIR de Hematología: retos y oportunidades. Informe de la Comisión Nacional</b> .....	148
Adrián Alegre	

<b>Trasplante hematopoyético haploidéntico: su utilidad y su tiempo han llegado</b> .....	157
<b>The role of NK cell alloreactivity on haploidentical transplantation</b> .....	158
Loredana Ruggeri	
<b>Trasplante haploidéntico de pacientes pediátricos</b> .....	162
Marta González-Vicent, Miguel Ángel Díaz Pérez	
<b>Trasplante haploidéntico sin depleción T</b> .....	165
Jorge Gayoso Cruz, P. Balsalobre, D. Serrano, G. Rodríguez, M. Kwon, C. Muñoz, J. Anguita, A. Pérez-Corral, I. Buño, J.L. Díez-Martín	
<b>Immune reconstitution after high dose cyclophosphamide in haploidentical transplantation</b> .....	170
Heather Symons	
 <b>Actualización en el diagnóstico y tratamiento de los síndromes mielodisplásicos</b> .....	177
<b>Diagnóstico integrado de los síndromes mielodisplásicos primarios:     datos clínicos, morfología, inmunofenotipo, citogenética y biología molecular</b> .....	178
Teresa Vallespí, C. Sánchez-Morata, M. Ortega, L. Arenillas, L. Gallur, M. Navarrete, N. Martínez-Morgado, M. Aznar, J. Montoro, D. Valcárcel, C. Palacio, L. Florensa	
 <b>Simposio del Grupo Español de Citología Hematológica. Anemia diseritropoyética congénita</b> .....	185
<b>Aspectos citomorfológicos de las anemias diseritropoyéticas congénitas</b> .....	186
Elisa Luño Fernández	
<b>Novedades genéticas y moleculares en las anemias diseritropoyéticas congénitas</b> .....	199
M. Letícia Ribeiro, Tabita Magalhães Maia	
<b>Estrategias en el manejo de las anemias diseritropoyéticas congénitas</b> .....	204
Cristina Díaz de Heredia Rubio	
<b>Anemia diseritropoyética congénita de tipo III:     nuevo caso esporádico con algunas peculiaridades citomorfológicas</b> .....	209
Ricardo Bernal, R. Morales, I. Pérez de Soto, J. Sánchez, R. Fernández, C. Prats, J. de Blas, T. Caballero, A. Herrera, E. Carrillo, C. Calderón, A. Martín-Noya, J.A. Pérez-Simón	
 <b>La célula stem y el microambiente: de la fisiopatología a la terapia celular</b> .....	215
<b>Deconstructing niche contributions to oncogenesis     in the hematopoietic system: progress and challenges</b> .....	216
Marc H.G.P. Raaijmakers	
<b>El sistema linfóide como fuente terapéutica</b> .....	217
Joan García López	

<b>Hospitales comarcales: asistencia integrada del enfermo hematológico</b> .....	220
<b>La hospitalización domiciliaria en la atención a los enfermos hematológicos</b> .....	221
Pedro Sanroma Mendizábal	
<b>Docencia e investigación en un hospital comarcal.</b>	
<b>Comunicación y colaboración con los hospitales de referencia</b> .....	223
Emilia Pardal de la Mano	
<b>Aportación de los analizadores automáticos al diagnóstico hematológico</b> .....	228
Jesús Villarrubia, Diego Velasco, Juan Manuel Alonso, Juan Diego Rodríguez-Gambarte, Ana Vallés, Javier Alexander Fonseca, María Tenorio, Fernando Ataúlfo González	

## **CASOS CLÍNICO-CITOLÓGICOS** .....

<b>Caso 1. Mujer de 75 años con pancitopenia</b> .....	235
I. Dlouhy, Ó. Peña, N. Martínez Cibrian, X. Andrade, X. Calvo, M. Aymerich, D. Costa, N. Villamor, J. Esteve, M. Rozman	
<b>Caso 2. Paciente con cuadro constitucional, hemofagocitosis en médula ósea y ganglio linfático y diagnóstico de linfoma difuso de célula grande de línea B</b> .....	240
P. Iniesta, N. Navarro, E. Campo, J. Esteban, J.M. Hernández Rivas, L. Quintana, G. Soler, M.M. Osma, A. Jerez, F.J. Ortuño	
<b>Caso 3. Anemia, neutropenia y fiebre</b> .....	246
A. Pérez Martínez, B. Navarro, L. García, P. Amat, V. Posadas, F. Mares, J. Donat, R. Fernández-Delgado	
<b>Caso 4. Paciente con bicitopenia y diseritropoyesis severa</b> .....	252
A. Miguel, M. Orero, R. Collado, E. Luño, D. Ivars, C. Villegas, S. Ortiz, F. Carbonell	
<b>Caso 5. Paciente con enfermedad de Gaucher y anemia macrocítica</b> .....	261
L. Ábalo, I. Saavedra, J.D. Rodríguez-Gambarte, M. Calbacho, J. López-Jimenez, M. García-Cosío, D. Rey, M. Talavera, J. Carrillo-Farga, J. Villarrubia	
<b>Caso 6. Fracaso renal agudo en paciente con bicitopenia</b> .....	266
M.A. Piñán, M. Olivares, A. Balerdi, A. Iglesias, M. Zamora, R. del Orbe, M. Dueñas, I. Olazabal, M. Puente, E. Amutio, I. Ancín, M. Riñón	

# XXVI LECCIÓN CONMEMORATIVA ANTONIO RAICHS

**Coordinadores:** **Carmen Burgaleta**

*Hospital Universitario Príncipe de Asturias.  
Alcalá de Henares (Madrid)*

**Marcos González Díaz**

*Hospital Clínico Universitario de Salamanca*

## Valor de la investigación aplicada en enfermedades poco frecuentes. Las mastocitosis como ejemplo

LUIS ESCRIBANO MORA

*Investigador Asociado. Servicio de Citometría. Centro de Investigación del Cáncer. Universidad de Salamanca. Coordinador de la Red Española de Mastocitosis (REMA)*

### Introducción

Las mastocitosis (MS) son un grupo de enfermedades poco frecuentes (“raras”) que se caracterizan por la presencia de mastocitos anormales (MC) en diversos órganos o tejidos. Excepto en las formas agresivas de la enfermedad, las MS son enfermedades poco proliferativas; así, en las fases iniciales de la enfermedad no existe ni proliferación ni acúmulo de MC en los tejidos; por ello, no es posible identificar agregados compactos de MC en la médula ósea (MO); es decir, el único “criterio mayor” aceptado por las clasificaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2001 y 2008;<sup>(1,2)</sup> es decir, en una enfermedad cuyo órgano diana para el diagnóstico es la MO sólo se acepta un criterio que requiere la presencia de una lesión anatómica, el agregado que tiene una alta especificidad pero una sensibilidad muy baja, siendo así que en más del 30% de las formas indolentes (MSI) con lesión cutánea y en cerca del 40% de las MSI sin lesión cutánea esta lesión no va a estar presente. Por todo ello, la búsqueda de métodos más sensibles resultaba indispensable y constituyó el objetivo de la Red Española de Mastocitosis (REMA) desde el año 1993.

### Conceptos generales sobre las enfermedades poco frecuentes

El sentimiento que mejor define a un paciente, o a los padres de un niño, con una enfermedad poco frecuente es la angustia. La búsqueda de alguien capaz de diagnosticar y tratar a estos pacientes puede durar años y, con frecuencia, hipoteca el futuro de los pacientes o, en el peor de los casos, compromete gravemente su calidad de vida y su pronóstico. Tanto la OMS como la Unión Europea y los Institutos de Salud de los Estados Unidos consideran que las redes multidisciplinarias, multihospitalarias y, de forma ideal, multinacionales, representan la única opción para asegurar el derecho a la salud de estos pacientes.

La REMA comenzó su andadura en el año 1993 a través de un acuerdo entre la Unidad de Mastocitosis del Hospital Ramón y Cajal de Madrid y el Servicio de Citometría del Centro de la Universidad de Salamanca; en el año 2007 se creó el Instituto de Estudios de Mastocitosis de Castilla-La Mancha, que sustituyó a la Unidad del Ramón y Cajal. La REMA cubre todos los aspectos exigidos a una red para enfermedades poco frecuentes: epidemiología, clínica, laboratorio, citología, histología, citometría de flujo, biología molecular. Ha llevado a cabo múltiples proyectos de investigación nacionales e internacionales, así como ensayos clínicos independientes.

Además, han colaborado los Servicios de Anatomía Patológica, Pediatría, Cuidados Intensivos, Radiodiagnóstico y Anestesia, entre otros, de los hospitales implicados en la REMA en cada momento.

España cuenta con la mayor red para el estudio integral de las MS y síndromes relacionados del mundo, es decir, los pacientes vistos en la REMA tienen acceso a la mejor calidad de vida y al mejor pronóstico posibles. El único problema que queda por resolver es el de aquellos pacientes a los que se les niega la posibilidad de ser vistos por la REMA y que menden durante meses, cuando no años, la deseada orden de asistencia que nunca llega.

A lo largo de mi presentación comentaré de forma cronológica las aportaciones de la investigación aplicada llevada a cabo por la REMA en las MS y enfermedades relacionadas.

### Preguntas y respuestas

**1. ¿Existe un método más sensible y específico que la histología para diagnosticar una MS sistémica?** (1993-1995): Identificación y caracterización de los mastocitos normales de MO por citometría de flujo<sup>(3)</sup>. Mediante el uso de citometría de flujo multiparamétrica y combinaciones específicas de anticuerpo monoclonales pudimos identificar los MC de MO aun cuando su frecuencia fuera inferior a  $10^{-5}$ .



**2. ¿Existe un inmunofenotipo patognomónico asociado a los mastocitos de las MS sistémicas?** (1993-1997): Demostración de un inmunofenotipo aberrante en las MS sistémicas<sup>(4)</sup>. Una vez puesta a punto la técnica para la identificación y el recuento de MC, pudimos comprobar que los MC de las MS, si se exceptúan aquéllos de una forma poco frecuente conocida como MS sistémica bien diferenciada (MSBD), expresan en su superficie el receptor de alta afinidad para la IL-2 (CD25), que sólo está presente en la MS y en los MC de un grupo de síndromes hipereosinofílicos en los que se puede demostrar el gen de fusión FIP1L1-PDGFR<sup>(5)</sup>. Por lo tanto, la expresión de CD25 se puede considerar como un marcador patognomónico de las MS. La REMA considera que la expresión de CD25 es, por lo tanto, un criterio mayor para el diagnóstico de MS.

**3. ¿Existen distintos patrones inmunofenotípicos de maduración asociados a distintas formas de la enfermedad?**<sup>(6)</sup> (2000-2010): Los MC de MO en las MS presentan un inmunofenotipo heterogéneo; así, se pueden identificar tres patrones diferentes asociados a diferentes estadios de maduración: a) un patrón inmunofenotípico inmaduro asociado a las formas de mal pronóstico de la enfermedad (MSA y leucemia de MC); b) un patrón activado asociado a las MSI; y c) un patrón maduro presente en las MSBD.

**4. ¿Cuál es la frecuencia y el patrón de las mutaciones del *KIT* en las MS?**<sup>(7)</sup> Estudio prospectivo en MC y células mieloides y linfoides de MO en MS. La mutación del *KIT* en el exón 17 en el MC está presente en prácticamente el 100% de las MS y es poco frecuente en las MSBD (~ 20%). En las formas agresiva está mutación afecta también a líneas mieloides e incluso linfoides en el 100% de las formas agresivas y en alrededor del 30% de las MSI con lesión cutánea y en una pequeña proporción de las MSI sin lesión cutánea. En resumen, la mutación del *KIT* es un marcador característico de las MS e identifica un grupo de pacientes en los que el daño molecular está presente, además, en líneas mieloides e incluso linfoides, lo que demuestra una afectación de la *stem cell* hematopoyética pluripotencial.

**5. ¿Existe una relación entre los patrones inmunofenotípicos y los patrones de mutación del *KIT* en las MS?**<sup>(8)</sup> En este trabajo se demostró que los MC de pacientes con mutación multilínea D816V del *KIT* expresan un inmunofenotipo inmaduro independientemente de que se trate de MSI o formas agresivas (MSA), mientras que en los casos con mutación del *KIT* restringida al MC el inmunofenotipo es de tipo “activado”. En resumen, el inmunofenotipo es un marcador indirecto para predecir el patrón de mutaciones en las MS.

**6. ¿Existe una relación entre los patrones de mutación del *KIT* y el pronóstico de las MS?**<sup>(9)</sup> La presencia de mutación del *KIT* en otras líneas hematopoyéticas además del mastocito está directamente asociada a una mayor probabilidad de progresión en las MSI; así, los pacientes con mutación restringida al MC tienen una probabilidad de progresión prácticamente nula, mientras que en los casos con mutación multilínea la progresión alcanza al 80% a los 30 años de evolución. En resumen, el patrón de la mutación del *KIT* en las MS es un parámetro independiente para predecir la progresión de la enfermedad en las MSI.

**7. ¿Cuál es la frecuencia de enfermedades alérgicas en las MS?**<sup>(10)</sup> La frecuencia de atopía o de enfermedad alérgica, definidas por la presencia de inmunoglobulina E (IgE) específica frente al alérgeno responsable, es del 38,6% y del 23,9%, respectivamente. La anafilaxia está presente en el 22% de los casos y, de ellos, sólo en 9 de los 36 se identificó un mecanismo mediado por IgE, siendo los demás casos idiopáticos. En resumen, la frecuencia de alergia en las MS es similar a la descrita en la población general; por el contrario, existe un aumento relevante de la anafilaxia.

**8. ¿Cuál es la frecuencia de MS en los pacientes con anafilaxia sin lesión cutánea?**<sup>(11)</sup> En un estudio que incluyó 83 adultos con anafilaxia o síntomas graves de liberación de mediadores mastocitarios, sin que se demostrara MS cutánea, se demostró que 51 de ellos (61) cumplían con los criterios de MS. En 50 casos, la mutación del *KIT* detectada fue la D816V; mientras que en 3 casos se detectaron otras mutaciones diferentes en el exón 17 (D816Y, D816H e Ins815-816). Sólo en un 6% de los casos la mutación del *KIT* fue multilínea.

**9. ¿Se puede predecir la presencia de mastocitos clonales (MS) en pacientes con anafilaxia o síntomas graves de liberación de mediadores mastocitarios mediante datos clínicos y biológicos?**<sup>(11,12)</sup> Conocer si un síndrome de activación mastocitaria es o no una MS exige, al menos teóricamente, un estudio de MO con un alto coste económico; por ese motivo, la REMA ha desarrollado un *score* basado en datos demográficos y clínicos junto con el valor de la triptasa sérica que permite predecir con una sensibilidad del 92% (IC 95%: 85-100%) y una sensibilidad del 81% (IC 95%: 68-95%) la presencia de MC clonales. Los parámetros incluidos en el *score* son el género (mujer u hombre), características clínicas de los episodios agudos (colapso vascular vs. urticaria, angioedema y prurito). Las MSI sin lesión cutánea se caracterizan, de forma resumida, por: 1) Predominio masculino. 2) Episodios agudos caracterizados por síntomas cardiovasculares sin urticaria, angioedema ni prurito. 3) Anafilaxia inducida por pi-

cadura de himenóptero como desencadenante más común. 4) Mutación del *KIT* generalmente restringida al mastocito, lo que equivale a un mejor pronóstico que en las MSI con lesión cutánea.

**10. ¿Se pueden predecir los síntomas en las MS pediátricas al inicio de la enfermedad?**<sup>(13)</sup> En las MS pediátricas los síntomas de liberación de mediadores del MC son más frecuentes e intensos en los 18 meses posteriores al inicio de la enfermedad. El aumento de los niveles de triptasa al inicio de la enfermedad junto con la extensión de piel afecta permiten identificar a los niños con riesgo de padecer síntomas graves e incluso de requerir el ingreso en la unidad de cuidados intensivos. La identificación de pacientes de alto riesgo permite adoptar medidas preventivas y un tratamiento intensivo frente a la liberación de mediadores de forma precoz.

**11. ¿Existen diferencias en el perfil de expresión génica entre las diferentes categorías de MS?**<sup>(14)</sup> En un estudio realizado en MC purificados de MO hemos observado que en las MS con mutación D816V del *KIT* hemos detectado un perfil de expresión génica común caracterizado por una sobrerregulación de genes implicados en la inmunidad innata y adquirida, incluyendo genes asociados al interferón, en la respuesta a antígenos virales y en las moléculas inhibitoras del complemento. Sin embargo, el hallazgo más interesante ha sido la demostración de perfiles génicos diferentes asociados a distintas categorías de la enfermedad: A) Aumento de los genes asociados al metabolismo lipídico en las MSI sin lesión cutánea. B) Aumento de los genes asociados al metabolismo proteico en las MSI con lesión cutánea. C) Desregulación de los mecanismos asociados a la apoptosis y al ciclo celular en las MSA.

## Bibliografía

1. Valent P, Horny HP, Li CY, et al. Mastocytosis (mast cell disease). In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. World Health Organization (WHO) Classification of Tumours. Pathology & Genetics. Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Vol 1. Lyon, France: IARC Press; 2001. p. 291-302.
2. Horny HP, Metcalfe DD, Bennet JM, et al. Mastocytosis. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. (eds.). WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC; 2008. p. 54-63.
3. Orfao A, Escribano L, Villarrubia J, et al. Flow cytometric analysis of mast cells from normal and pathological human bone marrow samples. Identification and enumeration. *Am J Pathol.* 1996;149:1493-9.
4. Escribano L, Orfao A, Díaz-Agustín B, et al. Indolent systemic mast cell disease in adults: immunophenotypic characterization of bone marrow mast cells and its diagnostic implications. *Blood.* 1998;91:2731-6.
5. Klion AD, Noel P, Akin C, et al. Elevated serum tryptase levels identify a subset of patients with a myeloproliferative variant of idiopathic hypereosinophilic syndrome associated with tissue fibrosis, poor prognosis, and imatinib responsiveness. *Blood.* 2003;101:4660-6.
6. Teodosio C, García-Montero AC, Jara-Acevedo M, et al. Mast cells from different molecular and prognostic subtypes of systemic mastocytosis display distinct immunophenotypes. *J. Allergy Clin Immunol.* 2010;125:719-26.
7. García-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C, et al. *KIT* mutation in mast cells and other bone marrow haematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders. A prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood.* 2006;108:2366-72.
8. Teodosio C, García-Montero AC, Jara-Acevedo M, et al. An immature immunophenotype of bone marrow mast cells predicts for multilineage D816V *KIT* mutation in systemic mastocytosis. *Leukemia* 2011.
9. Escribano L, Alvarez-Twose I, Sanchez-Munoz L, et al. Prognosis in adult indolent systemic mastocytosis: A long-term study of the Spanish Network on Mastocytosis in a series of 145 patients. *J. Allergy Clin Immunol.* 2009;124:514-21.
10. Gonzalez de Olano D, de la Hoz B, Nunez-Lopez R, et al. Prevalence of allergy and anaphylactic symptoms in 210 adult and pediatric patients with mastocytosis in Spain: a study of the Spanish network on mastocytosis (REMA). *Clin Exp Allergy* 2007;37:1547-55.
11. Alvarez-Twose I, Gonzalez de Olano D, Sanchez-Munoz L, et al. Clinical, biological and molecular characteristics of systemic mast cell disorders presenting with severe mediator-related symptoms. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125:1269-78.
12. Alvarez-Twose I, Gonzalez-de-Olano D, Sanchez-Munoz L, et al. Validation of the REMA Score for Predicting Mast Cell Clonality and Systemic Mastocytosis in Patients with Systemic Mast Cell Activation Symptoms. *Int Arch Allergy Immunol.* 2011;157:275-80.
13. Alvarez-Twose I, Vano-Galvan S, Sanchez-Munoz L, et al. Increased serum baseline tryptase levels and extensive skin involvement are predictors for the severity of mast cell activation episodes in children with mastocytosis. *Allergy* 2012;67:813-21.
14. Teodosio C, Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, et al. Gene expression profile of highly purified bone marrow mast cells in systemic mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131:1213-24.

# **SIMPOSIOS**

## Nuevas terapias en las leucemias agudas

COORDINADORES: JORDI ESTEVE REYNER, *Servicio de Hematología. Hospital Clínic. Barcelona.*  
JOSEP M.<sup>a</sup> RIBERA SANTASUSANA. *Servicio de Hematología. ICO. Hospital Germans Trias i Pujol. Badalona (Barcelona)*

Durante el simposio se discutirán algunas de las estrategias de tratamiento de las leucemias agudas más innovadoras, tanto para la leucemia mieloide aguda (LMA) como en la leucemia aguda linfoblástica (LAL). En la primera charla, la Dra. Ruth M. Risueño describirá la relevancia de las células madre leucémicas (*leukemia-stem cell*, LSC) dentro de la jerarquía de la población leucémica en la LMA como responsables de la resistencia al tratamiento y la persistencia de la enfermedad. El diseño de diversas estrategias de tratamiento dirigidas a la eliminación eficaz de esta población constituye una de las líneas de investigación más prometedoras en el futuro del tratamiento de la enfermedad. Entre las estrategias propuestas cabe destacar anticuerpos monoclonales frente a antígenos específicos de LSC, fármacos que inhiben rutas de señalización celular esenciales en estas células, o agentes con capacidad de diferenciación de la población de LSC. Frente a este objetivo, las dificultades en el desarrollo de tratamientos selectivos frente a las LSC, que no afecten a la población de células madre hematopoyéticas normales (HSC), siguen constituyendo el principal reto de los investigadores, como la ponente, dedicados a esta línea.

En la segunda charla, el Dr. Richard Schlenk, desde la perspectiva privilegiada de responsable del diseño de protocolos terapéuticos del grupo cooperativo alemán-austriaco AMLSG (AML Study Group), abordará los fundamentos que guían la implementación de protocolos de tratamiento adaptados a la diversidad biológica de la enfermedad. Esta heterogeneidad biológica, que nos permite predecir con bastante precisión la sensibilidad inicial al tratamiento y estimar el riesgo de recidiva ulterior, constituye la base en la concepción de los protocolos de tratamiento adaptados al riesgo (*risk-adapted therapy*). Por otra parte, los recientes estudios de secuenciación masiva del genoma de la LMA han ido desvelando muchos de los trastornos genéticos y epigenéticos subyacentes, así como parte de los eventos responsables de la evolución de la enfermedad y resistencia al tratamiento. Este conocimiento permite la identificación de diversas dianas terapéuticas frente a las que pueden emplearse nuevos agentes terapéuticos, que vendrán a sumarse al arsenal terapéutico actualmente disponible.

En la tercera ponencia, la Dra. Gökbüget, coordinadora de los estudios sobre LAL del adulto del grupo alemán GMALL, revisa los nuevos fármacos empleados en el tratamiento de la LAL. Por fortuna, terminado el periodo de refinamiento de las pautas de quimioterapia basadas en fármacos clásicos, están emergiendo nuevos fármacos para el tratamiento de esta enfermedad, sobre todo los dirigidos a dianas moleculares. Entre ellos cabe citar los nuevos inhibidores de tirosincinasas, los agentes con actividad específica para la LAL-T (como la nelarabina) y los nuevos anticuerpos monoclonales como los anti-CD22 (inotuzumab ozogamicina) o los biespecíficos (anti-CD19 y anti-CD3) como el blinatumomab. La contribución de la Dra. Gökbüget es especialmente interesante, habida cuenta de que el grupo GMALL tiene amplia experiencia con la mayoría de estos fármacos.

Finalmente, el Dr. Ribera hablará del empleo de la enfermedad residual (ER) en las decisiones terapéuticas en la LAL del adulto. La ER es el principal factor pronóstico en la LAL infantil y también está llamada a serlo en la LAL del adulto, hasta el punto de que ya se emplea para estratificar el tratamiento de los pacientes una vez han alcanzado la remisión completa, como está efectuando el grupo PETHEMA y otros. Además, su determinación seriada permite detectar precozmente las recidivas y efectuar un tratamiento anticipado de las mismas. No cabe duda de que la evaluación profunda de la respuesta al tratamiento, más allá de los límites del estudio morfológico, revolucionará el concepto de remisión y recaída en esta enfermedad y permitirá introducir modificaciones en el plan terapéutico encaminadas a consolidar la respuesta y a prevenir o tratar más eficazmente las recaídas.

## La célula madre leucémica. Biología, identificación e implicaciones terapéuticas

RUTH M. RISUEÑO<sup>1</sup>, MERITXELL NOMDEDEU<sup>1,2</sup>, MARTA PRATCORONA<sup>3</sup>,  
MARÍA CARMEN LARA-CASTILLO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Josep Carreras Leukaemia Research Institute. Barcelona

<sup>2</sup> Departamento de Hematología. Hospital Clínic. Barcelona

<sup>3</sup> Fundació Clínic para la Recerca Biomèdica. Barcelona

### Antecedentes históricos

De todos los tejidos de mamíferos, el sistema hematopoyético es el primero y mejor caracterizado en términos de la organización jerárquica y diferenciación secuencial de cada una de las subpoblaciones celulares. Mediante experimentos de trasplante en ratón, se demostró la existencia de precursores clonogénicos en la médula ósea con capacidad de expansión a largo plazo y diferenciación mieloeritroide. Estos estudios permitieron la caracterización jerárquica progresiva de los distintos linajes celulares en base a su funcionalidad y fenotipo; y la identificación de las células madre hematopoyéticas (HSC, *hematopoietic stem cells*). Todas las poblaciones de células madre se caracterizan por su capacidad de diferenciación (la habilidad de dar lugar a una progenie celular heterogénea, que progresivamente se amplifica, diversifica y se especializa siguiendo un proceso jerárquico) y auto-renovación (la habilidad de formar nuevas células madre idénticas, con el mismo potencial de proliferación, expansión y diferenciación) [revisado en<sup>(1)</sup>].

Como los tejidos sanos, los tumores están compuestos por poblaciones celulares funcional y morfológicamente heterogéneas. En los años 70, se demostró que las leucemias agudas poseen poblaciones con distinta tasa de proliferación. De hecho, la capacidad clonogénica no es similar en todas las células leucémicas. Se propuso entonces la existencia de distintas poblaciones leucémicas basadas en el fenotipo de las colonias obtenidas y la capacidad de generación de colonias secundarias, estableciéndose por primera vez una jerarquía funcional en la leucemia mieloide aguda (LMA) [revisado en<sup>(1)</sup>]. Esta heterogeneidad tumoral puede ser explicada mediante dos modelos mutuamente excluyentes: el modelo estocástico y el modelo jerárquico o determinista. En el modelo estocástico, la heterogeneidad se explica basada en factores extrínsecos e intrínsecos generados al azar y estos cambios no son permanentes. Sin embargo, en el modelo jerárquico, el tumor es una caricatura del de-

sarrollo del tejido sano donde las células madre mantienen las jerarquías de los tejidos normales. Aunque ambos modelos acomodan la existencia de células madre leucémicas (LSC, *leukemic stem cells*) funcionales, las implicaciones terapéuticas difieren según el modelo. En el modelo estocástico, las LSC surgen al azar y todas las células tumorales tienen el potencial de convertirse en ellas. Por lo tanto, sería necesario eliminar todas las células tumorales para erradicar las LSC. Sin embargo, en el modelo jerárquico, sólo una fracción definida de células tiene el potencial intrínseco de comportarse como LSC. De acuerdo con este último modelo, la eliminación de esta población supondría la involución de la masa tumoral y, eventualmente, su desaparición ya que las células leucémicas no LSC carecen de la capacidad de mantenimiento de la LMA.

### Identificación LSC

La primera evidencia directa de la existencia de LSC fue la identificación de una población minoritaria de células leucémicas capaces de recapitular la enfermedad humana en xenotrasplantes en ratón<sup>(2)</sup>. El grupo de Dick realizó experimentos pioneros para determinar si la jerarquía funcional observada en la hemopoyesis normal también se conservaba en los tumores sanguíneos. Estos estudios demostraron que en múltiples formas de LMA (salvo la leucemia promielocítica aguda), las células con capacidad de regeneración en ratones inmunosuprimidos estaban restringidas a una subpoblación definida por un fenotipo característico: CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>, fenotipo compartido con la población de HSC<sup>(3)</sup>. De hecho, el análisis fenotípico de las células leucémicas de los ratones trasplantados revelaba la regeneración del fenotipo heterogéneo observado en el paciente, indicando que las LSC mantenían el potencial de diferenciación. La habilidad para regenerar la LMA en trasplantes seriados demostraba la capacidad de auto-renovación de esta población. Estas observacio-

nes constituyeron la primera prueba experimental de que, en una enfermedad neoplásica en humanos, las poblaciones de células tumorales estaban organizadas de acuerdo a una jerarquía funcional similar al sistema de células madre de los tejidos sanos.

El desarrollo de nuevas cepas de ratón con una mayor inmunodeficiencia y el empleo de nuevas vías de inyección permitió demostrar que la actividad LSC también reside en la población CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> de algunos pacientes<sup>(4)</sup>, sugiriendo que el compartimiento de LSC es heterogéneo. De hecho, se han descrito LSC CD34<sup>+</sup><sup>(5)</sup> y poblaciones de LSC con plasticidad de linaje<sup>(6)</sup>. En los últimos años, se han identificado varios marcadores de superficie asociados a LSC como CD13, CD25, CD32, CD33, CD47, CD90, CD96, CD117, CD123, CLL-1 o TIM3<sup>(7)</sup>. Sin embargo, y como ocurre con CD34 y CD38, el fenotipo de las LSC no es uniforme ni entre pacientes ni en un solo paciente<sup>(7)</sup>.

### Características biológicas de las LSC

Las LSC se caracterizan por una capacidad ilimitada de auto-renovación. Evidencias experimentales han demostrado la primacía, en este proceso, de rutas de señalización imprescindibles durante el desarrollo y altamente conservadas como Bmi-1, Hox, Wnt, Hedgehog y Notch. Sin embargo, el grado de activación parece ser dependiente de contexto y oncogén, puesto que la señalización mayoritaria que dirige el proceso de auto-renovación es diferente según las aberraciones genómicas presentes en la LSC. HSC y LSC también comparten los mecanismos responsables de la resistencia a estímulos apoptóticos, la prevalencia del estado quiescente y la resistencia a multitudrogas. Aunque el mecanismo de auto-renovación y citoprotección es compartido, la actividad telomerasa está altamente reducida o ausente en LSC. En HSC, la actividad telomerasa contribuye al mantenimiento a largo plazo de la auto-renovación en un contexto altamente regulado. Sin embargo, la actividad telomerasa en LSC aparece disminuida y, como consecuencia de ello, los telómeros son más cortos. De hecho, se ha hipotetizado que el acortamiento acelerado de los telómeros puede predisponer a padecer una LMA [revisado en<sup>(8)</sup>].

Recientemente, se ha propuesto que las LSC pueden usar un mecanismo nuevo para evadir la inmunovigilancia basado en la expresión en superficie de CD47, una proteína de membrana reconocida por macrófagos y que inhibe la fagocitosis<sup>(9)</sup>. De hecho, en pacientes con LMA, la expresión de CD47 se correlaciona negativamente con la respuesta a la quimioterapia convencional<sup>(10)</sup>.

El perfil de expresión génica de las LSC es distinto al del resto de células leucémicas del paciente. Sin

embargo, conserva muchas similitudes con el patrón génico de las HSC y progenitores tempranos hematopoyéticos<sup>(11,12)</sup>. Desafortunadamente, las firmas génicas de LSC publicadas tienen una homología parcial, probablemente debido a diferencias en el método de aislamiento y a las variaciones entre pacientes<sup>(11-13)</sup>.

Las LSC migran a la médula ósea y residen en microambientes similares a los de las HSC. Las células estromales con las que interactúan protegen de la apoptosis inducida por quimioterapéuticos, potencialmente mediante la inducción en LSC de un estado de quiescencia. La interacción con el microambiente medular también es imprescindible para mantener el estado indiferenciado y la capacidad ilimitada de auto-renovación. La alteración de estas uniones supone la movilización de las LSC y una reducción en su viabilidad<sup>(14)</sup>.

### Evidencias clínicas de la existencia de LSC

La presencia de LSC así como la existencia de una firma génica en pacientes con LMA asociada a LSC se han relacionado tanto con enfermedad mínima residual como con un pronóstico adverso. La frecuencia de LSC al diagnóstico está relacionada con la capacidad de regeneración de la LMA en ratones inmunosuprimidos, la agresividad de la enfermedad en humanos<sup>(15,16)</sup> y la supervivencia libre de enfermedad<sup>(17,18)</sup>. De hecho, la cantidad relativa de LSC en el momento del diagnóstico predice la respuesta al tratamiento quimioterapéutico convencional<sup>(18)</sup> y tiene valor pronóstico<sup>(16,19)</sup>. Adicionalmente, la detección de LSC residuales en muestras de médula ósea en remisión predice la recaída en pacientes con LMA<sup>(18,20)</sup>. Aunque todos estos estudios demuestran la utilidad potencial de la detección de LSC en clínica para estratificar pacientes en los distintos grupos pronósticos, es necesario unificar los criterios de detección de LSC y validar estos resultados.

Los perfiles de expresión génica de LSC también han sido relacionados con el desarrollo clínico de la enfermedad. La expresión de una firma génica asociada a LSC al diagnóstico predice una menor supervivencia global, supervivencia libre de enfermedad y un mayor riesgo de recaída<sup>(11)</sup>. Esta firma génica es similar a la obtenida de HSC, y ambas predicen la supervivencia del paciente<sup>(12)</sup>.

### Implicación terapéutica

Aunque la supervivencia a largo plazo de los pacientes con LMA ha aumentado en las últimas décadas, los episodios de recaída siguen siendo frecuentes. De acuerdo con el modelo de células madre del cáncer, cualquier aproximación terapéutica que no erradique las LSC probablemente tendrá poco éxito. Aunque elimine la mayoría de los blastos leucémicos e induz-

ca la remisión temporal del tumor, no impedirá la regeneración de la enfermedad y la diseminación metastásica del mismo. Por lo tanto, se requieren nuevos tratamientos que afecten selectivamente a las LSC con una mínima toxicidad para las HSC. Debido a sus características de células madre, las LSC tienen una resistencia intrínseca a drogas, aunque los mecanismos responsables de la resistencia no han sido descritos extensamente. Un aspecto importante de la biología de las LSC es su plasticidad y la formación de subclones durante la evolución de la enfermedad. Por lo tanto, son necesarias mejoras en el tratamiento y es previsible que las nuevas terapias que actúen sobre LSC aumenten la tasa de curación, disminuyendo las recaídas.

Están siendo exploradas distintas aproximaciones experimentales con el objetivo de identificar nuevas drogas que maten selectivamente a las LSC. Se han desarrollado anticuerpos monoclonales que reconocen epítomos diferencialmente expresados en LSC (CD44, CD123, CD47) con éxito limitado en ensayos preclínicos y que están siendo investigados en ensayos clínicos<sup>(14)</sup>. Alternativamente, se podrían alterar rutas de señalización importantes para la iniciación y/o el mantenimiento de la LMA. Puesto que la señalización en LSC y HSC es similar<sup>(11,12)</sup>, es esperable que las potenciales drogas afecten ambas poblaciones. Otra aproximación que está siendo explorada es el bloqueo de la auto-renovación, ya sea vía inhibición directa o inducción de diferenciación, y que está obteniendo datos prometedores a nivel preclínico<sup>(14)</sup>. Puesto que las LSC residen en microambientes en la médula ósea, se están estudiando posibles vías de movilización de éstas de forma análoga a las HSC. La movilización de las LSC supondría la salida de quiescencia y la mayor sensibilidad a quimioterapéuticos convencionales. De momento, los resultados han sido dispares [revisado en<sup>(9)</sup>].

### Consideraciones finales

El descubrimiento de las LSC en los años 90 supuso el inicio de una nueva era en el diseño de fármacos contra la LMA. Aunque la hipótesis de las células madre del cáncer sigue en vigencia para la LMA, el impacto clínico es aún modesto. La falta de marcadores específicos de LSC que permitan el aislamiento de poblaciones homogéneas dificulta los estudios biológicos. Disponer de perfiles de expresión génica de poblaciones homogéneas permitiría determinar las rutas de señalización diferencialmente activadas e identificar mejores dianas terapéuticas. Universalizar el fenotipo de las LSC también podría ser importante para validar su valor clínico en diagnóstico y pronóstico. Aunque los primeros ensayos clínicos con fármacos anti-LSC se han iniciado, aún no se conoce su

efectividad. Aumentar el conocimiento de la biología de las LSC es imprescindible para desarrollar nuevas terapias que puedan conducir a la erradicación de la LMA.

### Bibliografía

- Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*. 2008 Dec 15;112(13):4793-807.
- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994 Feb 17;367(6464):645-8.
- Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997 Jul;3(7):730-7.
- Taussig DC, Miraki-Moud F, Anjos-Afonso F, Pearce DJ, Allen K, Ridler C, et al. Anti-CD38 antibody-mediated clearance of human repopulating cells masks the heterogeneity of leukemia-initiating cells. *Blood*. 2008 Aug 1;112(3):568-75.
- Taussig DC, Vargaftig J, Miraki-Moud F, Griessinger E, Sharrock K, Luke T, et al. Leukemia-initiating cells from some acute myeloid leukemia patients with mutated nucleophosmin reside in the CD34(-) fraction. *Blood*. 2010 Mar 11;115(10):1976-84.
- Risueno RM, Campbell CJ, Dingwall S, Levadoux-Martin M, Leber B, Xenocostas A, et al. Identification of T-lymphocytic leukemia-initiating stem cells residing in a small subset of patients with acute myeloid leukemic disease. *Blood*. 2011 Jun 30;117(26):7112-20.
- Horton SJ, Huntly BJ. Recent advances in acute myeloid leukemia stem cell biology. *Haematologica*. 2012 Jul;97(7):966-74.
- Felipe Rico J, Hassane DC, Guzman ML. Acute myelogenous leukemia stem cells: From Bench to Bedside. *Cancer Lett*. 2012 Jun 17.
- Jaiswal S, Jamieson CH, Pang WW, Park CY, Chao MP, Majeti R, et al. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell*. 2009 Jul 23;138(2):271-85.
- Majeti R, Chao MP, Alizadeh AA, Pang WW, Jaiswal S, Gibbs KD, Jr, et al. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell*. 2009 Jul 23;138(2):286-99.
- Gentles AJ, Plevritis SK, Majeti R, Alizadeh AA. Association of a leukemic stem cell gene expression signature with clinical outcomes in acute myeloid leukemia. *JAMA*. 2010 Dec 22;304(24):2706-15.
- Eppert K, Takenaka K, Lechman ER, Waldron L, Nilsson B, van Galen P, et al. Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nat Med*. 2011 Sep;17(9):1086-93.
- de Jonge HJ, Woolthuis CM, Vos AZ, Mulder A, van den Berg E, Kluin PM, et al. Gene expression profiling in the leukemic stem cell-enriched CD34+ fraction identifies target genes that predict prognosis in normal karyotype AML. *Leukemia*. 2011 Dec;25(12):1825-33.
- Lane SW, Scadden DT, Gilliland DG. The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities. *Blood*. 2009 Aug 6;114(6):1150-7.
- Pearce DJ, Taussig D, Zibara K, Smith LL, Ridler CM, Preudhomme C, et al. AML engraftment in the NOD/SCID assay reflects the outcome of AML: implications for our understanding of the heterogeneity of AML. *Blood*. 2006 Feb 1;107(3):1166-73.
- Cheung AM, Wan TS, Leung JC, Chan LY, Huang H, Kwong YL, et al. Aldehyde dehydrogenase activity in leukemic blasts defines a subgroup of acute myeloid leukemia with

- adverse prognosis and superior NOD/SCID engrafting potential. *Leukemia*. 2007 Jul;21(7):1423-30.
17. van Rhenen A, Feller N, Kelder A, Westra AH, Rombouts E, Zweegman S, et al. High stem cell frequency in acute myeloid leukemia at diagnosis predicts high minimal residual disease and poor survival. *Clin Cancer Res*. 2005 Sep 15;11(18):6520-7.
  18. Terwijn M, Feller N, van Rhenen A, Kelder A, Westra G, Zweegman S, et al. Interleukin-2 receptor alpha-chain (CD25) expression on leukaemic blasts is predictive for outcome and level of residual disease in AML. *Eur J Cancer*. 2009 Jun;45(9):1692-9.
  19. Ran D, Schubert M, Taubert I, Eckstein V, Bellos F, Jauch A, et al. Heterogeneity of leukemia stem cell candidates at diagnosis of acute myeloid leukemia and their clinical significance. *Exp Hematol*. 2012 Feb;40(2):155-65 e1.
  20. Gerber JM, Smith BD, Ngwang B, Zhang H, Vala MS, Morsberger L, et al. A clinically relevant population of leukemic CD34(+)CD38(-) cells in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2012 Apr 12;119(15):3571-7.



## Clinical decision making in acute myeloid leukemia based on the genetic disease profile

RICHARD F. SCHLENK, M.D.

Department of Internal Medicine III. University of Ulm (Germany)

### Introduction

Research in genomics has resulted in the rapid uncovering of the molecular pathogenesis of acute myeloid leukemia (AML). Considerable progress has been made in deciphering the molecular genetic and epigenetic basis of acute myeloid leukemia (AML) and in defining new diagnostic, prognostic and even more important predictive markers. The identification of the genetic determinants of response to standard but also to experimental treatment is increasingly used for patient counseling, to guide clinical decisions making, and for resource-efficient care provision at diagnosis, during consolidation treatment and follow-up as well as after relapse.

### Disease classification

Based on the revised WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues of 2008<sup>(1)</sup> seven entities are defined within the subgroup “AML with recurrent genetic abnormalities”. In this category AML characterized by specific fusions genes are grouped (Table 1) and “AML with t(8;21)(q22;q22); *RUNX1-RUNX1T1*” and “AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*” are considered as AML regardless of bone marrow blast counts. All other entities in this category require the presence of at least 20% bone marrow blasts at diagnosis based on morphology. Two provisional entities defined by the presence of gene mutations were added to this category, AML with mutated *NPM1*, and AML with mutated *CEBPA*. The category “AML with mutated *NPM1*” is by far the largest subgroup defined by genomics.<sup>(2-4)</sup> However, the association with cooperating genetic mutations, in particular *FLT3*-ITD seems to be age-dependent with a significantly higher incidence of the genotype *NPM1*mut/*FLT3*-ITDneg in older compared to younger patients.<sup>(2)</sup>

New insights have been provided for AML with mutated *CEBPA*. Several studies have convincingly

shown that AML with double mutant *CEBPA* (*CEBPA*Adm) can be distinguished from AML with single mutant *CEBPA* with respect to biological and prognostic features. The favorable prognostic impact of mutant *CEBPA* that was previously demonstrated in several studies, can be attributed to the subtype of AML with *CEBPA*Adm<sup>(5-8)</sup> and, additionally, not only to patients exhibiting a normal karyotype but also to patients with intermediate risk-II karyotypes<sup>(9)</sup> according to the ELN recommendations.<sup>(10)</sup> Therefore, several investigators have suggested on the one hand to restrict the provisional entity ‘AML with *CEBPA* mutations’ to those with biallelic mutations and on the other hand to broaden this category by including patients exhibiting a normal but also intermediate-II karyotypes.

A recent landmark publication by the *Cancer Genome Atlas Research Network* on the genomic and epigenomic landscapes of adult *de novo* AML reported results from next generation sequencing performed in 200 AML patients (n=50 whole-genome sequencing, n=150 whole-exome sequencing).<sup>(11)</sup> The investigators identified a number of 23 significantly mutated genes, and another 237 gene mutations found in two or more samples. The median number of mutated genes in coding sequences was 13 with a range from 0 to 51. The authors proposed a classification of gene mutations into 9 categories based on their biological function with 199 of the 200 analyzed patients having at least one mutation in one of these categories (Table 2).

### Prognostication of CR achievement and survival

The achievement of CR after induction therapy is a commonly accepted prerequisite for long-term survival and cure. CR rates vary widely in the different prognostic groups from 80% to 95% in the favorable risk group<sup>(10)</sup> to only 32.5% in patients with monosomal karyotype<sup>(12)</sup> and 31% in patients with

inv(3)<sup>(13)</sup>, both aberrations are categorized in the adverse risk group.<sup>(10)</sup> If no CR is achieved after induction therapy the probability of dying from AML is as high as 75% during the first year after diagnosis.<sup>(14)</sup>

Therefore, predicting response to induction therapy by means of the cytogenetic and molecular disease profile may help physicians and patients through the risks and benefits of intensive induction chemother-

**Table 1. Acute myeloid leukemia and related precursor neoplasms, and acute leukemias of ambiguous lineage (WHO 2008)**

**Acute myeloid leukemia with recurrent genetic abnormalities**

AML with t(8;21)(q22;q22); *RUNX1-RUNX1T1*  
 AML with inv(16)(p13.1;q22) or t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*  
 APL with t(15;17)(q22;q12); *PML-RARA*\*  
 AML with t(9;11)(p22;q23); *MLLT3-MLL*<sup>†</sup>  
 AML with t(6;9)(p23;q34); *DEK-NUP214*  
 AML with inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2); *RPN1-EVI1*  
 AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13;q13); *RBM15-MKL1*  
 Provisional entity: AML with mutated *NPM1*  
 Provisional entity: AML with mutated *CEBPA*

**Acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes<sup>‡</sup>**

**Therapy-related myeloid neoplasms<sup>§</sup>**

**Acute myeloid leukemia, not otherwise specified (NOS)**

Acute myeloid leukemia with minimal differentiation  
 Acute myeloid leukemia without maturation  
 Acute myeloid leukemia with maturation  
 Acute myelomonocytic leukemia  
 Acute monoblastic/monocytic leukemia  
 Acute erythroid leukemia  
     Pure erythroid leukemia  
     Erythroleukemia, erythroid/myeloid  
 Acute megakaryoblastic leukemia  
 Acute basophilic leukemia  
 Acute panmyelosis with myelofibrosis (syn.: acute myelofibrosis; acute myelosclerosis)

**Myeloid sarcoma (syn.: extramedullary myeloid tumor; granulocytic sarcoma; chloroma)**

**Myeloid proliferations related to Down syndrome**

Transient abnormal myelopoiesis (syn.: transient myeloproliferative disorder)  
 Myeloid leukemia associated with Down syndrome

**Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm**

**Acute leukemias of ambiguous lineage**

Acute undifferentiated leukemia  
 Mixed phenotype acute leukemia with t(9;22)(q34;q11.2); *BCR-ABL1*<sup>¶</sup>  
 Mixed phenotype acute leukemia with t(v;11q23); *MLL* rearranged  
 Mixed phenotype acute leukemia, B/myeloid, NOS  
 Mixed phenotype acute leukemia, T/myeloid, NOS  
 Provisional entity: Natural killer (NK) cell lymphoblastic leukemia/lymphoma

Adopted from reference 3; for a diagnosis of AML, a marrow blast count of  $\geq 20\%$  is required, except for AML with the recurrent genetic abnormalities t(15;17), t(8;21), inv(16) or t(16;16) and some cases of erythroleukemia.

\* Other recurring translocations involving *RARA* should be reported accordingly: eg, AML with t(11;17)(q23;q12)/ZBTB16-*RARA*; AML with t(11;17)(q13;q12); *NUMA1-RARA*; AML with t(5;17)(q35;q12); *NPM1-RARA*; or AML with *STAT5B-RARA* (the latter having a normal chromosome 17 on conventional cytogenetic analysis)

<sup>†</sup> Other translocations involving *MLL* should be reported accordingly: eg, AML with t(6;11)(q27;q23); *MLLT4-MLL*; AML with t(11;19)(q23;p13.3); *MLL-MLLT1*; AML with t(11;19)(q23;p13.1); *MLL-ELL*; AML with t(10;11)(p12;q23); *MLLT10-MLL*

<sup>‡</sup>  $>20\%$  blood or marrow blasts AND any of the following: previous history of myelodysplastic syndrome (MDS), or myelodysplastic/myeloproliferative neoplasm (MDS/MPN); myelodysplasia-related cytogenetic abnormality (see below); multilineage dysplasia; AND absence of both prior cytotoxic therapy for unrelated disease and aforementioned recurring genetic abnormalities; cytogenetic abnormalities sufficient to diagnose AML with myelodysplasia-related changes are:

- complex karyotype (defined as 3 or more chromosomal abnormalities)
- unbalanced changes: -7 or del(7q); -5 or del(5q); i(17q) or t(17p); -13 or del(13q); del(11q); del(12p) or t(12p); del(9q); idic(X)(q13);
- balanced changes: t(11;16)(q23;p13.3); t(3;21)(q26.2;q22.1); t(1;3)(p36.3;q21.1); t(2;11)(p21;q23); t(5;12)(q33;p12); t(5;7)(q33;q11.2); t(5;17)(q33;p13); t(5;10)(q33;q21); t(3;5)(q25;q34).

<sup>§</sup> Cytotoxic agents implicated in therapy-related hematologic neoplasms: alkylating agents; ionizing radiation therapy; topoisomerase II inhibitors; others.

<sup>¶</sup> *BCR-ABL1* positive leukemia may present as mixed phenotype acute leukemia, but should be treated as *BCR-ABL1* positive acute lymphoblastic leukemia.

**Table 2.** Categorization and frequency of gene mutations according to functional properties based on next-generation sequencing in 200 *de novo* AMLs (modified according to reference 11)

CATEGORY	FREQUENCY
<b>Transcription factor fusions</b>	<b>18%</b>
<i>PML-RARA</i> <i>CBFB-MYH11</i> <i>RUNX1-RUNX1T1</i> <i>PICALM-MLLT10</i>	
<b><i>NPM1</i> mutations</b>	<b>27%</b>
<b>Tumor suppressor genes</b>	<b>16%</b>
<i>TP53</i> <i>WT1</i> <i>PHF6</i>	
<b>DNA methylation</b>	<b>44%</b>
<i>DNMT3A</i> <i>DNMT3B</i> <i>DNMT1</i> <i>TET1</i> <i>TET2</i> <i>IDH1</i> <i>IDH2</i>	
<b>Activated signaling</b>	<b>59%</b>
<i>FLT3</i> <i>KIT</i> Other tyrosine kinases Serin-threonine kinases <i>KRAS/NRAS</i> <i>PTPs</i> (protein tyrosin phosphatases)	
<b>Myeloid transcription factors</b>	<b>22%</b>
<i>RUNX1</i> <i>CEBPA</i> Other myeloid transcription factors	
<b>Chromatin modifiers</b>	<b>30%</b>
<i>MLL</i> fusions <i>MLL-PTD</i> <i>NUP98-NSD1</i> <i>ASXL1</i> <i>EZH2</i> <i>KDM6A</i> other	
<b>Cohesin complex*</b>	<b>13%</b>
<b>Spliceosome complex<sup>#</sup></b>	<b>14%</b>
* <i>Cohesin</i> is a protein complex regulating the separation of sister chromatids during cell division (mitosis or meiosis)	
<sup>#</sup> <i>Spliceosome</i> is a complex of snRNA and protein subunits removing introns from a transcribed pre-mRNA (hnRNA) segment.	

apy. *NPM1* mutations, one of the most frequent gene mutations (25-35% of all adults with AML) <sup>(15)</sup> have consistently been reported as a favorable prognostic factor for CR achievement, with CR rates of 90% and higher in younger patients either as a single marker or as combined genotype, *NPM1*-mut/*FLT3*-ITDneg. <sup>(10,15)</sup> Of note, CR rates following intensive induction therapy in older patients with *NPM1* mutations are nearly as high as in younger patients with CR rates of 80% to 90%. <sup>(3,4)</sup> AML with *CEBPAdm* account for 3-6% of adult AML, the frequency decreases with increasing age. <sup>(2,3,5-9)</sup> In this subgroup of patients CR rates of 85% to 92% have been reported, however, these results are mainly based on younger adults.

*TP53* alterations including mutations and losses are found in about 70% of AML with complex karyotype. <sup>(16)</sup> *TP53* alterations predict for very low CR rates (less than 30%) and have been shown to be an independent poor prognostic factor among the subgroup of AML with complex karyotype.

Various types of postremission therapy including high dose cytarabine and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (alloHSCT) have been evaluated with the aim of preventing relapse and improving survival. While alloHSCT is considered as the PRT with the strongest antileukemic effect, the benefit of alloHSCT on survival may be compromised by non-relapse, treatment-related mortality. The European LeukemiaNet AML Working Party has proposed an integrated risk-adapted approach for patients in first CR taking into account: i. risk of relapse after intensive chemotherapy versus alloHSCT; ii. treatment-related mortality of alloHSCT; and iii. patient and transplant-specific parameters such as comorbidity, donor type, and age reflected by

HCT-CI and EBMT scores (Table 3).<sup>(17)</sup> According to this recommendation, AML with RUNX1-RUNX1T1 (only with pretreatment white blood cell count  $\leq 20$ /nl), CBFB-MYH11, NPM1mut/FLT3-ITDneg and CEBPAdm were grouped into the good-risk category, whereas AML with monosomal karyotype, abn(3q), and those with high EVI1 expression were grouped into the very poor risk category. For the two remaining categories in between (i.e., intermediate and poor risk) a combination of cytogenetics and response to initial chemotherapy are used for grouping.<sup>(17)</sup> Based on the integrated approach, alloHSCT represents the most appropriated postremission therapy in patients with low HCT-CI and EBMT scores in the categories intermediate, poor and very poor. However, the recommendations become more complex especially in the intermediate and poor risk group with rising HCT-CI and EBMT scores. Two major shortcomings of these recommendations are i) that several gene mutations with high incidences especially in the cat-

egories intermediate and poor (e.g. DNMT3A-mut, TET2-mut, IDH1/2-mut, RUNX1-mut, WT1-mut) are not integrated and, even more important, ii) the interaction of genetic aberrations are only poorly reflected.

### Prognostication in first relapse

About half of younger patients and 90% of older patients relapse and these relapses often appear to be associated with clonal genetic evolution. Whole-genome sequencing studies by Ding *et al.* have offered insights into the pathogenesis of relapse and demonstrated that i) the founding clone in the primary AML gains mutations and evolves into the relapse clone, and ii) a subclone of the founding clone survives initial therapy, gains additional mutations and expands at relapse.<sup>(18)</sup> Younger adults (age 16-49 years) who relapsed after intensive consolidation chemotherapy had a 55% chance of achieving a second CR with

**Table 3.** Patient-specific, integrated risk-based application of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in AML CR1\*

AML-risk Group**	AML Risk assessment, including response to induction-I	Risk of relapse following consolidation by		Prognostic scores for nonrelapse mortality that would indicate allogeneic HSCT as preferred consolidation		
		Chemo/ auto BSCT	alloHSCT	EBMT-score	HCT-CI score	NRM
Good	t(8;21) with WBC $\leq 20$ inv(16)/t(16;16) Mutated CEBPA (double mutated) Mutated NPM1 without FLT3-ITD Early first complete remission and no MRD	35-40%	15-20%	NA ( $\leq 1$ )	NA ( $<1$ )	10-15%
Intermediate	t(8;21) with WBC $>20$ Cytogenetically normal (or with loss of X and Y chromosomes), WBC count $\leq 100$ and early first complete remission (after first cycle of chemotherapy)	50-55%	20-25%	$\leq 2$	$\leq 2$	$<20$ -25%
Poor	Otherwise good or intermediate, but no complete remission after first cycle of chemotherapy Cytogenetically normal and WBC $>100$ Cytogenetically abnormal	70-80%	30-40%	$\leq 3/4$	$\leq 3/4$	$<30\%$
Very poor	Monosomal karyotype abn(3q26) High EVI1 expression	$>90\%$	40-50%	$\leq 5$	$\leq 5$	$<40\%$

\* The proposed patient-specific application of allogeneic HSCT in patients with AML in their first complete remission integrates the individual risks for relapse and nonrelapse mortality and aims for a DFS benefit of at least 10% for the individual patient compared with consolidation by a nonallogeneic HSCT approach.

† The categorization of AML is based on cytogenetic, molecular and clinical parameters (including WBC) into good, intermediate and (very) poor subcategories and is subject to continuing study and debate. Here, categories are arbitrarily presented according to the latest policy of the Dutch-Belgian Cooperative Trial Group for Hematology Oncology and Swiss Group for Clinical Cancer Research (HOVON-SAKK) consortium. Relapse percentages were derived from published reports.

‡ Includes response to first induction. Categorization requires one of the parameters indicated.

Abbreviations: AML, acute myeloid leukemia; EBMT, European Group For Blood and Marrow Transplantation; DFS, disease-free survival; EVI1, Ecotropic viral integration site 1, HCT-CI, hematopoietic cell transplantation comorbidity index; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; CEBPA, gene encoding CCAAT enhancer-binding protein  $\alpha$ ; FLT3, gene encoding fms-like tyrosine kinase receptor-3; ITD, internal tandem duplication; NA, not advocated; NPM1, gene encoding nuclear matrix protein; MRD, minimal residual disease; WBC, white blood cell count.

highest rates of 82% in the pretreatment favorable risk group comprising t(8;21), t(15;17), and inv(16).<sup>(19)</sup> In addition, relapsed patients exhibiting the pretreatment favorable genotype *NPM1*-mut/*FLT3*-ITDneg also had a high second CR rate of 66%, whereas relapsed patients exhibiting a *FLT3*-ITD at diagnosis only had a 35% second CR rate irrespective of an additional *NPM1* mutation. However, these data are based on a minority of AML patients due to the age restriction of 16 to 49 years and therefore the results cannot be generalized. In addition, clonal evolution may influence the probability to achieve a second CR which has been exemplarily shown by Krönke *et al.* in AML with *NPM1* mutations.<sup>(20)</sup> In 53 patients with AML exhibiting *NPM1* mutations at diagnosis who relapsed, five lost the *NPM1* mutation while maintaining the initially already coexisting *DNMT3A* mutation. Of note, two thirds of the patients with persistent *NPM1* mutation achieved a second CR, while none of the five patients who lost *NPM1* responded to salvage therapy. These data clearly show that the second CR rate decreases in AML with *NPM1* mutations by 25% to 30% compared to first CR rate even if the main genotype, i.e. mutated *NPM1*, remains stable. To date, genotypes with high second CR rates above 70% at least in younger patients (age ≤ 60 years) are AML with *CEBPA*adm<sup>(9)</sup> and AML with inv(16)/t(16;16).<sup>(21,22)</sup>

## Conclusion

Progress in deciphering the molecular pathogenesis of AML and the identification of the genetic determinants of response to treatment have been impressive and translation of these findings into the clinical decision making has been increasing in recent years.

## References

- Arber DA, Vardiman JW, Brunning RD, et al. Acute myeloid leukaemia with recurrent genetic abnormalities. In: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Fourth Edition. Edited by Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J., Vardiman, J.W (editors). Geneva, Switzerland. WHO PRESS 2008
- Mrózek K, Marcucci G, Nicolet D, et al. Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2012;30(36):4515-23.
- Schlenk RF, Döhner K, Kneba M, et al. Gene mutations and response to treatment with all-trans retinoic acid in elderly patients with acute myeloid leukemia. Results from the AMLSG Trial AML HD98B. *Haematologica.* 2009;94(1):54-60.
- Becker H, Marcucci G, Maharry K, et al. Favorable prognostic impact of *NPM1* mutations in older patients with cytogenetically normal de novo acute myeloid leukemia and associated gene- and microRNA-expression signatures: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol.* 2010;28(4):596-604.
- Sanz MA, Grimwade D, Tallman MS, et al. Guidelines on the management of acute promyelocytic leukemia: Recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood.* 2008;113:1875-91.
- Wouters BJ, Lowenberg B, Erpelinck-Verschueren CA, van Putten WL, Valk PJ, Delwel R. Double *CEBPA* mutations, but not single *CEBPA* mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood.* 2009;113(13):3088-3091.
- Dufour A, Schneider F, Metzeler KH, et al. Acute myeloid leukemia with biallelic *CEBPA* gene mutations and normal karyotype represents a distinct genetic entity associated with a favorable clinical outcome. *J Clin Oncol.* 28(4):570-577.
- Green CL, Koo KK, Hills RK, Burnett AK, Linch DC, Gale RE. Prognostic significance of *CEBPA* mutations in a large cohort of younger adult patients with acute myeloid leukemia: impact of double *CEBPA* mutations and the interaction with *FLT3* and *NPM1* mutations. *J Clin Oncol.* 2010;28(16):2739-2747.
- Taskesen E, Bullinger L, Corbacioglu A, et al. Prognostic impact, concurrent genetic mutations, and gene expression features of AML with *CEBPA* mutations in a cohort of 1182 cytogenetically normal AML patients: further evidence for *CEBPA* double mutant AML as a distinctive disease entity. *Blood.* 2011;117(8):2469-75.
- Schlenk RF, Taskesen E, van Norden Y, et al. The value of vlogeneic and autologous hematopoietic stem cell transplantation in prognostically favorable acute myeloid leukemia with double mutant *CEBPA*. *Blood* 2013; accepted for publication
- Döhner H, Estey EH, Amadori S, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood.* 2010;115:453-474.
- Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 2013;368(22):2059-74.
- Kayser S, Zucknick M, Döhner K, et al. Monosomal karyotype in adult acute myeloid leukemia: prognostic impact and outcome after different treatment strategies. *Blood.* 2012;119(2):551-8.
- Lugthart S, Gröschel S, Beverloo HB, et al. Clinical, molecular, and prognostic significance of WHO type inv(3)(q21q26.2)/t(3;3)(q21;q26.2) and various other 3q abnormalities in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2010;28(24):3890-8.
- Schlenk RF, Benner A, Hartmann F, et al. Risk-adapted postremission therapy in acute myeloid leukemia: results of the German multicenter AML HD93 treatment trial. *Leukemia.* 2003;17(8):1521-8.
- Marcucci G, Haferlach T, Döhner H. Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. *J Clin Oncol.* 2011;29(5):475-486.
- Rücker FG, Schlenk RF, Bullinger L, et al. TP53 alterations in acute myeloid leukemia with complex karyotype correlate with specific copy number alterations, monosomal karyotype, and dismal outcome. *Blood.* 2012;119(9):2114-21.
- Cornelissen JJ, Gratwohl A, Schlenk RF, et al. The European LeukemiaNet AML Working Party consensus statement on allogeneic HSCT for patients with AML in remission: an integrated-risk adapted approach. *Nat Rev Clin Oncol.* 2012;9(10):579-90.
- Ding L, Ley TJ, Larson DE, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature.* 2012;481(7382):506-10.
- Burnett AK, Goldstone A, Hills RK, et al. Curability of patients with acute myeloid leukemia who did not undergo transplantation in first remission. *J Clin Oncol.* 2013;31(10):1293-301.

20. Krönke J, Bullinger L, Teleanu V, et al. Clonal evolution in relapsed NPM1 mutated acute myeloid leukemia. *Blood* 2013 May 23. [Epub ahead of print]
21. Schlenk RF, Benner A, Krauter J, et al. Individual patient data-based meta-analysis of patients aged 16 to 60 years with core binding factor acute myeloid leukemia: a survey of the German Acute Myeloid Leukemia Intergroup. *J Clin Oncol*. 2004 Sep 15;22(18):3741-50.
22. Marcucci G, Mrózek K, Ruppert AS, et al. Prognostic factors and outcome of core binding factor acute myeloid leukemia patients with t(8;21) differ from those of patients with inv(16): a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol*. 2005 Aug 20;23(24):5705-17.

## Papel de la enfermedad residual en el algoritmo terapéutico de la leucemia aguda linfoblástica

JOSEP-MARÍA RIBERA SANTASUSANA, MIREIA MORGADES, OLGA GARCÍA, ALBERT ORIOL, JORDI JUNCÀ, MONTSERRAT BATLLE, BLANCA XICOY, JUAN-MANUEL SANCHO, CHRISTELLE FERRÁ, SUSANA VIVES, MIRIAM MORENO, ALONSO FLORES, JORDI RIBERA, EULÀLIA GENESCÀ, ISABEL GRANADA, LURDES ZAMORA, FUENSANTA MILLÀ, EVARIST FELIU  
*Servicio de Hematología Clínica. ICO-Hospital Germans Trias i Pujol. Institut de Recerca Josep Carreras. Badalona. Universidad Autónoma de Barcelona*

### Resumen

En las últimas 2 décadas se han efectuado diversos avances en el tratamiento de la leucemia aguda linfoblástica (LAL). Entre ellos destaca el análisis del valor pronóstico de la enfermedad residual (ER) y su incorporación a las decisiones terapéuticas. Se están efectuando grandes esfuerzos para estandarizar las diversas técnicas de medición de la ER (PCR para cuantificación de los reordenamientos de las Ig o del receptor T, PCR cuantitativa en tiempo real para medición de transcritos de genes de fusión y citofluorometría multiparamétrica). Diversos estudios han demostrado que la evaluación de la ER en la LAL infantil y del adulto se correlaciona significativamente con los resultados clínicos. La detección de la ER no sólo es particularmente útil para la evaluación de la respuesta al tratamiento, sino también para la evaluación temprana de la recaída. Por lo tanto, la ER ocupa un lugar destacado en muchos estudios como una herramienta de decisión de la estrategia terapéutica y existen evidencias crecientes de que la ER podría sustituir a los criterios de estratificación convencionales, al menos en la LAL sin cromosoma Filadelfia. En la actualidad la mayoría de los protocolos de LAL en adultos siguen un enfoque de 2 etapas, con una primera asignación de tratamiento según los criterios pronósticos clásicos y una segunda estratificación basada en la ER.

### Introducción

El pronóstico de la leucemia aguda linfoblástica (LAL) depende de la combinación de varios factores, como las propiedades de las células leucémicas (lesiones genéticas, capacidad proliferativa, mecanismos de resistencia a fármacos), factores del huésped (edad, estado general, enfermedades concomitantes, cumplimiento del tratamiento, farmacodinamia y farmacogenética) y el tipo y la respuesta al tratamiento. Ello ha permitido establecer una serie de factores de

riesgo convencionales (edad, recuento de leucocitos, características inmunofenotípicas y citogenéticas, así como aberraciones moleculares) que proporcionan la base para la estratificación del riesgo inicial en los protocolos de tratamiento actuales. Cabe reconocer, sin embargo, que la estratificación del tratamiento en función de estos factores ha tenido un impacto limitado en la supervivencia de los adultos con LAL, ya que la recaída sigue siendo el principal problema clínico. La causa de estas recaídas es la persistencia de niveles variables de enfermedad residual (ER) tras el tratamiento. Varios estudios han demostrado que la detección de ER es un parámetro de riesgo independiente de gran relevancia clínica en la LAL, tanto en el diagnóstico como en la recaída<sup>(1-3)</sup>. En consecuencia, en un número cada vez mayor de protocolos de tratamiento se emplea la ER como una herramienta para la estratificación terapéutica. Además, la ER también se utiliza para la predicción de recaídas y para iniciar un tratamiento de rescate anticipado. Por lo tanto, la ER no sólo es un factor pronóstico de primer orden, sino que ya empieza a poner en cuestión la definición tradicional de remisión y recaída.

En esta ponencia se discutirán brevemente las metodologías de estudio de la ER, y se analizará su valor pronóstico, así como los resultados de los estudios que emplean la ER como guía para la toma de decisiones terapéuticas.

### Pros y contras de las diferentes técnicas de estudio de la enfermedad residual

#### Citometría de flujo multiparamétrica

La evaluación de la ER mediante citofluorometría (CFM) se basa en la detección de inmunofenotipos asociados a las células leucémicas que se pueden utilizar para distinguirlas de las células hematopoyéticas normales. Estos inmunofenotipos asociados a leucemias consisten sobre todo en patrones aberrantes de expresión fenotípica y asincronía en el

estado madurativo, con sobreexpresión o infraexpresión fenotípica. Usando citometría de flujo de 4 colores, pueden identificarse fenotipos aberrantes en el 90% de las LAL de precursores B y en más del 95% de los pacientes con LLA-T, con límites de detección de  $10^{-3}$ - $10^{-4}$ (4-9).

La principal ventaja de la CFM es su rapidez, lo que es especialmente útil cuando se necesitan resultados de ER rápidamente para decidir el tratamiento. Además, la CFM permite detectar la expresión de marcadores útiles para el empleo de nuevos tratamientos, como los modernos anticuerpos monoclonales. Un problema potencial resulta de las similitudes entre los linfoblastos leucémicos y los precursores linfoides en diversas fases de regeneración, o con las alteraciones en la expresión antigénica en los blastos inducidas por la quimioterapia, en especial durante la inducción, y relacionadas sobre todo con los glucocorticoides(10-13). Por lo tanto, la interpretación de la ER mediante CFM requiere un profundo conocimiento de los patrones de expresión de los precursores linfoides benignos y las células leucémicas en las diferentes fases de tratamiento y, cuando implique decisiones terapéuticas dentro de protocolos clínicos, debería determinarse de forma centralizada en laboratorios de referencia, aunque la CFM esté ampliamente disponible en muchos centros. Además, se necesita una cuidadosa estandarización de la técnica para la comparación de resultados en estudios multicéntricos(14-18). Por otra parte, la metodología y la sensibilidad de la CFM están mejorando con el empleo de más colores ( $\geq 8$ ), la inclusión de nuevos marcadores, posiblemente más específicos para las células leucémicas, y el desarrollo de nuevos software para el análisis automatizado más rápido y fácil(19-21).

#### **Análisis por PCR de los reordenamientos de los genes de las Ig y del receptor T**

Los reordenamientos de los genes de las Ig o del receptor de células T (RCT) son alteraciones específicas de cada leucemia en cada individuo, y su caracterización es posible en la mayoría (> 95%) de casos de LAL de línea B o T. La cuantificación de estos reordenamientos se lleva a cabo mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RQ-PCR)(21,22). La sensibilidad se determina específicamente para cada ensayo y, en general, llega a  $1 \times 10^{-4}$ - $1 \times 10^{-5}$ , que es 0,5-1 logaritmo más alta que la obtenida mediante CFM.

El estudio de la ER basado en el ADN está muy estandarizado. Además, el empleo de ADN facilita el envío y el almacenamiento de muestras, así como los análisis retrospectivos. Sin embargo, la evolución clonal de los genes de Ig/RCT puede dar lugar a falsos negativos(23,24). Por tanto, se recomienda el uso de al menos 2 marcadores independientes(25). Además, el

método es laborioso y necesita la caracterización inicial de los reordenamientos Ig/RCT en cada paciente con un panel de diferentes reacciones de PCR y secuenciación. Sin embargo, los recientes avances en la tecnología de secuenciación acelerarán este proceso en un futuro cercano(26,27).

#### **Análisis por PCR de los transcritos de fusión**

Los transcritos de fusión de genes específicos de leucemia constituyen un objetivo ideal para la detección de ER porque están vinculados con el proceso oncogénico y son por lo tanto altamente específicos. Sin embargo, en la práctica sólo unos pocos transcritos (principalmente translocaciones *MLL*(38) y *SIL-TAL1*) se analizan en el nivel de ADN, mientras que el empleo más extendido es la cuantificación de transcritos aberrantes de ARNm de *BCR-ABL* en la LAL Ph+. Las ventajas de la RQ-PCR en la LAL Ph+ consisten en su alta sensibilidad ( $1 \times 10^{-6}$ ) y la amplia experiencia en ensayos de PCR de *BCR-ABL*. Un punto crucial es la calidad de la muestra, con riesgo de degradación del ARN si el intervalo entre la extracción de la muestra y el estudio es largo. Además, la falta de normalización de la extracción de ARN, de la síntesis de ADNc, la selección de los genes control y la variación en la forma de efectuar los análisis cuantitativos de RT-PCR pueden dar lugar a diferencias sustanciales en los resultados, con posibilidad de falsos negativos. Asimismo, pueden existir falsos positivos (por contaminación cruzada, por ejemplo). Se están realizando esfuerzos para estandarizar la metodología para permitir una mejor comparabilidad de los resultados de la PCR en los diferentes ensayos clínicos(28).

#### **Principales aplicaciones del estudio de la enfermedad residual en la leucemia aguda linfoblástica del adulto**

Las dos principales aplicaciones de la ER en la LAL son: la evaluación de la respuesta al tratamiento inicial para la definición de los grupos de riesgo basados en ER y el seguimiento posterior de los pacientes en remisión para detectar recaída a nivel de ER y permitir un tratamiento de rescate preventivo(29).

#### **ERM para la evaluación inicial de la remisión**

La aplicación más importante de la ER es la evaluación de una forma sensible de la eficacia del tratamiento en pacientes que han logrado una remisión completa (RC) morfológica, lo que permite refinar así la estratificación del riesgo efectuada al inicio. Al igual que en la LAL infantil en adultos también se ha demostrado que la cinética de la ER inicial es altamente predictiva de la eficacia del tratamiento.



### LAL Ph-negativa

Diversos estudios han demostrado el valor pronóstico independiente de la ER en adultos con LAL Ph-negativa, ya sea mediante RQ-PCR para Ig/RCT o CFM<sup>(1-4,30-34)</sup>. Asimismo, diferentes grupos europeos han objetivado que la persistencia de la ER medida en diferentes momentos entre 1 y 6 meses después del diagnóstico se asocia a mal pronóstico. Además, en algunos estudios se identificó un pequeño subgrupo de pacientes con un aclaramiento muy rápido (ER indetectable a las 2 semanas de tratamiento) que se asociaba a un excelente pronóstico. El estudio más amplio en adultos con LAL lo ha llevado a cabo el grupo alemán GMALL, en el que se analizó la ER en pacientes con LAL Ph-negativa de riesgo estándar (RE, n = 434) y alto riesgo (AR, n = 146)<sup>(32)</sup>. La respuesta molecular completa después de la inducción y/o consolidación-1 se asoció a un buen pronóstico, independientemente de los factores de riesgo basales. De hecho, la ER fue el único parámetro con impacto pronóstico significativo en el análisis multivariante. La única diferencia entre los pacientes de RE y de AR fue la proporción de enfermos que alcanzaron una respuesta molecular completa (RMC, definida por ER < 10<sup>-4</sup>), que fue un 20% inferior en los pacientes de AR.

### LAL Ph-positiva

La introducción de los inhibidores de tirosín-cinasa ha cambiado sustancialmente los resultados del tratamiento y la cinética de la ER en la LAL Ph+. Con todo, el valor pronóstico de la ER ofrece resultados discordantes<sup>(35-39)</sup>. En algunos estudios la reducción significativa del número de transcritos de *BCR-ABL* tras la inducción constituyó el factor pronóstico más potente para la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y la supervivencia global (SG). Por el contrario, otros estudios no han demostrado una asociación clara entre la respuesta molecular tras la inducción y el pronóstico, sugiriendo que el riesgo de recaída puede depender de factores no relacionados con la respuesta inicial al tratamiento (por ejemplo, la existencia en el momento del diagnóstico de subclones con mutaciones que confieran resistencia al tratamiento)<sup>(39)</sup>.

### Seguimiento de los pacientes en remisión

Una segunda aplicación de la ER es la monitorización posterior a la remisión de pacientes que alcanzaron RMC, con el fin de detectar tempranamente una recaída inminente.

### LAL Ph-negativa

El grupo alemán GMALL<sup>(40)</sup> fue el primero en demostrar que la recaída molecular (definida como la repa-

rición de ER cuantificable a nivel molecular) se seguía irremisiblemente de una recaída clínica, con intervalo de tiempo medio de 4,1 meses, hecho que se demostró con posterioridad en una serie más amplia de pacientes del mismo grupo<sup>(32)</sup>.

### LAL Ph-positiva

Yanada *et al.* también confirmaron la relación entre la recaída molecular y la ulterior recaída clínica en pacientes con LAL Ph+ tratados con quimioterapia e imatinib<sup>(38)</sup>. En un estudio prospectivo de 100 pacientes adultos con LLA Ph+, 29 presentaron elevación de ER estando en RC morfológica. Doce de los 13 que no recibieron un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (aloTPH) experimentaron una recaída, mientras que sólo 3 de los 16 pacientes trasplantados recayeron. Los autores llegaron a la conclusión de que un aumento en la ER es predictiva de una recaída posterior, pero los pacientes pueden ser rescatados con éxito con un aloTPH.

---

## La enfermedad residual como base para intervenciones terapéuticas

### Estratificación del tratamiento según la ER en fases iniciales

El objetivo de la determinación de la ER en fases tempranas del tratamiento de la LAL persigue ajustar la intensidad del mismo con el objetivo final de mejorar el resultado en los pacientes con alto riesgo molecular (ARM) y reducir la toxicidad en pacientes de bajo riesgo molecular (BRM) sin empeorar su pronóstico.

Diversos estudios clínicos en adultos con LAL emplean la ER para la estratificación del tratamiento. El estudio PETHEMA ALL-AR-03<sup>(30)</sup> incluye adultos con LAL de AR, Ph-negativas y utiliza una estrategia mixta: la respuesta citológica temprana (< 10% de blastos en medula ósea al día 14 de la inducción) y el nivel de ER (< 5 × 10<sup>-4</sup>) después de la consolidación temprana para definir los pacientes de riesgo molecular estándar, a los que no se efectuó un aloTPH en primera RC sino que recibieron quimioterapia de consolidación tardía y mantenimiento. Por el contrario, los pacientes con una lenta respuesta citológica y/o ER > 5 × 10<sup>-4</sup> después de la consolidación temprana se asignaron a aloTPH como estrategia de consolidación. Los resultados finales indican que la supresión del aloTPH en los pacientes con factores pronósticos basales desfavorables pero con buena dinámica de eliminación de ER no parece interferir en su pronóstico. La ER fue el único factor pronóstico en estos pacientes, tanto para la obtención de la RC como para la duración de la misma y la SG.

En el estudio GMALL 03.07, los pacientes con ER  $> 10^{-4}$  después de la inducción (día 71) y/o primera consolidación (semana 16) se asignaron al grupo de alto riesgo molecular (ARM)<sup>(61)</sup> y se asignaron a recibir aloTPH. Así, 120 de los 504 pacientes evaluados (24%) fueron asignados al grupo de ARM (89 de ellos tenían criterios basales de RE y 31 de AR)<sup>(32)</sup>. En el 47% de estos pacientes el TPH se realizó en primera RC, con una frecuencia de realización de TPH significativamente mayor en los pacientes de AR (71% frente a 39%,  $P < 0,002$ ). La probabilidad de RC a los 5 años fue significativamente mayor en los pacientes que recibieron un TPH en función de la respuesta molecular que en los no trasplantados ( $66\% \pm 7\%$  frente a  $12\% \pm 5\%$ ,  $P < 0,0001$ ), lo que también se tradujo en una SG a los 5 años más prolongada ( $54\% \pm 8\%$  frente a  $33\% \pm 7\%$ ,  $P = 0,06$ ).

El Northern Italy Leukemia Study Group (NILG) diseñó un protocolo de tratamiento orientado en función de la ER para adultos con LAL sin t(4;11) ni t(9;22)<sup>(4)</sup>. Los pacientes de ARM (definido como ER  $> 10^{-4}$  antes del sexto ciclo de inducción-consolidación y antes del ciclo 8 de consolidación) se asignaron a TPH alogénico (o autogénico si el anterior no se podía efectuar), mientras que los pacientes con ER negativa (BRM) recibieron tratamiento de mantenimiento estándar, independientemente de los factores de riesgo basales. La probabilidad de SLE a 4 años fue del 76% en los pacientes de BRM frente a sólo el 24% en el grupo de ARM a pesar de que éstos recibieran un TPH.

#### **Tratamiento anticipado en caso de persistencia o reaparición de la ER (recaída molecular)**

##### *LAL Ph-negativa*

La evaluación de la ER también se utiliza para el tratamiento anticipado en caso de recaída molecular sin evidencia de enfermedad visible. En el estudio GMALL 03/07<sup>(32)</sup>, 10 de 34 pacientes en primera RC que presentaron recaída molecular durante el seguimiento recibieron un alo-TPH. La probabilidad de RC a los 3 años fue del  $80\% \pm 18\%$  en comparación con  $5\% \pm 5\%$  en los pacientes no trasplantados.

##### *LAL Ph-positiva*

En la LAL Ph-positiva, el seguimiento de la ER se utiliza principalmente para optimizar el tratamiento post-TPH. El grupo GMALL demostró nuevamente que el tratamiento anticipado con imatinib tras la recaída molecular post-TPH disminuía la probabilidad de recaída<sup>(41)</sup>, con obtención de nueva remi-

sión molecular en 15 de 29 pacientes (52%), la cual se asoció a una alta probabilidad de RC continuada en el grupo de pacientes respondedores. Por contra, la persistencia de ER 6-10 semanas después del inicio del tratamiento anticipado con imatinib comportó una recaída rápida en todos los pacientes. Por tanto, la administración de imatinib tras el TPH podría prevenir la recaída molecular y clínica, pero la pauta de administración y su impacto en el pronóstico no están aclarados. En un estudio prospectivo aleatorizado, el grupo GMALL comparó la tolerancia y la eficacia de dos opciones de administración de imatinib post-TPH: profiláctica ( $n = 26$ ) o tras la detección de ER ( $n = 29$ )<sup>(42)</sup>. La pauta profiláctica redujo significativamente la incidencia de recaída molecular post-TPH (40% frente a 69%,  $p = 0,046$ ), con unas medianas de duración de la negatividad de *BCR-ABL* de 26,5 y 6,8 meses, respectivamente ( $p = 0,065$ ). La supervivencia post-TPH a 5 años fue elevada en ambos grupos (80% y 74,5%), a pesar de una alta frecuencia de discontinuación prematura de imatinib debido a baja tolerancia. De nuevo, se comprobó que la probabilidad de recaída fue significativamente mayor en los pacientes que positivizaron la ER tras el TPH. Por tanto, la administración de imatinib post-TPH resulta en una baja tasa de recaídas, remisiones duraderas y un excelente pronóstico independientemente de si se administra profilácticamente o tras detección de enfermedad a nivel molecular.

Los pacientes en recaída molecular o con persistencia de ER medible (que inevitablemente se sigue de recaída a nivel clínico si no se actúa rápido) pueden beneficiarse del empleo de nuevos fármacos de forma anticipada. Así, en un ensayo clínico en fase II desarrollado en el grupo GMALL se administró el anticuerpo monoclonal biespecífico blinatumomab (antiCD19 y antiCD3) en monoterapia en enfermos en RC morfológica pero con persistencia de niveles elevados de ER ( $> 1 \times 10^{-4}$ ) o en recaída molecular después del final de la primera consolidación<sup>(43)</sup>. Dieciséis de los 20 pacientes evaluables (15 pacientes con persistencia de ER y 5 pacientes con recaída molecular) negativizaron la ER tras un ciclo de blinatumomab. Doce de los 16 pacientes que respondieron nunca habían logrado negativizar la ER. La probabilidad de supervivencia libre de recidiva a un año para este grupo de pacientes fue del 78%. Ocho de estos pacientes recibieron un aloTPH tras el blinatumomab, sin mortalidad relacionada con el tratamiento y 7 pacientes no recibieron ningún otro tratamiento de consolidación. Hasta el momento no se han observado diferencias en la supervivencia entre ambos grupos de pacientes. En la actualidad se está llevando a cabo un estudio internacional para corroborar estos resultados.

## Frecuencia, momentos óptimos y metodología para determinación de la enfermedad residual

No existe un consenso sobre qué momentos son los óptimos para la evaluación de la ER y cuál debe ser la frecuencia de monitorización. De hecho, en una conferencia de consenso efectuada en el año 2008 se concluyó que estos momentos deben definirse para cada protocolo específico<sup>(25)</sup>. Con todo, pueden establecerse algunas normas generales.

### LAL Ph-negativa

En La LAL Ph-negativa la evaluación postinducción-consolidación (tras 2-4 meses de tratamiento) parece ser el momento más crucial, ya que permitirá evaluar la respuesta al tratamiento inicial y efectuar la estratificación del riesgo en base a la ER. La evaluación temprana durante la inducción (a las 2 semanas del tratamiento) también puede ser interesante, ya que los pacientes con un aclaramiento muy rápido parecen tener un pronóstico muy bueno. Está menos establecida cuál debe ser la frecuencia de determinación de ER durante el seguimiento, para identificar una recaída temprana. Una opción válida podría ser la determinación a intervalos de 3 meses durante 3 años, ya que la mayoría de las recaídas clínicas tienen lugar dentro de este tiempo y el intervalo medio entre la recaída molecular y la clínica es de alrededor de 4 meses.

### LAL Ph-positiva

En la era de los inhibidores de tirosín-cinasa el valor de la ER al final de la inducción es más limitado que en la LAL Ph-. Por contra, la ER tiene un gran valor para el seguimiento de estos pacientes tras la RC morfológica. Un punto clave parece ser el anterior al TPH, ya que el resultado del mismo varía en función del nivel de ER pretrasplante. Asimismo, es de suma importancia la evaluación post-TPH, sobre todo si no se opta por administrar tratamiento con inhibidores de tirosín-cinasa de forma sistemática. Cabe recordar que en la LAL Ph+ el intervalo entre la recaída molecular y la clínica es de sólo 2-3 meses. Por lo tanto, se recomienda que la frecuencia del estudio de la ER sea mayor que en la LAL Ph-negativa, probablemente cada mes.

Las comparaciones entre los resultados de la ER obtenidos por diferentes metodologías han demostrado que las diferentes técnicas no pueden ser consideradas totalmente intercambiables<sup>(5-9)</sup>. Por tanto en cada protocolo debe escogerse una técnica determinada y mantenerla durante toda su vigencia. Por lo tanto, la elección del método de detección de ER en un determinado protocolo debe estar guiada por la pregun-

ta a responder, la experiencia en el estudio de la ER, la tecnología disponible, la logística y la planificación del tratamiento de acuerdo a los resultados de la ER.

## ¿Puede sustituir la enfermedad residual a los factores pronósticos basales?

Durante las últimas 3 décadas, el tratamiento de los pacientes adultos con LAL se ha basado en los factores pronósticos presentes en el momento del diagnóstico (tratamiento adaptado al riesgo) y la pregunta fundamental era si se debían trasplantar (aloTPH o autoTPH) todos los pacientes o sólo el subgrupo de mal pronóstico. Más recientemente se ha demostrado el beneficio terapéutico de los protocolos de inspiración pediátrica en los adultos jóvenes, con un límite de edad que oscila entre los 30 y los 45 años según las series. También se han segregado subgrupos de pacientes con tratamientos específicos, como la LAL Ph+ (con la introducción de los inhibidores de tirosín-cinasa) o la LAL B madura (con la quimioterapia específica y anticuerpos monoclonales anti-CD20), a los que pueden sumarse otros subgrupos conforme se disponga de nuevos agentes terapéuticos.

La ER mide directamente la quimiosensibilidad de la LAL en cada paciente. No es de extrañar, por tanto, que en el momento actual se la reconozca como el factor pronóstico independiente más importante en la LAL, que ha reemplazado a los demás factores de riesgo en algunos estudios, por lo menos en la LAL Ph-negativa. Asimismo, los estudios prospectivos sobre tratamiento basado en la ER también indican que esta aproximación es factible y segura y el aloTPH puede evitarse en los pacientes con LAL Ph-negativa con buen aclaramiento de la ER (bajo riesgo molecular). Todo ello abogaría por emplear la ER como único criterio de estratificación del tratamiento en la LAL del adulto, prescindiendo de los factores pronósticos basales<sup>(44)</sup>.

Sin embargo, los resultados de la ER no son extrapolables entre los diversos estudios, las técnicas no están absolutamente estandarizadas, los momentos óptimos para la evaluación no están totalmente definidos, el umbral de ER no es homogéneo en todos los estudios ni en los diversos subtipos de LAL y la ER no puede determinarse en todos los pacientes, bien sea por motivos técnicos o logísticos. También hay que reconocer que no existe ningún estudio donde se compare de forma aleatorizada el tratamiento basado en la ER (p. ej.: aloTPH frente a no aloTPH en adultos con LAL de bajo riesgo molecular). Todas las anteriores razones indican que por el momento la ER no debe sustituir al resto de los factores pronósticos basales sino complementarlos, ya que constituye una excelente técnica para orientar el tratamiento dentro de protocolos específicos<sup>(44)</sup>.

## Consideraciones finales

Los datos publicados sobre la evaluación de la ER en la LLA del adulto han demostrado una fuerte correlación entre la respuesta a nivel de ER y los resultados del tratamiento, así como el valor pronóstico negativo que tiene la reaparición de la ER para la recaída hematológica. Aunque la ER no sustituirá por el momento a los factores de riesgo basales, ayudará a optimizar la secuencia de tratamiento, y probablemente la respuesta a nivel de ER sea un parámetro adicional de primer orden para la evaluación de respuesta en los protocolos de tratamiento, como lo son la tasa de RC, la duración de la RC, la SG o la SLE.

## Bibliografía

- Bassan R, Spinelli O, Oldani E, et al. Improved risk classification for risk-specific therapy based on the molecular study of minimal residual disease (MRD) in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood*. 2009;113(18):4153-4162.
- Brüggemann M, Raff T, Flohr T, et al. Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2006;107(3):1116-1123.
- Mortuza FY, Papaioannou M, Moreira IM, et al. Minimal residual disease tests provide an independent predictor of clinical outcome in adult acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2002;20(4):1094-1104.
- Vidriales MB, Perez JJ, Lopez-Berges MC, et al. Minimal residual disease in adolescent (older than 14 years) and adult acute lymphoblastic leukemias: early immunophenotypic evaluation has high clinical value. *Blood*. 2003;101(12):4695-4700.
- Coustan-Smith E, Campana D. Immunologic minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia: a comparative approach to molecular testing. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2010;23(3):347-358.
- Dworzak MN, Froschl G, Printz D, et al. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2002;99(6):1952-1958.
- Gaipa G, Cazzaniga G, Valsecchi MG, et al. Time point-dependent concordance of flow cytometry and RQ-PCR in minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2012;97(10):1582-1593.
- Kerst G, Kreyenberg H, Roth C, et al. Concurrent detection of minimal residual disease (MRD) in childhood acute lymphoblastic leukaemia by flow cytometry and real-time PCR. *Br J Haematol*. 2005;128(6):774-782.
- Malec M, van der Velden VHJ, Bjorklund E, et al. Analysis of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: comparison between RQ-PCR analysis of Ig/TcR gene rearrangements and multicolor flow cytometric immunophenotyping. *Leukemia*. 2004;18(10):1630-1636.
- Dworzak MN, Schumich A, Printz D, et al. CD20 up-regulation in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia during induction treatment: setting the stage for anti-CD20 directed immunotherapy. *Blood*. 2008;112(10):3982-3988.
- Gaipa G, Basso G, Maglia O, et al. Drug-induced immunophenotypic modulation in childhood ALL: implications for minimal residual disease detection. *Leukemia*. 2005;19(1):49-56.
- van der Sluijs-Gelling AJ, Van der Velden VHJ, Roeffen ET, Veerman AJ, van Wering ER. Immunophenotypic modulation in childhood precursor-B-ALL can be mimicked in vitro and is related to the induction of cell death. *Leukemia*. 2005;19(10):1845-1847.
- Dworzak MN, Gaipa G, Schumich A, et al. Modulation of antigen expression in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia during induction therapy is partly transient: evidence for a drug-induced regulatory phenomenon. Results of the AIEOP-BFM-ALL-FLOW-MRD-Study Group. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010;78(3):147-153.
- Dworzak MN, Gaipa G, Ratei R, et al. Standardization of flow cytometric minimal residual disease evaluation in acute lymphoblastic leukemia: multicentric assessment is feasible. *Cytometry B Clin Cytom*. 2008;74(6):331-340.
- Pedreira CE, Costa ES, Almeida J, et al. A probabilistic approach for the evaluation of minimal residual disease by multiparameter flow cytometry in leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Cytometry A*. 2008;73A(12):1141-1150.
- Pedreira CE, Costa ES, Barrera S, et al. Generation of flow cytometry data files with a potentially infinite number of dimensions. *Cytometry A*. 2008;73(9):834-846.
- van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012;26(9):1908-1975.
- da Costa ES, Peres RT, Almeida J, et al. Harmonization of light scatter and fluorescence flow cytometry profiles obtained after staining peripheral blood leucocytes for cell surface-only versus intracellular antigens with the Fix & Perm reagent. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010;20;78(1):11-20.
- Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VH, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*. 2012;26(9):1986-2010.
- van Dongen JJ, Lhermitte L, Böttcher S, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012;26(9):1908-75.
- Van der Velden VHJ, Cazzaniga G, Schrauder A, et al. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia*. 2007;21(4):604-611.
- Van der Velden VHJ, van Dongen JJM. MRD detection in acute lymphoblastic leukemia patients using Ig/TCR gene rearrangements as targets for real-time quantitative PCR. *Methods Mol Biol*. 2009;538:115-150.
- Fronkova E, Muzikova K, Mejstrikova E, et al. B-cell reconstitution after allogeneic SCT impairs minimal residual disease monitoring in children with ALL. *Bone Marrow Transplant*. 2008;42(3):187-196.
- van der Velden VHJ, Wijkhuijs JM, van Dongen JJM. Non-specific amplification of patient-specific Ig/TCR gene rearrangements depends on the time point during therapy: implications for minimal residual disease monitoring. *Leukemia*. 2008;22(3):641-644.
- Brüggemann M, Schrauder A, Raff T, et al. Standardized MRD quantification in European ALL trials: proceedings of the Second International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18-20 September 2008. *Leukemia*. 2010;24(3):521-535.
- Faham M, Zheng J, Moorhead M, et al. Deep sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia [published online ahead of print October 16, 2012]. *Blood*. doi:10.1182/blood-2012-07-444042.
- Østergaard M, Nyvold CG, Jovanovic JV, et al. Development of standardized approaches to reporting of minimal residual disease data using a reporting software pack-

- age designed within the European LeukemiaNet. *Leukemia*. 2011;25(7):1168-73.
28. Pfeifer H, Cazzaniga G, Spinelli O, et al. International standardization of minimal residual disease assessment in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia (Ph- ALL) expressing m-BCR-ABL transcripts: updated results of quality control procedures by the EWALL and ESG-MRD-ALL Consortia [abstract]. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*. 2011;118(21): Abstract 2535.
  29. Brüggemann M, Gökbuget N, Kneba M. Acute lymphoblastic leukemia: monitoring minimal residual disease as a therapeutic principle. *Semin Oncol*. 2012;39(1):47-57.
  30. Ribera JM, Oriol A, Morgades M, et al. Treatment of high-risk (HR) Philadelphia chromosome-negative (Ph-) adult acute lymphoblastic leukemia (ALL) according to baseline risk factors and minimal residual disease (MRD): results of the PETHEMAALL-AR-03 Trial including the use of Propensity Score (PS) method to reduce assignment bias [abstract]. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*. 2009;114(22): Abstract 322.
  31. Spinelli O, Peruta B, Tosi M, et al. Clearance of minimal residual disease after allogeneic stem cell transplantation and the prediction of the clinical outcome of adult patients with high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2007; 92(5):612-618.
  32. Gökbuget N, Kneba M, Raff T, et al. Adult patients with acute lymphoblastic leukemia and molecular failure display a poor prognosis and are candidates for stem cell transplantation and targeted therapies. *Blood*. 2012;120(9):1868-1876.
  33. Patel B, Rai L, Buck G, et al. Minimal residual disease is a significant predictor of treatment failure in non T-lineage adult acute lymphoblastic leukaemia: final results of the international trial UKALL XII/ECOG2993. *Br J Haematol*. 2010; 148(1):80-89.
  34. Holowiecki J, Krawczyk-Kulis M, Giebel S, et al. Status of minimal residual disease after induction predicts outcome in both standard and high-risk Ph-negative adult acute lymphoblastic leukaemia: the Polish Adult Leukemia Group ALL 4-2002 MRD Study. *Br J Haematol*. 2008;142(2):227-237.
  35. Lee S, Kim DW, Kim YJ, et al. Minimal residual disease-based role of imatinib as a first-line interim therapy prior to allogeneic stem cell transplantation in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2003; 102(8):3068-3070.
  36. Pane F, Cimino G, Izzo B, et al. Significant reduction of the hybrid BCR/ABL transcripts after induction and consolidation therapy is a powerful predictor of treatment response in adult Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2005;19(4):628-635.
  37. Lee S, Kim YJ, Chung NG, et al. The extent of minimal residual disease reduction after the first 4-week imatinib therapy determines outcome of allogeneic stem cell transplantation in adults with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 2009;115(3):561-570.
  38. Yanada M, Sugiura I, Takeuchi J, et al. Prospective monitoring of BCR-ABL1 transcript levels in patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia undergoing imatinib combined chemotherapy. *Br J Haematol*. 2008; 143(4):503-510.
  39. Pfeifer H, Lange T, Wüst S, et al. Prevalence and dynamics of BCR-ABL kinase domain mutations during imatinib treatment differ in patients with newly diagnosed and recurrent bcr-abl positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2012; 26(7):1475-1481.
  40. Raff T, Gökbuget N, Lüschen S, et al. Molecular relapse in adult standard-risk ALL patients detected by prospective MRD monitoring during and after maintenance treatment: data from the GMALL 06/99 and 07/03 trials. *Blood*. 2007; 109(3):910-915.
  41. Wassmann B, Pfeifer H, Stadler M, et al. Early molecular response to posttransplantation imatinib determines outcome in MRD- Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph-ALL). *Blood*. 2005;106(2):458-463.
  42. Pfeifer H, Wassmann B, Bethge W, et al. Randomized comparison of prophylactic and minimal residual disease-triggered imatinib after allogeneic stem cell transplantation for BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2012 . doi: 10.1038/leu.2012.352.
  43. Topp MS, Kufer P, Gokbuget N, et al. Targeted therapy with the T-cell-engaging antibody blinatumomab of chemotherapy-refractory minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia patients results in high response rate and prolonged leukemia-free survival. *J Clin Oncol*. 2011;29(18):2493-2498.
  44. Brüggemann M, Raff T, Kneba M. Has MRD monitoring superseded other prognostic factors in adult ALL? *Blood*. 2012;120 (23):4470-81.

## El fenómeno de la transformación histológica en los síndromes linfoproliferativos: mecanismos y tratamiento

COORDINADORES: EULOGIO CONDE GARCÍA. *Servicio de Hematología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander.*

EDUARDO RÍOS HERRANZ. *Servicio de Hematología. Hospital Nuestra Señora de Valme. Sevilla*

La transformación histológica (TH) a un linfoma de histología agresiva es un hecho bien reconocido en la evolución de los procesos linfoproliferativos indolentes, especialmente en el linfoma folicular (LF) y en la leucemia linfática crónica (LLC). En la mayoría de los casos, la TH es hacia un linfoma difuso de células grandes pero en menor medida están descritas las transformaciones a linfoma de tipo Burkitt y linfoma linfoblástico. En el caso del LF, el riesgo de TH se ha estimado en torno a un 3% por año desde el diagnóstico, lo que afectaría potencialmente a 1 de cada 3 pacientes. En la LLC, la TH, clásicamente conocida como síndrome de Richter, puede tener una incidencia similar o sólo levemente menor, aunque en ambos casos se considera que es un fenómeno infravalorado por la necesidad de confirmación histológica para llegar a un diagnóstico de certeza. Este simposio revisa las bases moleculares y las opciones terapéuticas disponibles de esta situación anatomoclínica.

Poco se conoce de los mecanismos implicados en el proceso de TH, si bien se admite la necesidad de la emergencia de segundos eventos moleculares. Aunque desde hace tiempo se han descrito las anomalías asociadas a c-MYC y TP53 (translocaciones y mutaciones) como uno de los mecanismos más importantes predisponentes a TH, estudios de expresión génica han podido identificar diferentes vías moleculares de transformación, indicando que la TH es un proceso complejo y heterogéneo. Además, recientemente se ha implicado también el papel del microambiente celular tumoral en la TH al haberse identificado que alteraciones de diferentes vías moleculares en las células T intratumorales no malignas se correlacionan con el riesgo de TH. Por último, se sabe que al menos en la LLC existen casos de TH clonalmente no relacionados con la población tumoral original, lo que complica aún más el escenario de la TH. En este sentido, el Dr. Santiago Montes discute la información disponible en este momento sobre los diferentes mecanismos moleculares de transformación y transdiferenciación en el fenómeno de la TH.

Otro tema de controversia en el desarrollo de la TH es el papel que las diferentes estrategias terapéuticas previas pueden representar en el riesgo de transformación (o incluso en la capacidad de protección frente a la TH), bien por selección de subclonas más proclives o bien por las implicaciones de los tratamientos en el estado inmunológica general o intratumoral. Los datos disponibles hasta ahora no son concluyentes, ni siquiera incluso respecto a la discutida asociación entre abstención terapéutica y TH.

En las siguientes ponencias, la Dra. Eva Giné revisa los genes implicados y los factores pronósticos identificados en el riesgo de TH en la LLC, con especial interés en la implicación de las mutaciones de NOTCH1 y, finalmente, la Dra. Silvia Montoto analiza las bases moleculares y las variables de riesgo y opciones terapéuticas en el caso de la TH en el LF. Contrariamente al incremento del conocimiento de los mecanismos patológicos asociados a la TH, los avances terapéuticos han sido pobres y, por desgracia, no existe tratamiento estándar, por lo que, a pesar de la introducción de la inmunoterapia basada en anticuerpos monoclonales y el uso de trasplante de progenitores hematopoyéticos como consolidación de respuesta tras esquemas de rescate, las perspectivas de estos pacientes son pobres y la mayoría fallecerá a corto plazo. Ni siquiera los estudios recientes de cohortes han sido capaces de demostrar un beneficio del trasplante alogénico, al menos en los casos de LF con TH. Entre las causas del escaso avance terapéutico se cuentan la heterogeneidad de los pacientes y la escasez de estudios prospectivos y ensayos clínicos sobre esta complicación.

## Patología y mecanismos moleculares de transformación y transdiferenciación de los linfomas B de bajo grado

SANTIAGO MONTES MORENO

*Departamento de Anatomía Patológica. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander*

### Introducción

Se entiende por transformación en linfomas B de bajo grado la progresión de la neoplasia desde el punto de vista histológico con emergencia de una población más agresiva biológicamente<sup>(1)</sup>. Así, por definición, la transformación requiere de una progresión histológica con aparición de histologías más agresivas (por ejemplo, de linfoma B difuso de células grandes [LB-DGC] tras linfoma folicular [LF]) y requiere para su confirmación el estudio histopatológico. En el proceso de transformación pueden ocurrir fenómenos de deriva antigénica que condicionen cambios en el fenotipo<sup>(2)</sup>, de modo que la demostración de identidad clonal (identidad clonal de IgH o identificación de mutaciones somáticas comunes) entre las dos neoplasias sigue siendo el método que confirma la progresión histológica<sup>(3-5)</sup>. Sin embargo, en casos como el de la progresión de leucemia linfocítica crónica (LLC) se encuentra bien descrito el fenómeno de transformación con evolución clonal divergente (clones no relacionados)<sup>(6,7)</sup>. Este fenómeno refleja la diversidad clonal subyacente en este tipo de neoplasia<sup>(8)</sup>.

Se entiende por transdiferenciación el cambio de línea de diferenciación de una neoplasia, adquiriendo, la segunda neoplasia, las características fenotípicas y biológicas propias de su nuevo estado de diferenciación. Aunque existen ejemplos bien documentados de este tipo de transdiferenciación (por ejemplo, en el caso del LF, LLC, leucemia linfoblástica aguda y neoplasias histiocitarias<sup>(9-11)</sup>) y suponen una prueba de la plasticidad de las poblaciones linfoides neoplásicas, son un evento clínico inusual.

En este artículo se revisan los mecanismos moleculares de transformación en linfomas B foliculares y leucemia linfocítica crónica B. Se hará énfasis en lo relacionado con los eventos moleculares relacionados con la transformación, la relación clonal entre ambas poblaciones neoplásicas y las características biológicas de los linfomas transformados. Finalmente se repasarán brevemente las bases de la plasticidad

celular normal en serie hematolinfoide y los mecanismos descritos de transdiferenciación en neoplasias hematolinfoides.

### Eventos moleculares relacionados con la transformación histológica en linfomas B de bajo grado

#### *Linfoma folicular en transformación a linfoma B agresivo. Linfomas con doble hit*

El linfoma folicular constituye cerca del 20% de los linfomas en la población occidental<sup>(12)</sup>. Este tipo de linfoma generalmente tiene una conducta indolente, pero es reconocido que hasta un 25-60% de los pacientes con LF sufren una progresión de su neoplasia, típicamente a linfoma B agresivo. La anomalía genética mejor caracterizada y asociada a progresión en LF es la adquisición de traslocaciones que afectan a C-MYC. Se sabe que entre un 2% y un 8% de los casos de linfoma folicular convencional tienen reordenamientos adicionales de CMYC<sup>(13-15)</sup>. La presencia de este doble hit (DH) en histologías de LF se asocia habitualmente a enfermedad progresiva<sup>(16)</sup>. En este mismo sentido, un porcentaje de casos diagnósticos de linfoma B agresivo con DH muestra coexistencia o diagnóstico previo de linfoma B folicular de bajo grado (grado 1-2)<sup>(17-22)</sup>. En algunos de los casos descritos de progresión desde LF a linfoma B agresivo se documentan traslocaciones idénticas de BCL2 y reordenamientos de IGH concordantes entre el LF previo y la progresión<sup>(20,21)</sup>, aunque en ocasiones el linfoma B de alto grado no está clonalmente relacionado<sup>(23)</sup>.

Los linfomas B agresivos que se suelen encontrar en la progresión de LF frecuentemente tienen histologías de linfoma B difuso de células grandes o de la entidad denominada como linfoma B intermedio entre LBDCG y linfoma de Burkitt (LB). En este último caso la histología puede ser del tipo Burkitt-like o bien del tipo blástica o blastoide<sup>(21,24,25)</sup>.

Desde el punto de vista molecular se han encontrado perfiles de expresión génica divergentes en los casos de LF transformado, de acuerdo con la existencia de diferentes vías o mecanismos de transformación<sup>(5,26)</sup>. Uno de los perfiles está dirigido principalmente por la sobreexpresión C-MYC y genes diana de C-MYC, relacionados con metabolismo y proliferación. Estos cambios en la expresión de C-MYC se han visto asociados con traslocaciones y mutaciones de C-MYC, pero en la mayoría de los casos el mecanismo de sobreexpresión es desconocido<sup>(5,27)</sup>.

Sí se ha estudiado con mayor detalle el perfil de expresión génica de los linfomas B con rasgos intermedios entre LBDCG y LB, que incluyen, en parte, a los linfomas DH. Como grupo, los linfomas B con rasgos intermedios entre DLBCL y LB muestran un perfil de expresión génica semejante pero no idéntico al del linfoma de Burkitt (llamado linfoma de Burkitt molecular<sup>(28,29)</sup>) e intermedio con el de LBDCG. Se encuentra sobreexpresión de genes diana de C-MYC, genes relacionados con el estado de diferenciación centrogerminal (MME, VPRESB1) y otros como ID3, SMARCA4 y LRF1. Por el contrario, se observa un descenso en la expresión de genes relacionados con NFκB (NFκB1A) y STAT3. Estos linfomas con rasgos intermedios desde el punto de vista molecular muestran asimismo una complejidad cariotípica mayor que la del LB con múltiples reordenamientos adicionales a C-MYC<sup>(30)</sup>. No obstante, no se conoce aún el perfil de expresión génica específico de los linfomas ahora reconocidos como DH.

#### **Linfoma folicular en transformación a linfoma B agresivo. Otras vías de transformación. Diversidad clonal en LF**

Adicionalmente al reordenamiento y sobreexpresión de C-MYC, otras muchas alteraciones se han asociado a la transformación histológica del LF como mutaciones en TP53<sup>(31,32)</sup>, BCL2<sup>(23)</sup>, BCL6<sup>(3)</sup> e inactivación de p16 y p14 mediante delección, mutación o hipermetilación<sup>(4,33)</sup>. Las mutaciones de TP53 se asocian con transformación histológica del LF en un 25-30% de los casos y se ha documentado que las poblaciones con mutación de TP53 se pueden identificar como clon minoritario en las biopsias con el diagnóstico de LF de bajo grado<sup>(32)</sup>. En este sentido, múltiples estudios de patrones de hipermutación somática<sup>(34,35)</sup> en LF muestran múltiples vías de progresión y transformación. Recientemente los estudios de secuenciación masiva del exoma confirman los hallazgos previos que muestran una diversidad clonal significativa, tanto en el momento del diagnóstico como en la progresión clínica y permiten discriminar entre eventos genéticos precoces (traslocaciones de BCL2, mutaciones en CREBBP) y tardíos (mutaciones en MLL2 y

TNFRSF14)<sup>(36)</sup>. Esta diversidad clonal podría, hipotéticamente, condicionar de forma significativa la elección de terapias dirigidas<sup>(36,37)</sup>.

#### **Transformación en leucemia linfocítica crónica. Diversidad clonal**

El síndrome de Richter representa el desarrollo de un linfoma agresivo, frecuentemente linfoma B difuso de células grandes en el contexto de una leucemia linfocítica crónica<sup>(38)</sup>. Como en el caso de LF, es necesario obtener una demostración histopatológica de la progresión histológica<sup>(39)</sup>. Situaciones intermedias sin una transformación franca a LBDCG son la transformación prolinfocítica y la denominada LLC en "fase acelerada"<sup>(38,40)</sup>. Si bien la mayoría de los casos de síndrome de Richter representan transformación de LLC con emergencia de una nueva población clonalmente relacionada, existe un porcentaje alto de los mismos que no están clonalmente relacionados<sup>(6,23,41-43)</sup>. Existen diferencias biológicas entre ambas situaciones, de modo que los casos clonalmente relacionados muestran una carga más elevada de alteraciones genéticas en TP53 y mutaciones en PIM1, C-MYC y CARD11. Por el contrario, los casos no relacionados clonalmente muestran una prevalencia menor de estereotipia en VH CDR3, independientemente del estado mutacional de IGHV<sup>(7,43)</sup>. Las traslocaciones de C-MYC, al igual que ocurre en el caso de LF, constituyen en este caso un segundo hit asociado a la transformación de LLC<sup>(7)</sup>.

De forma relevante, las alteraciones en TP53 (mutaciones y delecciones) constituyen además un marcador pronóstico adverso en los casos de síndrome de Richter, independiente de otras variables clínicas<sup>(7)</sup>. Así, este fenómeno de divergencia clonal es un factor contribuyente a la heterogeneidad clínica y pronóstica de los casos de transformación de LLC, de modo que los casos no relacionados clonalmente tienen un curso clínico más semejante al del LBCG convencional<sup>(7)</sup>.

De nuevo, estos fenómenos de heterogeneidad clonal en la transformación reflejan sutiles patrones de diversidad y evolución clonal. En el caso de la LLC se ha demostrado recientemente mediante técnicas de secuenciación masiva del exoma la existencia de diferentes subpoblaciones de dominancia variable en las primeras fases de la enfermedad clínicamente establecida. Así, se están describiendo poblaciones dominantes (caracterizadas por la presencia de mutaciones en NOTCH1, MYD88, XPO1, trisomía 12 y del13q)<sup>(8,44,45)</sup> que son predominantes en las primeras fases de la enfermedad y otras de rango subclonal en las fases iniciales (identificadas por las mutaciones que presentan en SF3B1, TP53, ATM, RAS) que emergen en fases posteriores de la enfermedad<sup>(8)</sup>. Esta



evolución clonal se asocia con diversos escenarios clínicos<sup>(45,46)</sup>. Así, las mutaciones en SF3B1 y NOTCH1 se asocian con una enfermedad rápidamente progresiva y menores supervivencias globales<sup>(45,46)</sup>. La coincidencia en los eventos mutacionales descritos en estos estudios iniciales mediante NGS en poblaciones de LLC no transformadas y los observados en los estudios previos de LLC en transformación hace inferir que son estos mismos mecanismos de deriva genética con aparición de nuevos *drivers* oncogénicos los que subyacen a la transformación. De momento la demostración formal más firme de que esto es así es el hallazgo de una relación entre las mutaciones de NOTCH1 y un aumento del riesgo de transformación a DLBCL<sup>(46)</sup>.

Se ha hecho aparente asimismo que el patrón de evolución clonal se modula por la terapia administrada en cada caso particular, de modo que, de forma aparentemente paradójica, el tratamiento favorece la selección de poblaciones subclonales al diagnóstico<sup>(8)</sup>. La identificación precoz de estas poblaciones subclonales al diagnóstico, que se expanden tras terapias citotóxicas<sup>(47)</sup>, abre una nueva ventana en el campo de las terapias dirigidas y la prevención de la progresión a nivel molecular.

### Plasticidad y transdiferenciación

Las células del sistema hematopoyético derivan de precursores comunes que se diferencian en distintas líneas con rasgos morfológicos, fenotípicos y funcionales propios<sup>(48,50)</sup>. Esta línea de diferenciación es el principal criterio sobre el que se basa la clasificación de estas neoplasias, y se considera que la diferenciación es un fenómeno irreversible<sup>(50)</sup>. En estos fenómenos de diferenciación de línea, factores de transcripción como PAX5 juegan un papel esencial en la inducción de diferenciación en células pro-B, como han demostrado Cobaleda *et al.*<sup>(51)</sup>. Su delección condicionada *in vitro* conduce a una retrodiferenciación de los linfocitos B a un estado de progenitor indiferenciado previo<sup>(51)</sup>. Otros factores de transcripción como C/EBP  $\alpha$  y  $\beta$  regulan asimismo a PAX5, y la inducción de su expresión produce transdiferenciación de células B maduras en macrófagos<sup>(52)</sup>.

Estos fenómenos de diferenciación, retrodiferenciación y transdiferenciación tienen su réplica en condiciones neoplásicas. Así, se han descrito casos de asociación en un mismo paciente de neoplasias con dos líneas de diferenciación diferentes<sup>(9-11,53,54)</sup>. Feldman *et al.* demostraron, en 8 casos, la asociación de LF con neoplasias histiocitárias con o sin diferenciación dendrítica (sarcomas histiocíticos y sarcoma de células interdigitantes dendríticas). En los 8 casos se demostró la presencia, en ambas poblaciones, de t(14;18) e idénticos reordenamientos clonales de IGH<sup>(9)</sup>. Las

variaciones en la expresión de factores de transcripción críticos en diferenciación como PAX5, PU.1 y CEBP $\beta$  en estos casos podría explicar este fenómeno de plasticidad tumoral. Una situación semejante ha sido descrita en el caso de LLC. Shao *et al.* han descrito 4 casos de sarcoma de células interdigitantes dendríticas, 1 sarcoma de células de Langerhans, 1 sarcoma histiocítico y 1 neoplasia inmadura con rasgos histiocíticos en pacientes con diagnóstico previo o coincidente de LLC. Los pares de tumores demostraron un reordenamiento idéntico de IGH. De forma interesante, mientras que 2 casos mostraron 17pdel en ambos componentes, en 4 casos éste fue un evento genético secundario y adquirido en la progresión clonal<sup>(10)</sup>. Explicaciones alternativas a la transdiferenciación incluyen la retrodiferenciación a un estado intermedio para posterior cambio de línea o la presencia de un progenitor neoplásico común con diferenciación en diversas líneas<sup>(10)</sup>. Otra posibilidad es la presencia de una diversidad clonal ya presente en la población original con fenómenos de evolución, divergencia y expansión clonal.

En resumen, los últimos avances, especialmente los resultados obtenidos mediante secuenciación de última generación, están demostrando una diversidad clonal inapreciada previamente en linfomas B de bajo grado. Esta diversidad clonal está en la base de la heterogeneidad clínica de estos procesos y explica las características de la transformación y, probablemente, de la transdiferenciación. El modo en que la terapia condiciona esta dinámica clonal abre un campo nuevo para las terapias dirigidas con el objetivo de prevenir la progresión molecular y clínica en los pacientes con linfoma.

### Bibliografía

1. Lossos IS, Gascoyne RD. Transformation of follicular lymphoma. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2011;24(2):147-163.
2. Maeshima AM, Omatsu M, Nomoto J, et al. Diffuse large B-cell lymphoma after transformation from low-grade follicular lymphoma: morphological, immunohistochemical, and FISH analyses. *Cancer Sci.* 2008;99(9):1760-1768.
3. Lossos IS, Levy R. Higher-grade transformation of follicle center lymphoma is associated with somatic mutation of the 5' noncoding regulatory region of the BCL-6 gene. *Blood.* 2000;96(2):635-639.
4. Martinez-Climent JA, Alizadeh AA, Segraves R, et al. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large cell lymphoma is associated with a heterogeneous set of DNA copy number and gene expression alterations. *Blood.* 2003;101(8):3109-3117.
5. Lossos IS, Alizadeh AA, Diehn M, et al. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large-cell lymphoma: alternative patterns with increased or decreased expression of c-myc and its regulated genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(13):8886-8891.
6. Matolcsy A, Inghirami G, Knowles DM. Molecular genetic demonstration of the diverse evolution of Richter's syndrome (chronic lymphocytic leukemia and subsequent large cell lymphoma). *Blood.* 1994;83(5):1363-1372.

7. Rossi D, Spina V, Deambrogi C, et al. The genetics of Richter syndrome reveals disease heterogeneity and predicts survival after transformation. *Blood*. 2011;117(12):3391-3401.
8. Landau DA, Carter SL, Stojanov P, et al. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*. 2013;152(4):714-726.
9. Feldman AL, Arber DA, Pittaluga S, et al. Clonally related follicular lymphomas and histiocytic/dendritic cell sarcomas: evidence for transdifferentiation of the follicular lymphoma clone. *Blood*. 2008;111(12):5433-5439.
10. Shao H, Xi L, Raffeld M, et al. Clonally related histiocytic/dendritic cell sarcoma and chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma: a study of seven cases. *Mod Pathol*. 2011;24(11):1421-1432.
11. Feldman AL, Minniti C, Santi M, Downing JR, Raffeld M, Jaffe ES. Histiocytic sarcoma after acute lymphoblastic leukaemia: a common clonal origin. *Lancet Oncol*. 2004;5(4):248-250.
12. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011;117(19):5019-5032.
13. Christie L, Kernohan N, Levison D, et al. C-MYC translocation in t(14;18) positive follicular lymphoma at presentation: An adverse prognostic indicator? *Leuk Lymphoma*. 2008;49(3):470-476.
14. Yano T, van Krieken JH, Magrath IT, Longo DL, Jaffe ES, Raffeld M. Histogenetic correlations between subcategories of small noncleaved cell lymphomas. *Blood*. 1992;79(5):1282-1290.
15. Mohamed AN, Palutke M, Eisenberg L, Al-Katib A. Chromosomal analyses of 52 cases of follicular lymphoma with t(14;18), including blastic/blastoid variant. *Cancer Genet Cytogenet*. 2001;126(1):45-51.
16. Aukema SM, Siebert R, Schuurings E, et al. Double-hit B-cell lymphomas. *Blood*. 2011;117(8):2319-2331.
17. De Jong D, Voetdijk BM, Beverstock GC, van Ommen GJ, Willemze R, Kluin PM. Activation of the c-myc oncogene in a precursor-B-cell blast crisis of follicular lymphoma, presenting as composite lymphoma. *N Engl J Med*. 1988;318(21):1373-1378.
18. Johnson NA, Savage KJ, Ludkovski O, et al. Lymphomas with concurrent BCL2 and MYC translocations: the critical factors associated with survival. *Blood*. 2009;114(11):2273-2279.
19. Kanungo A, Medeiros LJ, Abruzzo LV, Lin P. Lymphoid neoplasms associated with concurrent t(14;18) and 8q24/c-MYC translocation generally have a poor prognosis. *Mod Pathol*. 2006;19(1):25-33.
20. Lee JT, Innes DJ, Williams ME. Sequential bcl-2 and c-myc oncogene rearrangements associated with the clinical transformation of non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Invest*. 1989;84(5):1454-1459.
21. Young KH, Xie Q, Zhou G, et al. Transformation of follicular lymphoma to precursor B-cell lymphoblastic lymphoma with c-myc gene rearrangement as a critical event. *Am J Clin Pathol*. 2008;129(1):157-166.
22. Voorhees PM, Carder KA, Smith SV, Ayscue LH, Rao KW, Dunphy CH. Follicular lymphoma with a burkitt translocation--predictor of an aggressive clinical course: a case report and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med*. 2004;128(2):210-213.
23. Matolcsy A, Casali P, Warnke RA, Knowles DM. Morphologic transformation of follicular lymphoma is associated with somatic mutation of the translocated Bcl-2 gene. *Blood*. 1996;88(10):3937-3944.
24. Snuderl M, Kolman OK, Chen YB, et al. B-cell lymphomas with concurrent IGH-BCL2 and MYC rearrangements are aggressive neoplasms with clinical and pathologic features distinct from Burkitt lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(3):327-340.
25. Li S, Lin P, Fayad LE, et al. B-cell lymphomas with MYC/8q24 rearrangements and IGH@BCL2/t(14;18)(q32;q21): an aggressive disease with heterogeneous histology, germinal center B-cell immunophenotype and poor outcome. *Mod Pathol*. 2012;25(1):145-156.
26. Elenitoba-Johnson KS, Jenson SD, Abbott RT, et al. Involvement of multiple signaling pathways in follicular lymphoma transformation: p38-mitogen-activated protein kinase as a target for therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(12):7259-7264.
27. Davies AJ, Rosenwald A, Wright G, et al. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma proceeds by distinct oncogenic mechanisms. *Br J Haematol*. 2007;136(2):286-293.
28. Hummel M, Bentink S, Berger H, et al. A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N Engl J Med*. 2006;354(23):2419-2430.
29. Dave SS, Fu K, Wright GW, et al. Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. *N Engl J Med*. 2006;354(23):2431-2442.
30. Zhang J, Grubor V, Love CL, et al. Genetic heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(4):1398-1403.
31. Lo Coco F, Gaidano G, Louie DC, Offit K, Chaganti RS, Dalla-Favera R. p53 mutations are associated with histologic transformation of follicular lymphoma. *Blood*. 1993;82(3):2289-2295.
32. Sander CA, Yano T, Clark HM, et al. p53 mutation is associated with progression in follicular lymphomas. *Blood*. 1993;82(7):1994-2004.
33. Pinyol M, Cobo F, Bea S, et al. p16(INK4a) gene inactivation by deletions, mutations, and hypermethylation is associated with transformed and aggressive variants of non-Hodgkin's lymphomas. *Blood*. 1998;91(8):2977-2984.
34. Carlotti E, Wrench D, Matthews J, et al. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma may occur by divergent evolution from a common progenitor cell or by direct evolution from the follicular lymphoma clone. *Blood*. 2009;113(15):3553-3557.
35. Ruminy P, Jardin F, Picquenot JM, et al. S(mu) mutation patterns suggest different progression pathways in follicular lymphoma: early direct or late from FL progenitor cells. *Blood*. 2008;112(5):1951-1959.
36. Green MR, Gentles AJ, Nair RV, et al. Hierarchy in somatic mutations arising during genomic evolution and progression of follicular lymphoma. *Blood*. 2013;121(9):1604-1611.
37. Jardin F, Callanan M, Penther D, et al. Recurrent genomic aberrations combined with deletions of various tumour suppressor genes may deregulate the G1/S transition in CD4+CD56+ haematodermic neoplasms and contribute to the aggressiveness of the disease. *Leukemia*. 2009;23(4):698-707.
38. Swerdlow SH, CE HN, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.; 2008.
39. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008;111(12):5446-5456.
40. Giné E, Martínez A, Villamor N, et al. Expanded and highly active proliferation centers identify a histological subtype of chronic lymphocytic leukemia ("accelerated" chronic lymphocytic leukemia) with aggressive clinical behavior. *Haematologica*. 2010;95(9):1526-1533.
41. Timár B, Fülöp Z, Csernus B, et al. Relationship between the mutational status of VH genes and pathogenesis of diffuse

- large B-cell lymphoma in Richter's syndrome. *Leukemia*. 2004;18(2):326-330.
42. Rossi D, Spina V, Bomben R, et al. Association between molecular lesions and specific B-cell receptor subsets in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013.
  43. Rossi D, Spina V, Cerri M, et al. Stereotyped B-cell receptor is an independent risk factor of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *Clin Cancer Res*. 2009;15(13):4415-4422.
  44. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2011;475(7354):101-105.
  45. Quesada V, Conde L, Villamor N, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*. 2012;44(1):47-52.
  46. Villamor N, Conde L, Martínez-Trillos A, et al. NOTCH1 mutations identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with high risk of transformation and poor outcome. *Leukemia*. 2013;27(5):1100-1106.
  47. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature*. 2012;481(7381):306-313.
  48. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*. 2000;404(6774):193-197.
  49. Akashi K, Traver D, Zon LI. The complex cartography of stem cell commitment. *Cell*. 2005;121(2):160-162.
  50. Akashi K, Reya T, Dalma-Weiszhausz D, Weissman IL. Lymphoid precursors. *Curr Opin Immunol*. 2000;12(2):144-150.
  51. Cobaleda C, Schebesta A, Delogu A, Busslinger M. Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat Immunol*. 2007;8(5):463-470.
  52. Xie H, Ye M, Feng R, Graf T. Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell*. 2004;117(5):663-676.
  53. Alvaro T, Bosch R, Salvadó MT, Piris MA. True histiocytic lymphoma of the stomach associated with low-grade B-cell mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)-type lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 1996;20(11):1406-1411.
  54. Fraser CR, Wang W, Gomez M, et al. Transformation of chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma to interdigitating dendritic cell sarcoma: evidence for transdifferentiation of the lymphoma clone. *Am J Clin Pathol*. 2009;132(6):928-939.

## La leucemia linfática crónica y su transformación a linfoma difuso de célula grande. Bases moleculares y tratamiento

E. GINÉ SOCA, L.C. MAGNANO

Servicio Hematología. Hospital Clínic. Barcelona

### Introducción

La leucemia linfática crónica (LLC) es el síndrome linfoproliferativo crónico más frecuente en adultos del mundo occidental y se caracteriza por una infiltración por linfocitos B monoclonales CD5+ de la médula ósea, la sangre periférica y los tejidos linfoides<sup>(1)</sup>. El diagnóstico de esta enfermedad suele establecerse mediante el estudio morfológico e inmunofenotípico de la sangre periférica, por lo que la biopsia de tejido se reserva para casos con dificultades diagnósticas y, muy especialmente, para descartar una transformación histológica en el curso evolutivo de la enfermedad<sup>(2)</sup>. Históricamente se acuñó el término de síndrome de Richter (SR) para denominar el cortejo sintomático de los pacientes con LLC que desarrollaban indistintamente un linfoma difuso de células grandes o un linfoma de Hodgkin<sup>(3)</sup>. No obstante, en la actualidad con el término de SR se denomina en sentido estricto al desarrollo de un linfoma difuso de células grandes B (LDCG-B) en el curso evolutivo de la LLC<sup>(1)</sup>. La incidencia de transformación histológica en la LLC se sitúa alrededor del 2-8% en series clínicas clásicas<sup>(4-6)</sup>, aunque se han llegado a describir incidencias acumuladas de transformación a LDCG-B del 16% a los 10 años en una serie más actual<sup>(7)</sup>. Con toda probabilidad este fenómeno queda infravalorado por la dificultad en obtener biopsias en todos los pacientes en los que existe sospecha clínica de transformación. Ello se ve acrecentado por el pronóstico ominoso que esta situación suele conllevar y por la falta real de alternativas terapéuticas de rescate eficaces en muchos enfermos.

La transformación histológica es un fenómeno de una gran complejidad biológica que los avances científicos de los últimos años están permitiendo dilucidar, cambiando la perspectiva patogénica y probablemente abriendo nuevas perspectivas de tratamiento. Además, en la LLC esta complejidad y heterogeneidad biológica se hace incluso más patente que en otros síndromes linfoproliferativos indolentes. A di-

ferencia del linfoma folicular, en la LLC se viene reconociendo que en una significativa proporción de casos, alrededor del 20%, el LDCG-B y la LLC tienen un origen clonal distinto<sup>(8)</sup>. Este hecho tiene importantes implicaciones conceptuales y, desde un punto de vista clínico, pronósticas para el paciente<sup>(9)</sup>.

Por otro lado, se está empezando a reconocer cómo determinadas características histológicas en el ganglio linfático, estrechamente relacionadas con la proliferación, podrían identificar formas de LLC más agresivas desde un punto de vista clínico<sup>(10,11)</sup>. Estas formas de LLC que se han dado en llamar “aceleradas” vendrían definidas por la presencia de centros de proliferación expandidos o con gran actividad proliferativa, y tendrían un pronóstico intermedio entre las histologías más convencionales de LLC y la transformación a un LDCG-B<sup>(11)</sup>. Aunque este fenómeno es distinto de una transformación histológica, queda por discernir hasta qué punto podrían estar o no relacionadas tanto desde una perspectiva clínica como biológica.

### Bases moleculares de la transformación histológica

#### Histología

El sustrato histológico del SR es un LDCG-B que desde un punto de vista morfológico e inmunohistoquímico es prácticamente indistinguible del LDCG-B *de novo*. La gran mayoría de los casos (> 92%) presentan un fenotipo inmunohistoquímico de no centro germinal, en más del 80% de los casos con expresión de MUM-1 y, a diferencia de los LDCG-B *de novo*, alrededor del 50% de los casos pueden expresar el marcador CD5, lo cual denotaría un posible origen en la LLC<sup>(9)</sup>. De hecho, las diferencias inmunofenotípicas que pueden observarse respecto a la LLC subyacente, como la pérdida de CD5 y de CD23 o la expresión de MUM-1 o BCL-6, no suelen indicar un origen clonal distinto entre los dos componentes<sup>(8)</sup>.

### Clonalidad y estado mutacional IGHV

La aparición de un LDCG-B en el curso evolutivo de una LLC es un fenómeno clonalmente relacionado en la mayor parte de los casos con esta última (80%). Sin embargo, como se ha indicado, diferentes estudios demuestran que en un porcentaje no despreciable de casos (20%) el LDCG-B es una neoplasia independiente con un origen clonal distinto a la LLC<sup>(8,9)</sup>.

En los casos de LDCG-B no relacionados clonalmente con la LLC podrían observarse características biológicas y clínicas diferenciales, como una menor frecuencia de disrupciones en TP53 y menor presencia de un BCR estereotipado y, muy especialmente, una mejor supervivencia de los pacientes (mediana de 62,5 meses) a pesar de que su presentación clínica es similar a la de los clonalmente relacionados<sup>(9)</sup>. Por lo tanto, tendría especial utilidad clínica discriminar si existe o no una relación clonal entre la LLC y el LDCG-B.

De estos estudios también se desprende que, aunque el LDCG-B puede acontecer tanto en LLC IGHV no mutadas como mutadas, la asociación más frecuente es con las primeras. Cabe destacar que los casos de LDCG-B clonalmente relacionados con la LLC presentan en un 75% de los casos aproximadamente un IGHV no mutado, en tanto que esta proporción es inferior al 40% en los casos no relacionados clonalmente<sup>(8,9)</sup>.

### Mecanismos genéticos

Desde un punto de vista citogenético, no existen anomalías características de la transformación a LDCG-B, pudiéndose detectar en estos casos las mismas alteraciones que se observan al diagnóstico o durante el curso de la LLC, frecuentemente la presencia de +12, deleciones de 11q23 y 17p. En estos pacientes sí se ha detectado, no obstante, una mayor frecuencia de cariotipos complejos<sup>(5,12)</sup>, con lo que se ha sugerido que la existencia de alteraciones cariotípicas múltiples predispondría a los pacientes con LLC al desarrollo de un LDCG-B. Estudios con CGH demuestran el incremento en el número promedio de desequilibrios cromosómicos según los estadios iniciales o los más avanzados en la LLC, siendo este hecho especialmente marcado en el momento de la transformación. En este último caso existe una alta frecuencia de pérdidas a nivel de 8p y del cromosoma 9<sup>(13)</sup>. La presencia de inestabilidad genética en el contexto de la transformación a LDCG-B se ha demostrado también en diferentes estudios de análisis de microsátelites y de pérdida de heterocigosis<sup>(14-16)</sup>.

### Mecanismos moleculares

A pesar de la gran similitud histológica, los mecanismos moleculares patogénicos en la transformación a LDCG-B son distintos a los que subyacen en un LDCG-B *de novo*<sup>(9,17)</sup>. Los casos transformados prácticamente no presentan alteraciones moleculares en BCL-6 ni en la vía de *NFK-B* (*CARD11*, *TNFAIP3/A20*, *CD79A* y *CD79B*)<sup>(9,17)</sup> y, lo que es más importante desde un punto de vista inmunológico, el gen de las inmunoglobulinas se encuentra no mutado hasta en un 65-80% de estos casos<sup>(8,9)</sup>, en contraposición a lo que ocurre en el LDCG-B *de novo*, en el que virtualmente siempre el gen de las inmunoglobulinas se halla mutado<sup>(18)</sup>.

La adquisición de alteraciones oncogénicas en genes reguladores del ciclo celular y la inactivación de genes supresores de tumores, entre ellos alteraciones a nivel de *p53*, *p16INK4a*, *p21Waf1*, *p27*, *ciclina D1* y *c-MYC*, también han sido descritas en la transformación a LDCG-B<sup>(9,13,19-22)</sup>. De hecho, las alteraciones que con mayor frecuencia se observan incluyen disrupciones en la vía de p53 (mutaciones TP53, deleciones 17p y deleciones homocigotas de *INK4a/ARF*) hasta en un 40-60% de los casos y alteraciones en *c-MYC* (translocaciones y amplificación) en un 26% de los casos<sup>(9,21,22)</sup>. Las translocaciones de *c-MYC* no se han observado asociadas a translocaciones de *BCL2* ni de *BCL6* y, en cambio, sí pueden coincidir en una proporción de casos con la presencia de alteraciones de *TP53*<sup>(9)</sup>.

Los estudios de diversificación intraclonal del gen de las inmunoglobulinas sugieren que los casos transformados, y clonalmente relacionados con la LLC, se originarían en una célula presente dentro del clon inicial de la LLC<sup>(23)</sup>.

### Riesgo de transformación histológica. Factores pronósticos

Cuando se analizan los factores de riesgo de transformación a LDCG-B se identifican diferentes parámetros clínicos y biológicos. Entre los primeros se identifican variables relacionadas con la carga tumoral en el momento del diagnóstico de la LLC, como el tamaño de las adenopatías ( $\geq 3$  cm) o el número de territorios ganglionares afectos ( $\geq 3$  áreas), estadios clínicos avanzados (Binet B o C) y la elevación de la LDH sérica. Entre los biológicos se han señalado múltiples parámetros, entre ellos un IGHV no mutado, el uso de IGHV4-39, la presencia de un BCR estereotipado, la ausencia de deleción 13q14, la expresión elevada de ZAP-70 o de CD38, e incluso la expresión de determinados polimorfismos de CD38<sup>(7,24,25)</sup>. La detección coincidente de un IGHV4-39 y un BCR estereotipado identificaría a un grupo de pacientes con un elevado riesgo de transformación (68% a los 5 años)<sup>(25)</sup>.

Recientemente se ha identificado un subgrupo genético en la LLC caracterizado por la presencia de mutaciones de NOTCH1 que se asocia a formas clínicas más agresivas y especialmente a un elevado riesgo de transformación histológica (30% a los 10 años)<sup>(26-28)</sup>. Estas mutaciones raramente se adquieren a lo largo del curso evolutivo de la LLC, y además de forma interesante el riesgo de transformación asociado a la presencia de mutaciones de NOTCH1 es independiente del estado mutacional IGHV<sup>(28)</sup>. Además, la presencia de IGHV4-39 se asocia con +12 y mutaciones en NOTCH1, y por lo tanto con un elevado riesgo de transformación a LDCG-B<sup>(29)</sup>.

El impacto de los tratamientos previos sobre la transformación histológica es un tema de discusión recurrente, especialmente desde la introducción de los análogos de purinas como base del tratamiento de la LLC. No obstante, en el momento actual no hay suficientes evidencias para vincular esos tratamientos a un riesgo aumentado de transformación.

La transformación histológica debe sospecharse ante un cambio brusco clínico de la LLC en forma de aparición de sintomatología sistémica (fiebre, sudoración o pérdida de peso), afectación del estado general o rápido crecimiento de adenopatías. Hasta en un 41% de los casos puede evidenciarse una afectación extranodal que predominantemente suele observarse en el tracto gastrointestinal, el pulmón, la piel y el SNC, entre otros. Analíticamente el parámetro más constante es la elevación de la LDH sérica (> 80% de los casos) y, dentro de las técnicas de imagen, el PET ha demostrado utilidad en la detección de transformación. No obstante, la obtención de una biopsia de tejido continúa siendo el único método para confirmar la transformación histológica y definir el mejor tratamiento de rescate.

## Tratamiento

La transformación a un LDCG-B conlleva un mal pronóstico y la mayoría de los pacientes tan sólo sobreviven unos pocos meses tras este diagnóstico. Los resultados de tratamientos habitualmente activos en los linfomas difusos de célula grande son malos en este contexto clínico y no se consiguen más allá de un 40% de respuestas, con supervivencias medianas entre 5 y 10 meses. El esquema OFAR (oxaliplatino, fludarabina, citarabina y rituximab) tampoco ha logrado resultados claramente superiores, consiguiendo tan sólo un 50% de respuestas globales con una mediana de supervivencia de 10 meses<sup>(30)</sup>. El papel de las estrategias de consolidación con trasplante son aplicables a una baja proporción de estos casos pero, en cualquier caso, algunos datos publicados podrían apoyar tanto la utilidad del trasplante autólogo como del alogénico en este contexto<sup>(31-33)</sup>. Ninguno de estos estudios ha podi-

do evaluar el impacto del trasplante en función de la relación clonal entre la LLC y el LDCG-B.

La identificación de las mutaciones de NOTCH1 y de su papel relevante en la transformación a LDCG-B abre la puerta a explorar nuevos fármacos dirigidos a esta vía de señalización. En estos momentos ya se dispone de drogas que inhiben la conversión enzimática de NOTCH1 a un factor de transcripción activo y se están testando en ensayos en leucemia aguda linfoblástica T. Asimismo, será interesante evaluar hasta qué punto los inhibidores del BCR, ibrutinib y GS-1101, que están presentando resultados muy prometedores en la LLC, podrán también aportar un beneficio terapéutico en la transformación histológica a LDCG-B.

Una de las series con mayor número de pacientes con LLC transformados (N=148) identificó diferentes parámetros pronósticos independientes para la supervivencia en el momento de la transformación, como son el estado general, la cifra de LDH sérica, el recuento plaquetario, el tamaño tumoral y el número de líneas de tratamiento previas<sup>(33)</sup>. Otra serie más reciente y con parámetros biológicos identificaría la presencia de disrupción de TP53, la respuesta al tratamiento y el estado general como los principales factores para discriminar una diferente supervivencia en el momento de la transformación<sup>(9)</sup>.

## Conclusiones

En la LLC, la transformación histológica a LDCG-B es un fenómeno de gran complejidad biológica, en el que los avances en el conocimiento de los factores genéticos involucrados y sus vías de señalización van a permitir desarrollar tratamientos más dirigidos en un futuro próximo.

## Bibliografía

1. Müller-Hermelink H.K., Montserrat E, Catovsky D, et al. Chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma. WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC:Lyon 2008:180-2.
2. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008;111:5446-56.
3. Lortholary P, Boiron M, Ripault P, et al. Chronic lymphoid leukemia secondarily associated with a malignant reticulopathy: Richter's syndrome. *Nouv Rev Fr Hematol* 1964;78:621-44.
4. Mauro FR, Foa R, Giannarelli D, et al. Clinical characteristics and outcome of young chronic lymphocytic leukemia patients: a single institution study of 204 cases. *Blood* 1999;94:448-54.
5. Robertson LE, Pugh W, O'Brien S, et al. Richter's syndrome: a report on 39 patients. *J Clin Oncol* 1993;11:1985-9.
6. Tsimberidou AM, Keating MJ. Richter syndrome: biology, incidence, and therapeutic strategies. *Cancer* 2005;103:216-28.

7. Rossi D, Cerri M, Capello D, et al. Biological and clinical risk factors of chronic lymphocytic leukaemia transformation to Richter syndrome. *Br J Haematol* 2008;142:202-15.
8. Mao Z, Quintanilla-Martinez L, Raffeld M, et al. IgVH mutational status and clonality analysis of Richter's transformation: diffuse large B-cell lymphoma and Hodgkin lymphoma in association with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) represent 2 different pathways of disease evolution. *Am J Surg Pathol* 2007;31:1605-14.
9. Rossi D, Spina V, Deambrogi C, et al, Young KH, Gaidano G. The genetics of Richter syndrome reveals disease heterogeneity and predicts survival after transformation. *Blood* 2011;117:3391-401.
10. Ciccone M, Agostinelli C, Rigolin GM, et al. Proliferation centers in chronic lymphocytic leukemia: correlation with cytogenetic and clinicobiological features in consecutive patients analyzed on tissue microarrays. *Leukemia* 2012;26:499-508.
11. Gine E, Martinez A, Villamor N, et al. Expanded and highly active proliferation centers identify a histological subtype of chronic lymphocytic leukemia ("accelerated" chronic lymphocytic leukemia) with aggressive clinical behavior. *Haematologica* 2010;95:1526-33.
12. Han T, Henderson ES, Emrich LJ, et al. Prognostic significance of karyotypic abnormalities in B cell chronic lymphocytic leukemia: an update. *Semin Hematol* 1987;24:257-63.
13. Bea S, Lopez-Guillermo A, Ribas M, et al. Genetic imbalances in progressed B-cell chronic lymphocytic leukemia and transformed large-cell lymphoma (Richter's syndrome). *Am J Pathol* 2002;161:957-68.
14. Fulop Z, Csernus B, Timar B, et al. Microsatellite instability and hMLH1 promoter hypermethylation in Richter's transformation of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2003;17:411-5.
15. Lee JN, Giles F, Huh YO, et al. Molecular differences between small and large cells in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 2003;71:235-42.
16. Volpe G, Gamberi B, Pastore C, et al. Analysis of microsatellite instability in chronic lymphoproliferative disorders. *Ann Hematol* 1996;72:67-71.
17. Matolcsy A, Chadburn A, Knowles DM. De novo CD5-positive and Richter's syndrome-associated diffuse large B cell lymphomas are genotypically distinct. *Am J Pathol* 1995;147:207-16.
18. Lossos IS, Okada CY, Tibshirani R, et al. Molecular analysis of immunoglobulin genes in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 2000;95:1797-803.
19. Arranz E, Martinez B, Richart A, et al. Increased C-MYC oncogene copy number detected with combined modified comparative genomic hybridization and FISH analysis in a Richter syndrome case with complex karyotype. *Cancer Genet Cytogenet* 1998;106:80-3.
20. Cobo F, Martinez A, Pinyol M, et al. Multiple cell cycle regulator alterations in Richter's transformation of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2002;16:1028-34.
21. Cordone I, Masi S, Mauro FR, et al. p53 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a marker of disease progression and poor prognosis. *Blood* 1998;91:4342-9.
22. Pinyol M, Cobo F, Bea S, et al. p16(INK4a) gene inactivation by deletions, mutations, and hypermethylation is associated with transformed and aggressive variants of non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1998;91:2977-84.
23. Rossi D, Spina V, Forconi F, et al. Molecular history of Richter syndrome: origin from a cell already present at the time of chronic lymphocytic leukemia diagnosis. *Int J Cancer* 2012;130:3006-10.
24. Aydin S, Rossi D, Bergui L, et al. CD38 gene polymorphism and chronic lymphocytic leukemia: a role in transformation to Richter syndrome? *Blood* 2008;111:5646-53.
25. Rossi D, Spina V, Cerri M, et al. Stereotyped B-cell receptor is an independent risk factor of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *Clin Cancer Res* 2009;15:4415-22.
26. Fabbri G, Rasi S, Rossi D, et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med* 2011;208:1389-401.
27. Rossi D, Rasi S, Fabbri G, et al. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012;119:521-9.
28. Villamor N, Conde L, Martinez-Trillos A, et al. NOTCH1 mutations identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with high risk of transformation and poor outcome. *Leukemia* 2012.
29. Rossi D, Spina V, Bomben R, et al. Association between molecular lesions and specific B-cell receptor subsets in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013.
30. Tsimberidou AM, Wierda WG, Plunkett W, et al. Phase I-II study of oxaliplatin, fludarabine, cytarabine, and rituximab combination therapy in patients with Richter's syndrome or fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2008;26:196-203.
31. Cwynarski K, van BA, de WL, Stilgenbauer S, et al. Autologous and allogeneic stem-cell transplantation for transformed chronic lymphocytic leukemia (Richter's syndrome): A retrospective analysis from the chronic lymphocytic leukemia subcommittee of the chronic leukemia working party and lymphoma working party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *J Clin Oncol* 2012;30:2211-7.
32. Rodriguez J, Keating MJ, O'Brien S, et al. Allogeneic haematopoietic transplantation for Richter's syndrome. *Br J Haematol* 2000;110:897-9.
33. Tsimberidou AM, O'Brien S, Khouri I, et al. Clinical outcomes and prognostic factors in patients with Richter's syndrome treated with chemotherapy or chemoimmunotherapy with or without stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 2006;24:2343-51.

## Transformación a linfoma B difuso de células grandes en el linfoma folicular. Bases moleculares y tratamiento

SILVIA MONTOTO ALMIRALL

*Department of Haemato-oncology. St Bartholomew's Hospital. London (United Kingdom)*

### Introducción

La transformación histológica (TH) a un linfoma "agresivo" es uno de los fenómenos característicos en la historia natural y en el curso clínico de los pacientes con linfoma folicular (LF). Su incidencia varía considerablemente en diferentes series dependiendo, entre otros factores, de la definición utilizada, de los métodos diagnósticos empleados y del seguimiento de las diferentes series. Pese a que el conocimiento de las bases moleculares que subyacen en los mecanismos biológicos que dan lugar a la TH ha aumentado considerablemente en los últimos años, no existe en la actualidad una teoría que integre todos los datos disponibles y que explique de forma satisfactoria este fenómeno. Asimismo, desgraciadamente, los conocimientos biológicos no se han traducido en avances específicos en la práctica clínica que nos permitan una mejor identificación de los pacientes con un alto riesgo de TH o que supongan un avance terapéutico significativo. Típicamente, el diagnóstico de TH se ha acompañado de un pronóstico infausto, con una mediana de supervivencia de alrededor de un año en la mayoría de los estudios publicados hasta la fecha. Se dispone, sin embargo, de datos preliminares que sugieren que el pronóstico de los pacientes que presentan TH ha mejorado significativamente en la era de los anticuerpos monoclonales.

### Diagnóstico e incidencia

La TH en pacientes con LF se caracteriza por un cambio en el aspecto histológico hacia un linfoma "agresivo", que se acompaña, por lo general, de un cambio significativo en el curso clínico de la enfermedad. En la mayoría de los casos se observa una evolución hacia un linfoma de morfología e inmunofenotipo característicos de un linfoma difuso de células grandes B (LDCGB), aunque se ha descrito también la TH hacia otros subtipos histológicos<sup>(1)</sup>. Así pues, el diagnóstico de TH debe basarse, en la medida de lo

posible, en el estudio histopatológico de una muestra tisular. Sin embargo, la dificultad en obtener una muestra de tejido, ya sea por la presencia de enfermedad en áreas no accesibles o por el mal estado general que frecuentemente presentan los pacientes en el momento de la TH, lleva a muchos autores a incluir en los estudios de TH a pacientes diagnosticados basándose en muestras citológicas o en datos clínicos<sup>(1-3)</sup>. La inclusión de pacientes diagnosticados con TH a partir de datos clínicos se sustenta en el hecho de que, en la mayoría de los pacientes, el cambio en la histología se acompaña de un curso clínico más agresivo con características típicas de los linfomas "de alto grado", tales como el mal estado general, un crecimiento rápido de las adenopatías, o una elevación en el nivel sérico de LDH. En este sentido, el estudio publicado por la British Canadian Cancer Agency (BCCA) en 2008<sup>(4)</sup> demostró que el pronóstico de los pacientes con transformación histológica basada en criterios clínicos era similar al de los pacientes en los cuales el diagnóstico se había efectuado mediante el estudio patológico de una muestra tisular. Es indudable que la presencia de TH se correlaciona con la presencia de características clínicas más agresivas; sin embargo, esta relación no es absoluta, ya que existe un porcentaje de pacientes en los que la enfermedad se manifiesta de forma "indolente" aun con confirmación histológica de la transformación. Por otra parte, aunque en la mayoría de los casos la patología en el momento de la transformación corresponde a un LDCGB, se han demostrado también casos de transformación a un linfoma de Burkitt (LB) o a un linfoma linfoblástico (LL)<sup>(4,5)</sup>, lo que pone de relieve la importancia del diagnóstico histológico. La incidencia de TH reportada en diferentes series oscila entre el 15% y el 30% a los 10 años<sup>(1-3,5,6)</sup>. Tal disparidad es debida básicamente, tal como se ha comentado, a diferencias en la definición empleada y, por consiguiente, en los métodos diagnósticos usados, con algunas series que incluyen pacientes con una progresión de un LF de grado 1-2 a un LF de grado 3. Otros factores críti-



cos que contribuyen a la variabilidad en la incidencia de TH reportada son las diferencias en el seguimiento de las series y en el porcentaje de pacientes en los que se realiza una biopsia en el momento de la recaída (Tabla 1).

### Bases moleculares

En los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento de las bases moleculares que dan lugar al proceso de TH. Así, gracias al estudio de pares de muestras obtenidas en el momento del diagnóstico y en el momento de la transformación, sabemos que existen ciertas anomalías citogenéticas recurrentes que son más frecuentes en los casos de TH que en las muestras de los LF precedentes. Ejemplos de tales anomalías son mutaciones de las proteínas p53 y cambios en la expresión de myc<sup>(7,8)</sup>. Asimismo, se han descrito otras anomalías citogenéticas al diagnóstico que parecen asociarse a un riesgo aumentado de TH, tales como translocaciones de *BCL-6* o alteraciones en las regiones 1p36 y 6q21, entre otras<sup>(9,10)</sup>. Sin embargo, tales anomalías se hallan presentes, por lo general, únicamente en un pequeño porcentaje de pacientes al diagnóstico, por lo que no resultan de gran utilidad como método de identificación de pacientes de alto riesgo. Por otra parte, en paralelo al reconocimiento del papel del microambiente en la fisiopatología del LF, se ha demostrado la importancia del microambiente en el desarrollo de la TH<sup>(11,12)</sup>. No existe así una hipótesis que describa con satisfacción el proceso de la TH y los eventos que son esenciales para que ésta se produzca. Hay que destacar, sin embargo, un avance reciente en las hipótesis que in-

tentan explicar la TH con un cambio del paradigma clásicamente aceptado (la TH es un evento inherente a la naturaleza de los linfomas indolentes, que se debe a la acumulación de anomalías genéticas en una sub-población de células linfomatosas, lo que sugiere que todo paciente con LF presentaría una TH de sobrevivir el tiempo suficiente) a un modelo que sugiere la existencia de *common progenitor cells*, que pueden dar lugar a una recaída en forma de LF o en forma de linfoma agresivo, dependiendo de los cambios moleculares que sufren. Esta hipótesis se sustenta en estudios que demuestran la "desaparición" de mutaciones o anomalías citogenéticas que se hallaban presentes al diagnóstico en las muestras obtenidas en el momento de la transformación<sup>(13)</sup>. Pese al avance en el conocimiento de los mecanismos implicados en la transformación, éstos no se han traducido, de momento, en una aplicación práctica en la clínica diaria. Por otra parte, por lo que hace referencia al aspecto crítico, esto es, la determinación de las características en la biopsia inicial que nos permitan reconocer a pacientes con un alto riesgo de transformación, el grado histológico sigue siendo el más fiable<sup>(3)</sup>.

### Factores de riesgo: tratamiento previo

Dado el mal pronóstico tradicionalmente asociado a la TH, numerosos investigadores se han centrado en la identificación de aquellas características clínicas al diagnóstico que se acompañan de un alto riesgo de TH. En concreto, varios estudios han analizado el posible papel del manejo inicial de los pacientes en el subsiguiente riesgo de TH. Un estudio retrospectivo con largo seguimiento detectó un riesgo de TH signi-

Tabla 1. Incidencia de transformación histológica

Serie, año	N	Métodos diagnósticos	Criterio diagnóstico	% de biopsias en recaída	Mediana de seguimiento	Riesgo actuarial
Horning (6) 1984	83/131 <sup>A</sup>	Bx	Patrón difuso; LF célula grande	45%/67% <sup>A</sup>	4 años	8-a: 19%/23% <sup>A</sup>
Bastion (2) 1997	220	Bx, Cx, Cl	Linfoma difuso agresivo	-	9 años	5-a: 22% 10-a: 31%
Giné (3) 2006	276	Bx, Cx	Linfoma difuso de alto grado	NE	6,5 años	10-a: 15% 15-a: 22%
Montoto (5) 2007	325	Bx	LDCGB	70%	15 años	10-a: 28% 15-a: 37%
Al-Tourah (1) 2008	600	Bx, Cx, Cl	LDCGB o LB	NE	9 años	10-a: 30% 15-a: 45%
Conconi (18) 2012	281	Bx	LDCGB	NE	10 años	10-a: 15% 14-a: 26%

Bx: biopsia; Cx: citología; Cl: datos clínicos; a: años; NE: no especificado; LDCGB: linfoma difuso de células grandes B; LB: linfoma de Burkitt; <sup>A</sup> abstención terapéutica/tratamiento inicial, respectivamente

ficativamente aumentado en pacientes en abstención terapéutica al diagnóstico; sin embargo, otro estudio retrospectivo no confirmó tales resultados<sup>(1,5)</sup>. Entre los estudios aleatorizados que han estudiado el papel de la abstención terapéutica, únicamente uno analizó el riesgo de TH<sup>(14)</sup>. En este estudio (únicamente publicado en forma de comunicación a un congreso) no se halló un mayor riesgo de TH en los pacientes que no recibieron tratamiento inicialmente, sino que, de hecho, el tratamiento inicial se acompañó de una reducción significativa del riesgo de TH. Asimismo, recientemente se ha especulado sobre un posible papel protector de los antraciclínicos en primera línea, en base al estudio retrospectivo de BCCA<sup>(1)</sup>. En este artículo, los autores compararon el riesgo de TH en dos estudios consecutivos con los mismos criterios de inclusión y demostraron que los pacientes que habían sido tratados en el estudio que incluía antraciclínicos como terapia inicial presentaban un riesgo disminuido de TH. Una vez más, la información sobre el riesgo de TH es escasa en estudios aleatorizados, puesto que muy raramente se incluye la TH como un objetivo del análisis. Así, los únicos datos disponibles provienen de un estudio antiguo que comparaba ciclofosfamida, procarbina, vincristina y prednisona con o sin doxorubicina, que demostró la ausencia de diferencias significativas en el riesgo de TH según los pacientes hubieran recibido o no antraciclínicos<sup>(15)</sup>. Más recientemente algunos estudios se han centrado en analizar el riesgo de TH en la era de los anticuerpos monoclonales y en la posible disminución en la incidencia de este evento en épocas más recientes.

### Tratamiento en el momento de la transformación

El principal obstáculo a la hora de determinar el tratamiento ideal para pacientes con TH se halla en la exclusión de dichos pacientes en la mayoría de estudios prospectivos, tanto en LF como en LDCGB. Por otra

parte, la dificultad en desgranar los datos del tratamiento en los diferentes estudios retrospectivos publicados estriba en el hecho de que se trata de series de pacientes muy heterogéneos, con un número variable de líneas de tratamiento previo y con un rango de opciones terapéuticas recibidas también muy diverso. La falta de estudios prospectivos ha llevado al empleo de datos extrapolados de estudios de LDCGB, al ser éste el tipo de linfoma más parecido, tanto biológica como clínicamente, al LF transformado. Así, en pacientes que no han recibido antraciclínicos, el tratamiento que se puede considerar estándar en el momento actual es CHOP-rituximab, mientras que en pacientes previamente tratados con CHOP-R, la recomendación en pacientes jóvenes y con buen estado general consiste en una quimioterapia de rescate seguida de quimioterapia a altas dosis con rescate de progenitores hemopoyéticos. Cabe mencionar que los datos que apoyan dichas medidas son retrospectivos y, en general, los resultados obtenidos en la era pre-rituximab son decepcionantes<sup>(2,3,5)</sup>, independientemente del tratamiento administrado. El uso del trasplante alogénico con acondicionamiento de intensidad reducida también se ha ensayado en pacientes con LF transformado, con resultados algo peores que los observados en los pacientes con LF<sup>(16)</sup>, pero mejores que en los pacientes con LDCGB *de novo*<sup>(17)</sup>. En los últimos años, se han presentado varios estudios (algunos publicados únicamente en forma de comunicación a un congreso) que sugieren que el pronóstico infausto ligado a la TH parece haber mejorado significativamente en la era de los anticuerpos monoclonales<sup>(18-20)</sup>, con medianas de supervivencia que alcanzan 3-4 años (Tabla 2). Por otra parte, pacientes que no han recibido tratamiento quimioterápico previo (abstención terapéutica o radioterapia) presentan muy buen pronóstico con inmunoterapia, y probablemente se podrían ahorrar la quimioterapia a altas dosis con rescate de progenitores hemopoyéticos.

Tabla 2. Incidencia y pronóstico de la TH en la era rituximab

Serie	N	Tratamiento inicial con rituximab	Mediana de seguimiento	Riesgo de TH	Mediana de SG
Link (20)	631 LF Dx 2002-2009	12% R 22% alquilantes +/- R 20% antraciclínicos +/- R	60 meses	5 años: 11%	44 meses
Ban-Hoefen (19)	118 LFt	70%	NE	NE	(SG a los 5 años: 49%)
Conconi (18)	281 LF Dx 1979-2007	13%	10 años	5 años: 13%	2,7 años

TH: transformación histológica; SG: supervivencia global; LF: linfoma folicular; R: rituximab; LFt: linfoma folicular transformado; NE: no especificado

## Conclusiones

La TH sigue siendo un evento preocupante en la historia natural y en el curso clínico de los pacientes con LF. Hay indicios, sin embargo, de que la incidencia podría haber disminuido en la era de los anticuerpos monoclonales y, lo que es más importante, de que el pronóstico ha mejorado sustancialmente. Por desgracia, dicha mejoría no proviene de la aplicación de los conocimientos adquiridos en el laboratorio sobre las bases moleculares de la TF, ni del análisis del riesgo de TH o del pronóstico tras la TH en estudios prospectivos. La repetición de biopsias en pacientes con LF en recaída con obtención de muestras para investigación, la inclusión de pacientes con TH en estudios prospectivos y la inclusión del riesgo de TH como un objetivo esencial en estudios prospectivos son críticas para seguir avanzando en la mejoría del pronóstico de pacientes con TH.

## Bibliografía

- Al-Tourah AJ, Gill KK, Chhanabhai M, Hoskins PJ, Klasa RJ, Savage KJ, et al. Population-based analysis of incidence and outcome of transformed non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*2008 Nov 10;26(32):5165-5169.
- Bastion Y, Sebban C, Berger F, Felman P, Salles G, Dumontet C, et al. Incidence, predictive factors, and outcome of lymphoma transformation in follicular lymphoma patients. *J Clin Oncol*1997 Apr;15(4):1587-1594.
- Gine E, Montoto S, Bosch F, Arenillas L, Mercadal S, Villamor N, et al. The Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI) and the histological subtype are the most important factors to predict histological transformation in follicular lymphoma. *Ann Oncol*2006 Oct;17(10):1539-1545.
- Morley NJ, Evans LS, Goepel J, Hancock BW. Transformed follicular lymphoma: the 25-year experience of a UK provincial lymphoma treatment centre. *Oncol Rep*2008 Oct;20(4):953-956.
- Montoto S, Davies AJ, Matthews J, Calaminici M, Norton AJ, Amess J, et al. Risk and clinical implications of transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*2007 Jun 10;25(17):2426-2433.
- Horning SJ, Rosenberg SA. The natural history of initially untreated low-grade non-Hodgkin's lymphomas. *N Engl J Med*1984 Dec 6;311(23):1471-1475.
- Lo Coco F, Gaidano G, Louie DC, Offit K, Chaganti RS, Dalla-Favera R. p53 mutations are associated with histologic transformation of follicular lymphoma. *Blood*1993 Oct 15;82(8):2289-2295.
- Lossos IS, Alizadeh AA, Diehn M, Warnke R, Thorstenson Y, Oefner PJ, et al. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large-cell lymphoma: alternative patterns with increased or decreased expression of c-myc and its regulated genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*2002 Jun 25;99(13):8886-8891.
- Akasaka T, Lossos IS, Levy R. BCL6 gene translocation in follicular lymphoma: a harbinger of eventual transformation to diffuse aggressive lymphoma. *Blood*2003 Aug 15;102(4):1443-1448.
- Cheung KJ, Shah SP, Steidl C, Johnson N, Relander T, Telegenius A, et al. Genome-wide profiling of follicular lymphoma by array comparative genomic hybridization reveals prognostically significant DNA copy number imbalances. *Blood*2009 Jan 1;113(1):137-148.
- Glas AM, Knoops L, Delahaye L, Kersten MJ, Kibbelaar RE, Wessels LA, et al. Gene-expression and immunohistochemical study of specific T-cell subsets and accessory cell types in the transformation and prognosis of follicular lymphoma. *J Clin Oncol*2007 Feb 1;25(4):390-398.
- Carreras J, Lopez-Guillermo A, Roncador G, Villamor N, Colomo L, Martinez A, et al. High numbers of tumor-infiltrating programmed cell death 1-positive regulatory lymphocytes are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *J Clin Oncol*2009 Mar 20;27(9):1470-1476.
- Montoto S, Fitzgibbon J. Transformation of indolent B-cell lymphomas. *J Clin Oncol*2011 May 10;29(14):1827-1834.
- Young RC, Longo DL, Glatstein E, Ihde DC, Jaffe ES, DeVita VT, Jr. The treatment of indolent lymphomas: watchful waiting v aggressive combined modality treatment. *Semin Hematol*1988 Apr;25(2 Suppl 2):11-16.
- Lepage E, Sebban C, Gisselbrecht C, Coiffier B, Harousseau JL, Bryon PA, et al. Treatment of low-grade non-Hodgkin's lymphomas: assessment of doxorubicin in a controlled trial. *Hematol Oncol*1990 Jan-Feb;8(1):31-39.
- Rezvani AR, Storer B, Maris M, Sorrow ML, Agura E, Maziarz RT, et al. Nonmyeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation in relapsed, refractory, and transformed indolent non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*2008 Jan 10;26(2):211-217.
- Thomson KJ, Morris EC, Milligan D, Parker AN, Hunter AE, Cook G, et al. T-cell-depleted reduced-intensity transplantation followed by donor leukocyte infusions to promote graft-versus-lymphoma activity results in excellent long-term survival in patients with multiply relapsed follicular lymphoma. *J Clin Oncol*2010 Aug 10;28(23):3695-3700.
- Conconi A, Ponzio C, Lobetti-Bodoni C, Motta M, Rancoita PM, Stathis A, et al. Incidence, risk factors and outcome of histological transformation in follicular lymphoma. *Br J Haematol*2012 Apr;157(2):188-196.
- Ban-Hoefen M, Vanderplas MS, Kelly JL, Crosby-Thompson A, Abel GA, Czuczman MS, et al. Natural history of transformed Non-Hodgkin lymphoma in the rituximab era: analysis of the National Comprehensive Cancer Network (NCCN) NHL outcomes database. 54th ASH annual meeting2012.
- Link BK, Maurer MJ, Nowakowski GS, Ansell SM, Macon WR, Syrby SI, et al. Rates and outcomes of follicular lymphoma transformation in the rituximab era: a report from the University of Iowa/Mayo Clinic Spore Molecular Epidemiology Resource. 54th ASH annual meeting2012.

## Leucemia mieloide crónica: mirando hacia el futuro

COORDINADORES: JUAN CARLOS HERNÁNDEZ BOLUDA. *Servicio de Hematología y Oncología Médica. Hospital Clínico Universitario de Valencia*

MANUEL PÉREZ ENCINAS. *Servicio de Hematología y Hemoterapia. Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (A Coruña)*

Los excelentes resultados del tratamiento de la leucemia mieloide crónica (LMC) podrían dar a entender que todo está ya resuelto en el manejo de esta enfermedad. Sin embargo, obviamente esto no es así, y el presente simposio pretende, de hecho, abordar los aspectos más controvertidos o en fase de investigación en el tratamiento de la LMC. En primer lugar, la Dra. M. Copland expondrá la información disponible acerca de los mecanismos implicados en la resistencia de la *stem cell* leucémica al tratamiento con inhibidores selectivos de la tirosinocinasa BCR-ABL. Tratará de perfilar las posibles diferencias en la biología celular de la *stem cell* leucémica con respecto a la *stem cell* sana, cuya existencia podría permitir el desarrollo de tratamientos diferenciales. De hecho, mostrará los resultados preliminares del uso de fármacos específicos dirigidos frente a la *stem cell* leucémica de la LMC.

La segunda intervención, a cargo del Dr. F. Cervantes, se centrará en el estado actual del tratamiento de la LMC. En ella, se repasarán los resultados obtenidos en los ensayos clínicos con los diferentes inhibidores de BCR-ABL en primera línea, para finalmente abordar la discusión sobre cuál puede ser el mejor tratamiento inicial de la enfermedad en el momento actual.

A continuación, el Dr. J.L. Steegmann analizará si es posible curar la LMC con los fármacos disponibles, en base a la información proporcionada por los estudios de discontinuación y los datos propios del Registro Español de LMC (RELMC). Para acabar, esbozará las estrategias terapéuticas a explorar en los próximos años de cara a mejorar los resultados.

## Biology of the leukemic stem cell in chronic myeloid leukemia

DR MHAIRI COPLAND BSC HONS, MBChB, PhD, FRCP (UK), FRCPath  
*University of Glasgow. Institute of Cancer Sciences. Glasgow (UK)*

### Introduction

Chronic myeloid leukemia (CML) is a clonal myeloproliferative disorder which develops when a single, multipotent hematopoietic stem cell (HSC) acquires the Philadelphia (Ph) chromosome. This results in expression of the fusion gene product BCR-ABL, a constitutively active tyrosine kinase. The treatment of CML has been revolutionized in recent years with the introduction of tyrosine kinase inhibitors (TKIs; imatinib, nilotinib, dasatinib, bosutinib and ponatinib) which all show impressive rates of complete cytogenetic response (CCyR) in CML, particularly in chronic phase (CP). However, the majority of responding CML patients, even in CP, have detectable BCR-ABL transcripts which might arise from a population of quiescent CML stem cells not effectively targeted by TKIs.

### Characteristics of CML stem cells

The hierarchical organisation of CP CML hematopoiesis is very similar to normal hematopoiesis. The leukemic stem cell (LSC; CML “cell of origin”) is capable of self-renewal and produces progenitors and differentiated cells of myeloid and B cell lineages. The immunophenotype of CML LSC is thought to be akin to normal HSC with LSC being lin-CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>(<sup>1</sup>). However, recent studies have indicated that there may be novel leukemia-specific cell surface proteins in CML, e.g. interleukin-1 receptor accessory protein (IL1-RAP) capable of distinguishing candidate BCR-ABL<sup>+</sup> LSC from normal HSC(<sup>2</sup>). CML stem cells have increased proliferation, altered cell-cell adhesion, altered cell cycle kinetics, increased reactive oxygen species (ROS) levels compared to normal HSC and demonstrate growth factor independence with lack of apoptosis due to autocrine production of IL-3; reviewed in(<sup>3</sup>).

However, not all CML stem cells are in cell cycle – a quiescent (G<sub>0</sub>) cell fraction can be identified in peripheral blood or bone marrow specimens from pa-

tients with CML via CFSE tracking of cell division or by Hoechst 33342 / Pyronin Y staining even following culture in a proliferative cytokine cocktail(<sup>4</sup>). This population comprises approximately 0.5% of the total CD34<sup>+</sup> compartment and are capable of engrafting immunodeficient mice.

### Persistence of CML stem cells

There is mounting evidence that some CML stem cells escape the effects of TKIs. Firstly, CML stem cells have demonstrable resistance to TKI-mediated apoptosis, leading to their accumulation *in vitro*(<sup>5,6</sup>). Secondly, Bhatia *et al.* found that BCR-ABL<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup> cells, colony forming cells (CFC) and long term culture-initiating cells (LTC-IC) were present at a frequency of between 5 and 20% in CML patients that had achieved a CCyR on imatinib(<sup>7</sup>). Thirdly, occasional patients in CCyR or even with undetectable transcripts have relapsed directly to blast phase disease(<sup>8</sup>). Fourthly, in only around 50% of patients on prolonged imatinib therapy (more than 5 years) is BCR-ABL undetectable for long periods of time(<sup>9</sup>), and of the patients that do achieve undetectable transcript status, more than 60% relapse if imatinib is discontinued, as evidenced by the STIM study(<sup>10</sup>). Finally, recent studies by Chomel *et al.* using CFC and LTC-IC assays have shown that LSC persist in patients with sustained undetectable minimal residual disease (MRD)/complete molecular response(<sup>11</sup>).

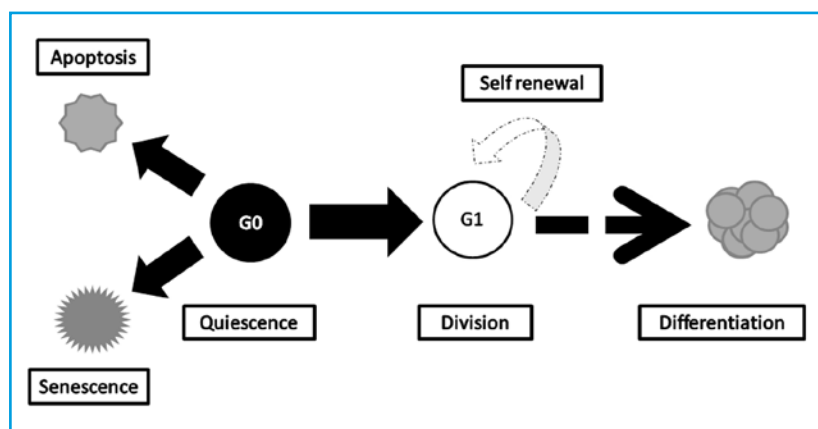
Various potential mechanisms have been suggested to explain CML stem cell persistence, including quiescence, low intracellular levels of TKI due to drug efflux, high levels of BCR-ABL expression or cooperative signalling via other related pathways(<sup>12</sup>). However, evidence is now emerging from *in vitro* and *in vivo* models to suggest that CML stem cells may not actually be dependent on BCR-ABL kinase signaling for survival(<sup>13</sup>). If this is the case then TKI inhibition alone will be unlikely to result in depletion of the leukemic clone and cure of the disease and attention will require to be focused on alternative targets.

## Targeting the CML stem cell

If, unlike their progeny, CML stem cells are not dependent on BCR-ABL signalling for survival, two questions arise: what are they dependent on and how might they be targeted? Intensive effort from various laboratories to better understand the biology of the CML LSC in CP and advanced phase disease has uncovered a multitude of important survival mechanisms. Investigation of these processes with a view to finding an Achilles heel in the CML stem cell has been the challenge in recent years. An interesting potential therapeutic strategy which is being aggressively pursued is the possibility of combining LSC-specific therapies with TKI to eliminate both the dividing progenitor cells and the quiescent CML stem cells (Figure 1). The remainder of this review will focus on some of these potential therapeutic combinations.

## Priming quiescent CML stem cells to enter cell cycle

One potential mechanism of eradicating quiescent CML stem cells is to force the cells to enter the cell cycle, which would then render them sensitive to TKI therapy. In order to test this hypothesis, an *in vitro* study was designed to determine whether exposure of CD34<sup>+</sup> CML cells<sup>(14)</sup> to continuous or intermittent granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), in combination with continuous or intermittent imatinib, resulted in a reduction in quiescent CML stem cells. After 12 days culture *in vitro*, imatinib (either intermittent or continuous) in combination with intermittent G-CSF resulted in a five-fold reduction in quiescent CML cells (CD34<sup>+</sup> CFSE<sup>max</sup>) compared with continuous imatinib alone (P<0.04).



**Figure 1.** Potential mechanisms for targeting the CML stem cell. These include increasing apoptosis by inhibition of survival pathways, encouraging cell senescence and driving quiescent cells into cell cycle, preventing or reducing self-renewal and/or increasing differentiation.

Thus, it was concluded that intermittent exposure of CML stem cells to G-CSF may enhance the effect of imatinib.

Based on these results a pilot randomized phase II clinical trial (EudraCT: 2004-000179-33) was performed to test the hypothesis that a valid therapeutic strategy to treat CML was to give pulsed imatinib (taken 3 weeks out of 4) alone or in combination with intermittent recombinant human G-CSF (given 3 times in week off imatinib), forcing the quiescent CML stem cells into cell cycle, and rendering them imatinib sensitive. Thus, this study had 3 arms; continuous imatinib (control arm), pulsed imatinib and pulsed imatinib in combination with intermittent G-CSF (experimental arms). Forty-five patients with CP CML who had already achieved CCyR were recruited<sup>(15)</sup>. However, compared to the continuous imatinib arm, after 12 months of trial therapy, there was no reduction in BCR-ABL transcript levels, as measured by qRT-PCR, in the two experimental arms (pulsed imatinib and pulsed imatinib plus G-CSF) compared to the continuous imatinib control arm.

## Therapeutic targeting of CML stem cells: BMS-214662

Early studies assessing the effects of TKIs on CML stem/progenitor cells *in vitro* showed that quiescent CML stem cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> cell cycle arrest accumulate in the presence of TKIs<sup>(5,6)</sup>. Therefore, small molecules which selectively target the quiescent CML stem cell were sought. BMS-214662 (Bristol-Myers Squibb) is a non-peptidomimetic cytotoxic farnesyltransferase inhibitor which inhibits H-ras and K-ras in the low nM range. However, its effects on CML stem cells are not thought to be via Ras inhibition. CD34<sup>+</sup> CML stem/progenitor cells were treated *in vitro* with BMS-214662 alone or in combination with TKI (dasatinib, imatinib) in both short and long-term cultures<sup>(16)</sup>. BMS-214662, alone or in combination with TKI resulted in a significant reduction in CFSE<sup>max</sup> CD34<sup>+</sup> CML cells and the virtual elimination of CML LTC-IC. Normal CD34<sup>+</sup> hematopoietic cells were relatively spared by BMS-214662, suggesting selectivity for leukemic cells. BMS-214662 demonstrated cytotoxicity against CML blast crisis stem/progenitor cells, particularly when combined with a TKI. Furthermore, the combination of BMS-

214662 plus dasatinib substantially reduced tumor size in K562 subcutaneous xenografts in mice compared to untreated and dasatinib only treated mice.

In terms of mechanism of action, BMS-214662 increased caspase-3 activity and resulted in mitochondrial damage as evidenced by loss of mitochondrial membrane potential, resulting in the selective apoptosis of CML stem cells<sup>(16)</sup>. BMS-214662 caused aberrant phosphorylation of CDK2, release of cytochrome C from the mitochondria to the cytoplasm and induced a conformational change in Bax<sup>(17)</sup>. These changes were associated with upregulation of protein kinase C $\beta$  and downregulation of the transcription factor E2F1. Unfortunately clinical studies with BMS-214662 have not progressed as further development of this promising small molecule inhibitor has been abandoned by the pharmaceutical industry.

### Targeting self-renewal of CML stem cells: SMO inhibition

Recent studies have indicated that the Hedgehog (Hh) pathway, a developmental pathway with roles in primitive and adult hematopoiesis, is activated in CML stem cells via upregulation of Smoothed (SMO), a seven-transmembrane domain receptor protein<sup>(18)</sup>. Thus, inhibition of SMO may be an effective therapeutic strategy to reduce the quiescent CML stem cell pool. LDE225 (Novartis Pharma) is a clinical grade SMO antagonist which has recently entered Phase 1 clinical trials in solid tumors. In our own recent studies, in collaboration with Professor Ravi Bhatia, City of Hope, Duarte, California, we have demonstrated that the Hh pathway is activated in CD34<sup>+</sup> CML stem/progenitor cells. LDE225 alone and in combination with nilotinib, inhibited the Hh pathway in CD34<sup>+</sup> CML cells and reduced LSC numbers and self-renewal capacity in *in vitro* assays as evidenced by reduced LTC-IC and CFC replating<sup>(19)</sup>. Importantly this combination had no effect on normal HSC. Combined LDE225 and nilotinib reduced CD34<sup>+</sup> CML cell engraftment in NSG mice<sup>(20)</sup>. EGFP<sup>+</sup>/SCLtTA/TRE-BCR-ABL mice treated with LDE225 and nilotinib had enhanced survival compared to untreated or single drug treated mice and there was reduced leukemia development in secondary transplant recipients. Our results have identified Hh pathway inhibition in combination with TKI as a potentially effective therapeutic regimen to eliminate CML stem cells, and show that targeting the Hh pathway using LDE225 in combination with nilotinib, effectively eliminates CML stem cells in *in vitro* and *in vivo* preclinical studies. This may be an important therapeutic advance in CML management. Indeed, a number of phase 1 clinical trials have been commenced combining TKI with

SMO inhibition; dasatinib plus BMS-833923 (NCT 01456676), dasatinib or bosutinib plus PF-04449913 (NCT 01218477), and nilotinib plus LDE225 (NCT 0095758). The results of our preclinical studies will be discussed.

### Identifying new therapeutic targets for CML stem cells

Very recently, we have undertaken functional assays and microarray studies to compare normal (n=3) and CML (n=12) lin-CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup> HSC. Functional studies demonstrate that CML LSC have significantly increased proliferation (14 fold expansion; P<0.001) compared to normal HSC (no expansion) after 5 days *in vitro* culture. In addition, equivalent numbers of CML LSC produce ~4-fold more colonies in CFC assays than normal HSC (329±56 versus 86±17 per 2,000 cells, respectively; P<0.05). Microarray studies using the HuGene 1.0ST array demonstrate altered expression of 1134 genes between CML LSC and normal HSC. Using Ingenuity Pathway Analysis software, the most significantly down-regulated genes in CML stem cells were involved with the molecular and cellular functions of cell cycle, cell assembly and organisation, cellular movement, cell death and DNA replication, recombination and repair. These results will be discussed.

### Conclusion

Chronic myeloid leukemia continues to be a disease which is very intensively studied and remains an excellent model for studying cancer stem cell/LSC biology. Although TKIs have dramatically improved the outcomes for CML patients, they are not curative in the majority, and current research is very much focussed on identifying novel therapeutic targets, particularly strategies which may target the quiescent LSC. This is thought to represent the approach which is most likely to cure CML. However, care needs to be taken that healthy normal stem cells are not damaged in the process. The use of genome-wide analyses and proteomic screens has identified huge differences in the regulation of CML stem cells compared to normal HSC. It is hoped that developing therapies to exploit these differences will result in the elimination of CML stem cells with minimal damage to normal tissues.

### Bibliography

1. Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM, Peault B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1992 Apr 1;89(7):2804-8. PubMed PMID: 1372992. Pubmed Central PMCID: 48751.

2. Jaras M, Johnels P, Hansen N, Agerstam H, Tzapogas P, Rissler M, et al. Isolation and killing of candidate chronic myeloid leukemia stem cells by antibody targeting of IL-1 receptor accessory protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010 Sep 14;107(37):16280-5. PubMed PMID: 20805474. Pubmed Central PMCID: 2941341.
3. Quintas-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2009 Feb 19;113(8):1619-30. PubMed PMID: 18827185.
4. Holyoake T, Jiang X, Eaves C, Eaves A. Isolation of a highly quiescent subpopulation of primitive leukemic cells in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 1999 Sep 15;94(6):2056-64. PubMed PMID: 10477735.
5. Copland M, Hamilton A, Elrick LJ, Baird JW, Allan EK, Jordanides N, et al. Dasatinib (BMS-354825) targets an earlier progenitor population than imatinib in primary CML but does not eliminate the quiescent fraction. *Blood*. 2006 Jun 1;107(11):4532-9. PubMed PMID: 16469872.
6. Graham SM, Jorgensen HG, Allan E, Pearson C, Alcorn MJ, Richmond L, et al. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to ST1571 in vitro. *Blood*. 2002 Jan 1;99(1):319-25. PubMed PMID: 11756187.
7. Bhatia R, Holtz M, Niu N, Gray R, Snyder DS, Sawyers CL, et al. Persistence of malignant hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission following imatinib mesylate treatment. *Blood*. 2003 Jun 15;101(12):4701-7. PubMed PMID: 12576334.
8. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2006 Dec 7;355(23):2408-17. PubMed PMID: 17151364.
9. Branford S, Seymour JF, Grigg A, Arthur C, Rudzki Z, Lynch K, et al. BCR-ABL messenger RNA levels continue to decline in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia treated with imatinib for more than 5 years and approximately half of all first-line treated patients have stable undetectable BCR-ABL using strict sensitivity criteria. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007 Dec 1;13(23):7080-5. PubMed PMID: 18056186.
10. Mahon FX, Rea D, Guilhot J, Guilhot F, Huguet F, Nicolini F, et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *The lancet oncology*. 2010 Nov;11(11):1029-35. PubMed PMID: 20965785.
11. Chomel JC, Bonnet ML, Sorel N, Bertrand A, Meunier MC, Fichelson S, et al. Leukemic stem cell persistence in chronic myeloid leukemia patients with sustained undetectable molecular residual disease. *Blood*. 2011 Sep 29;118(13):3657-60. PubMed PMID: 21791426.
12. Jiang X, Zhao Y, Smith C, Gasparetto M, Turhan A, Eaves A, et al. Chronic myeloid leukemia stem cells possess multiple unique features of resistance to BCR-ABL targeted therapies. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK*. 2007 May;21(5):926-35. PubMed PMID: 17330101.
13. Corbin AS, Agarwal A, Loriaux M, Cortes J, Deininger MW, Druker BJ. Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. *The Journal of clinical investigation*. 2011 Jan;121(1):396-409. PubMed PMID: 21157039. Pubmed Central PMCID: 3007128.
14. Jorgensen HG, Copland M, Allan EK, Jiang X, Eaves A, Eaves C, et al. Intermittent exposure of primitive quiescent chronic myeloid leukemia cells to granulocyte-colony stimulating factor in vitro promotes their elimination by imatinib mesylate. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006 Jan 15;12(2):626-33. PubMed PMID: 16428509.
15. Drummond MW, Heaney N, Kaeda J, Nicolini FE, Clark RE, Wilson G, et al. A pilot study of continuous imatinib vs pulsed imatinib with or without G-CSF in CML patients who have achieved a complete cytogenetic response. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK*. 2009 Jun;23(6):1199-201. PubMed PMID: 19262595.
16. Copland M, Pellicano F, Richmond L, Allan EK, Hamilton A, Lee FY, et al. BMS-214662 potently induces apoptosis of chronic myeloid leukemia stem and progenitor cells and synergizes with tyrosine kinase inhibitors. *Blood*. 2008 Mar 1;111(5):2843-53. PubMed PMID: 18156496.
17. Pellicano F, Copland M, Jorgensen HG, Mountford J, Leber B, Holyoake TL. BMS-214662 induces mitochondrial apoptosis in chronic myeloid leukemia (CML) stem/progenitor cells, including CD34+38- cells, through activation of protein kinase Cbeta. *Blood*. 2009 Nov 5;114(19):4186-96. PubMed PMID: 19738029.
18. Dierks C, Beigi R, Guo GR, Zirlik K, Stegert MR, Manley P, et al. Expansion of Bcr-Abl-positive leukemic stem cells is dependent on Hedgehog pathway activation. *Cancer cell*. 2008 Sep 9;14(3):238-49. PubMed PMID: 18772113.
19. Irvine DA, Zhang B, Allan EK, Holyoake TL, Dorsch M, Manley PW, et al. Combination of the Hedgehog Pathway Inhibitor LDE225 and Nilotinib Eliminates Chronic Myeloid Leukemia Stem and Progenitor Cells. *Blood*. 2009 Nov 20;114(22):580-1. PubMed PMID: WOS:000272725801608. English.
20. Zhang B, Irvine D, Ho YW, Buonamici S, Manley P, Holyoake TL, et al. Inhibition of Chronic Myeloid Leukemia Stem Cells by the Combination of the Hedgehog Pathway Inhibitor LDE225 with Nilotinib. *Blood*. 2010 Nov 19;116(21):227. PubMed PMID: WOS:000289662200515. English.



## Estado actual del tratamiento de la leucemia mieloide crónica

FRANCISCO CERVANTES REQUENA

*Servicio de Hematología. Hospital Clínic. Barcelona*

### Introducción

La leucemia mieloide crónica (LMC) es una neoplasia mieloproliferativa crónica caracterizada por la presencia de una alteración molecular en las células hemopoyéticas, el oncogén *BCR/ABL*, que codifica para una proteína con actividad tirosinocinasa aumentada, la proteína Bcr/Abl, responsable de la proliferación neoplásica<sup>(1)</sup>. En la mayoría de los casos la LMC se diagnostica en la fase crónica, que tiende a evolucionar a una fase aguda final o crisis blástica (CB), precedida en ocasiones por una fase de aceleración (FA). Durante décadas el tratamiento de la LMC ha sido fundamentalmente paliativo, mejorando la calidad de vida y prolongando modestamente la supervivencia, pero sin evitar la CB. El trasplante alogénico de progenitores hemopoyéticos (alo-TPH) sigue siendo la única terapéutica con capacidad curativa, si bien sólo es aplicable a una minoría de pacientes y conlleva una morbilidad y mortalidad no desdeñables<sup>(2)</sup>. La gran revolución en el tratamiento de la LMC fue la introducción de imatinib, primer inhibidor de la proteína Bcr/Abl, que permite obtener no sólo respuestas hematológicas y citogenéticas sino también moleculares, es decir, un estado de enfermedad mínima residual<sup>(3,4)</sup>. Dichas respuestas requieren de un tratamiento continuo y suelen ser duraderas, lo que evita la evolución a la CB en la mayoría de los pacientes y acerca su supervivencia a la de la población normal<sup>(5)</sup>. Tras la constatación de su eficacia en la mitad de los enfermos resistentes o con intolerancia a imatinib, los inhibidores de Bcr/Abl de segunda generación nilotinib y dasatinib han demostrado su superioridad frente a imatinib en el tratamiento de primera línea de la LMC en la obtención de respuestas más rápidas y profundas y en la prevención de la evolución a FA/CB<sup>(6,7)</sup>. Sin embargo, ello no se ha traducido en una mayor supervivencia, existiendo dudas respecto a sus posibles efectos secundarios a largo plazo<sup>(8,9)</sup>.

En la presente ponencia se resume el estado actual del tratamiento de primera y segunda línea de

la LMC, sin incluir los nuevos fármacos ni las nuevas estrategias terapéuticas, ya que serán objeto de una ponencia específica. Por motivos de espacio, no se incluye en el texto el papel del alo-TPH, si bien se comentará en la ponencia oral.

### Imatinib

Una vez comprobada la eficacia de imatinib en los pacientes con LMC en fase crónica resistentes a interferón, los resultados del estudio IRIS, al demostrar la superioridad de imatinib frente a interferón más Ara-C subcutáneo, sirvieron de base para su aprobación como tratamiento de primera línea de la LMC<sup>(4)</sup>. El seguimiento de los pacientes tratados inicialmente con imatinib ha permitido comprobar que cerca del 90% de ellos alcanzan una respuesta citogenética completa (RCC), y el 80% una respuesta molecular mayor (RMM), definida como una ratio < 0,1% de los transcritos de *BCR/ABL* en sangre periférica con respecto a un gel control<sup>(5,10)</sup>. La obtención de una RCC dentro de los 12-18 meses del inicio del tratamiento es la variable más sólidamente relacionada con la supervivencia. No obstante, el objetivo terapéutico debe ser la obtención en ese periodo de una RMM, pues ello se ha asociado a una mayor supervivencia libre de progresión. A largo plazo, el 40% de los pacientes tratados con imatinib consiguen un grado más profundo de respuesta molecular, la hasta hace poco llamada respuesta molecular completa, correspondiente a una ratio de BCR-ABL/gen control < 0,0032%, que equivale a una disminución de 4,5 logaritmos o más de la carga leucémica<sup>(10,11)</sup>. Aunque hasta el momento no se ha podido demostrar el beneficio de este grado de respuesta en la supervivencia, su obtención podría ser de interés, al hacer a los pacientes elegibles para estudios de interrupción del tratamiento<sup>(12)</sup>.

Imatinib es habitualmente bien tolerado. Durante el periodo inicial del tratamiento son frecuentes los efectos secundarios, especialmente los síntomas gas-

trointestinales, calambres musculares, dolores musculares u óseos y edema periorbitario. Dichos síntomas suelen remitir a medio plazo, aunque persisten en grado moderado en algunos pacientes. Bastante más infrecuentes son los efectos secundarios severos que obliguen a suspender definitivamente el tratamiento. El seguimiento a largo plazo de los pacientes ha permitido comprobar la seguridad de imatinib, al no aparecer nuevas complicaciones atribuibles al fármaco. No obstante, la disponibilidad de los inhibidores de segunda generación ha hecho que en algunos pacientes se cambie de imatinib a estos fármacos por la persistencia de efectos secundarios moderados que afectan a la calidad de vida.

Durante el tratamiento con imatinib alrededor del 8% de los pacientes evolucionan a FA o CB, fundamentalmente en los 3 primeros años, siendo rara dicha evolución a partir de entonces<sup>(5)</sup>. Otro 15% de los pacientes presentan resistencia primaria o secundaria a imatinib. Además, algunos abandonan el tratamiento por intolerancia aguda o crónica. Todo ello hace que, a largo plazo, el 35-40% de los pacientes tratados con imatinib deban recibir un inhibidor de tirosinocinasa de segunda generación<sup>(13)</sup>, lo que contribuye a la supervivencia global de los pacientes tratados inicialmente con imatinib.

Con el tratamiento continuado con imatinib, el 40% de los pacientes alcanzan una respuesta molecular profunda (RM<sup>4.5</sup>)<sup>(10,11)</sup>. Algunos estudios de interrupción de tratamiento, realizados en pacientes con respuesta molecular profunda mantenida al menos 2 años, han permitido comprobar que casi el 40% de ellos conservan dicha respuesta sin necesidad de reinstaurar el tratamiento, mientras que en el resto se observa un aumento progresivo de los transcritos, casi siempre en los primeros meses tras la interrupción<sup>(11,12)</sup>. En el momento actual hay en marcha diversos estudios para tratar de definir qué pacientes serían buenos candidatos a interrumpir el tratamiento.

Al objeto de optimizar el tratamiento con imatinib, se ha aumentado la dosis a 600 u 800 mg/día, lo que en general no se ha traducido en mejores resultados en cuanto a la evolución a FA/CB ni la supervivencia<sup>(14)</sup>. Por otra parte, se ha combinado imatinib con interferón alfa, obteniéndose un grado mayor de respuesta molecular pero sin que ello influya en la supervivencia<sup>(15)</sup>.

### Nilotinib y dasatinib

La mitad de los pacientes resistentes o intolerantes a imatinib responden a nilotinib y dasatinib, inhibidores de segunda generación más potentes que imatinib y, en el caso de dasatinib, con un espectro más amplio de inhibición de tirosinocinasas<sup>(16,17)</sup>. Dado que

en esta situación los dos fármacos proporcionan resultados similares, la elección de uno u otro vendrá determinada por la posible presencia de mutaciones con diferente sensibilidad (Tabla 1) o de comorbilidades que predisponen a la aparición de las toxicidades más frecuentes de cada fármaco. Con todo, cabe mencionar que en la mayoría de los pacientes no se da ninguna de estas circunstancias que pueden ayudar en la toma de la decisión.

**Tabla 1.** Principales mutaciones resistentes a dasatinib y nilotinib

Dasatinib	Nilotinib
T315I	T315I
F317L/V	Y253H
V299L	E255K/V
T315A	F359C/V

Los buenos resultados obtenidos con los inhibidores de segunda generación en el tratamiento de segunda línea sirvieron como base para su ensayo en primera línea. Tras comprobar su eficacia en estudios con pacientes seleccionados, se pusieron en marcha dos estudios de fase III que comparaban nilotinib y dasatinib con imatinib.

El estudio ENESTnd comparaba nilotinib a dos dosis diferentes (300 o 400 mg cada 12 horas) frente a imatinib (400 mg/día) como tratamiento de primera línea en 846 pacientes con LMC en fase crónica<sup>(6)</sup>. Ambas ramas de nilotinib se mostraron superiores a imatinib con respecto al objetivo primario, que era la tasa de RMM obtenida a los 12 meses del tratamiento, así como en la tasa de RCC, y dicha superioridad fue independiente del grupo de riesgo de Sokal. Un seguimiento más prolongado ha confirmado asimismo la superioridad de nilotinib en la obtención de respuestas moleculares profundas (MR<sup>4</sup> y MR<sup>4.5</sup>). Estas respuestas más precoces y profundas se han traducido en una menor tasa de evolución a FA/CB en los pacientes de las dos ramas de nilotinib que en los de imatinib (3,2% y 2,1% frente al 6,7%). De manera llamativa, prácticamente todos los pacientes que evolucionaron a FA/CB pertenecían a los grupos de riesgo intermedio y alto de Sokal, con la excepción de un enfermo de bajo riesgo tratado con nilotinib. Por otra parte, los pacientes de nilotinib presentaron con menor frecuencia mutaciones de BCR/ABL<sup>(18)</sup>, si bien la mayoría de las mutaciones aparecidas bajo imatinib eran sensibles a los inhibidores de segunda generación. De nuevo, casi todos los pacientes con mutaciones (35 de 38) pertenecían a los grupos de riesgo intermedio y alto. En cuanto a la supervivencia, por

el momento no hay diferencias entre los pacientes tratados con nilotinib o imatinib (Tabla 2). Los resultados del estudio ENESTnd sirvieron como base para la aprobación de nilotinib, a la dosis de 300 mg/12 horas, como tratamiento de primera línea de la LMC.

A los 4 años de seguimiento, aproximadamente un 30% de los pacientes de los tres brazos del estudio ENESTnd han abandonado el tratamiento inicial. En el caso de imatinib, dejó el tratamiento por progresión de la enfermedad un número mayor de pacientes que los de nilotinib, en quienes fue más frecuente el abandono por toxicidad. Nilotinib fue mejor tolerado desde el punto de vista hematológico por su menor frecuencia de neutropenia severa. En cuanto a los efectos secundarios extrahematológicos, a corto plazo la toxicidad de nilotinib fue comparable a la de imatinib, destacando la erupción cutánea y las alteraciones bioquímicas, tales como el aumento de enzimas pancreáticas (rara vez con pancreatitis clínica), hepáticos, bilirrubina y glucosa. A los 4 años, el 5,3% y el 6,9% de los pacientes tratados con nilotinib 300 y 400 mg/12 horas habían presentado episodios de isquemia coronaria o arteriopatía periférica, frente al 1,1% de los tratados con imatinib, complicaciones que ocurrieron por lo general en individuos con factores de riesgo vascular.

El estudio DASISION comparaba dasatinib, 100 mg/día, frente a imatinib, 400 mg/día, en 519 pacientes con LMC en fase crónica de nuevo diagnóstico<sup>(7)</sup>. A los 12 meses dasatinib fue superior a imatinib en cuanto al objetivo primario del estudio, que era la obtención de una RCC confirmada, si bien dicha diferencia desapareció a los 24 meses. Dasatinib también fue superior a imatinib en la obtención de RMM a los 12 meses, superioridad mantenida a los 3 años, junto con una mayor tasa de respuestas moleculares profundas. La frecuencia de evolución a FA/CB fue menor en el brazo de dasatinib (4,2%, frente al 6,1%), pero la diferencia no alcanzó significación estadística. Un porcentaje similar de pacientes de ambos bra-

zos presentaron mutaciones, predominando en el brazo de dasatinib la mutación T315I. Con el seguimiento actual no se han observado diferencias en la supervivencia global ni en la supervivencia libre de progresión entre los dos brazos (Tabla 2). Estos resultados han permitido la autorización de dasatinib en el tratamiento de primera línea de la LMC y se han visto confirmados en un estudio independiente que incluía 246 pacientes, en los que se observaron respuestas más precoces y profundas con dasatinib pero sin efecto en la supervivencia.

A los 3 años de seguimiento, alrededor del 30% de los pacientes de los dos brazos del estudio DASISION han abandonado el tratamiento inicial. Dasatinib provocó con mayor frecuencia plaquetopenia severa que imatinib. En cuanto a la toxicidad extrahematológica, cerca del 20% de los pacientes tratados con dasatinib desarrollaron derrame pleural, toxicidad característica de este inhibidor.

### Consideraciones finales: ¿qué fármaco elegir como tratamiento de primera línea de la LMC?

Existe en la actualidad un importante debate en cuanto a si el tratamiento de primera línea de la LMC debe seguir siendo imatinib (reservando los inhibidores de segunda generación para los pacientes con respuesta inadecuada o intolerancia), si empezar con un inhibidor de segunda generación en todos los pacientes o si la elección del fármaco inicial debería basarse en factores individuales (fundamentalmente, el grupo de riesgo y las comorbilidades). Al respecto, cabe decir que, si bien hay partidarios y detractores de cada una de estas tres posturas, no existe un dogma establecido. Así, los inhibidores de segunda generación superan a imatinib en el corto plazo. Sin embargo, su falta de superioridad en cuanto a la supervivencia (Tabla 2) y la inquietud sobre sus posibles efectos a largo plazo (fundamentalmente, la arteriopatía con nilotinib y los derrames pleurales y la hiperten-

**Tabla 2.** Tasas de respuesta y supervivencia a los 3 años en los estudios de comparación de nilotinib y dasatinib frente a imatinib como primera línea de tratamiento de la leucemia mieloide crónica

	Estudio ENESTnd			Estudio DASISION	
	Nilotinib 300 mg/12 h	Nilotinib 400 mg/12 h	Nilotinib 400 mg/24 h	Dasatinib 100 mg/24 h	Imatinib 400 mg/24 h
RMM	73%	70%	50%	68%	55%
RM <sup>4,5</sup>	32%	28%	15%	22%	12%
FA/CB*	3,2%	2,1%	6,7%	4,2%	6,1%
SLP	96,9%	98,3%	94,7%	91%	91%
SG	95,1%	97%	94%	94%	93%

RMM: respuesta molecular mayor; \*analizado según intención de tratamiento; SLP: supervivencia libre de progresión; SG: supervivencia global

sión arterial pulmonar con dasatinib) generan cierta reticencia a su uso indiscriminado en primera línea. En este sentido, el grupo de expertos de la European LeukemiaNet va a publicar las nuevas recomendaciones para el tratamiento de la LMC<sup>(19)</sup>, en las que no se aconseja ninguno de los tres fármacos en especial, sino que se hace énfasis en la obtención de unos objetivos terapéuticos estrictos (entre los que se incluye la respuesta molecular precoz) entre los 3 y los 12 meses del inicio del tratamiento, independientemente del fármaco escogido como tratamiento inicial.

En la práctica, la conducta a seguir dependerá en buena medida de las expectativas que tengamos en cada paciente. Éstas pueden oscilar desde alcanzar una respuesta molecular profunda y precoz para posibilitar la elegibilidad para estudios de interrupción del tratamiento (estrategia aún en fase de investigación) hasta la consecución de una RMM dentro del primer año de tratamiento, lo que aseguraría a los pacientes una supervivencia a largo plazo cercana al 100%.

## Bibliografía

- Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999; 341:164-172.
- Druker BJ, Talpaz M, Rasta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001; 344:1031-1037.
- Gratwohl A, Brand R, Apperley J, Crawley C, Ruutu T, Corradini P, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia in Europe 2006: transplant activity, long-term data and current results. An analysis by the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Haematologica* 2006; 91:513-521.
- O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, et al. The IRIS International study. Imatinib versus interferon and low-dose Ara-C in patients with newly-diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003; 348:994-1004.
- Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, et al. Five-year follow-up of imatinib therapy for newly diagnosed chronic myelogenous leukemia in chronic-phase. *N Engl J Med* 2006; 355:2408-2417.
- Saglio G, Kim DW, Issaragrisil S, le Coutre P, Etienne G, Lobo C, et al. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010; 362:2251-2259.
- Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, Cortes J, Shah S, Ayala M, et al. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 2010; 362:2260-2270.
- Kim TD, Rea D, Schwarz M, Grille P, Nicolini FE, Rosti G, et al. Peripheral arterial occlusive disease in chronic phase chronic myeloid leukemia patients treated with nilotinib or imatinib. *Leukemia* 2013 (Epub ahead of print).
- Montani D, Bergot E, Günther S, Savale L, Bergeron A, Bourdin A, et al. Pulmonary arterial hypertension in patients treated by dasatinib. *Circulation* 2012; 125:2128-37.
- Cervantes F, López-Garrido P, Montero MI, Jonte J, Martínez J, Hernández-Boluda JC, et al. Early intervention during imatinib therapy in patients with newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: a study of the Spanish PETHEMA group. *Haematologica* 2010; 95:1317-1324.
- Branford S, Yeung DT, Ross DM, Prime JA, Field CR, Altamura HK, et al. Early molecular response and female sex strongly predict stable undetectable BCR-ABL1, the criteria for imatinib discontinuation in patients with CML. *Blood* 2013 (Epub ahead of print).
- Mahon FX, Réa D, Guilhot J, Huguet F, Nicolini F, et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol* 2010; 11:1029-1035.
- De Lavallade H, Apperley JF, Khorashad JS, Milojkovic D, Reid AG, Bua M, et al. Imatinib for newly-diagnosed patients with chronic myeloid leukemia: incidence of sustained responses in an intention-to-treat analysis. *J Clin Oncol* 2008; 26:3358-3363.
- Cortes JE, Baccarani M, Guilhot F, Druker BJ, Branford S, Kim DW, et al. Phase III, randomized, open-label study of daily imatinib mesylate 400 mg versus 800 mg in patients with newly diagnosed, previously untreated chronic myeloid leukemia in chronic phase using molecular end points: tyrosine kinase inhibitor optimization and selectivity study. *J Clin Oncol* 2010; 28:424-430.
- Preudhomme C, Guilhot J, Nicolini FE, Guerci-Bresler A, Rigal-Huguet F, Maloisel F, et al. Imatinib plus peginterferon alfa-2a in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010; 363:2511-2521.
- Hochhaus A, Baccarani M, Deininger M, Apperley JF, Lipton JH, Goldberg SL, et al. Dasatinib induces durable cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase with resistance or intolerance to imatinib. *Leukemia* 2008; 22:1200-1206.
- Kantarjian HM, Giles F, Gattermann N, Bhalla K, Alimena G, Palandri F, et al. Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is effective in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase following imatinib resistance and intolerance. *Blood* 2007; 110:3540-3546.
- Hochhaus A, Saglio G, Larson RA, Kim DW, Etienne G, Rosti G, et al. Nilotinib is associated with a reduced incidence of BCR-ABL mutations vs imatinib in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Blood* 2013; 121:3703-3708.
- Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia 2013 (sometido para publicación).

## ¿Se puede curar la leucemia mieloide crónica? Estrategias actuales y futuras

JUAN LUIS STEEGMANN OLMEDILLAS

Servicio de Hematología. Hospital Universitario de La Princesa. Madrid

Entiendo por curación de una enfermedad aquel estado en el que ésta no es detectable por el método más sensible y específico posible, el paciente no recibe tratamiento contra ella, y la posibilidad de recaída es menor del 5%.

No voy a discutir el concepto de curación operativa (*operational cure*), acuñado por Goldman y Gordon, en el que un tratamiento continuado puede ofrecer este tipo de curación si anula la probabilidad de transformación y no genera resistencias<sup>(1)</sup>.

Mi opinión es que, si bien el tratamiento continuado con inhibidores de tirosinasa bcr-abl (ITK) disminuye la probabilidad de transformación, a medida que la respuesta se hace más profunda, no soluciona problemas importantes: la situación de enfermedad percibida, la carga económica, la tolerancia a largo plazo y la adherencia. Además, en tanto en cuanto haya enfermedad residual, la probabilidad de resistencia no será nula<sup>(2)</sup>.

Como médicos, debemos adoptar una postura ambiciosa en el tratamiento del cáncer, y nuestro objetivo debe ser la curación real, como he definido más arriba.

Si aplicamos esta definición a la leucemia mieloide crónica, parece claro que esta situación sólo la ofrece el trasplante alogénico de células madre (*stem*) y progenitores hemopoyéticos (en adelante, TPH). Lástima que ese poder curativo tenga que pagar el precio de una mortalidad en el primer año que es del orden del 25%<sup>(3)</sup>.

El TPH es la mezcla de dos métodos, uno brutal, la mielosupresión indiscriminada, y otro más sutil, que es su efecto inmunoterapéutico. Este efecto del TPH en la LMC ha sido demostrado por la menor probabilidad de recidiva en aquellos pacientes trasplantados con enfermedad injerto contra huésped (EICH, GVHD en inglés), y por el poder curativo de las infusiones de linfocitos de donante. Ambas son pruebas de la existencia de un efecto injerto contra leucemia (EICL, GVL en inglés).

La optimización del procedimiento del trasplante pasa por hacer que los acondicionamientos sean más

específicos, de manera que se estreche el foco sobre la célula madre leucémica, su progenie y el microambiente. Asimismo, pasa por conseguir maximizar el EICL, y minimizar la nociva y mortal EICH.

Mientras los investigadores intentaban minimizar la morbilidad del TPH, el imatinib se convirtió en la terapia de elección de la LMC<sup>(4,5)</sup>. Al contrario que el TPH, el imatinib ofrece especificidad y casi nula mortalidad tóxica.

Sin embargo, la pregunta es: ¿es posible curar la LMC sólo con ITK u otros fármacos?

Los inhibidores de BCR-ABL han basado su éxito en dos circunstancias: una natural, la gran dependencia de la célula LMC de la enzima BCR-ABL, y otra, fruto de la inteligencia de sus diseñadores, su especificidad. Al contrario que el TMO, los ITK son terapias muy específicas, pero poco activas inmunológicamente.

A mi modo de ver, los requisitos que se deberían cumplir para que los ITK fuesen curativos serían los siguientes:

En primer lugar, que la tasa de respuestas moleculares completas llegasen a ser más de un 50%. Para ello, necesitamos que el ITK dado sea muy citocida sobre los progenitores más comprometidos y su descendencia. En segundo lugar, que el compartimento de células *stem* leucémicas fuese disminuido y despoblado, de manera que la suspensión no conlleve recidiva.

En cuanto al primer requisito, el imatinib ha demostrado que es capaz de inducir respuestas moleculares completas (RMC), pero necesita bastantes años. En un estudio seminal del grupo australiano, se demostró que la probabilidad acumulada a los 5 años de una respuesta molecular de 4 logs (RM4) era del 62%, y la de 4,5 logs (RM4,5), del 37%<sup>(6)</sup>. En la experiencia del Registro Español de LMC (RELMLC), la probabilidad acumulada en pacientes tratados con imatinib en 1.ª o 2.ª línea, con una mediana de seguimiento de 7 años, fue del 51%<sup>(7)</sup>.

Los inhibidores de segunda generación son más potentes. Cuando se ha comparado imatinib con dasa-

tinib en pacientes en primera línea, se ha comprobado que la probabilidad acumulada de obtener a los 36 meses una RM4 era del 35% (vs. 22% con imatinib). Las cifras correspondientes para la RM4,5 fueron del 22% vs. 12%<sup>(8)</sup>. El nilotinib también es más potente: a 3 años, las probabilidades correspondientes para RM4 y RM4,5 fueron del 50% vs. 26%, y del 32% vs. 15%<sup>(9)</sup>. La experiencia del subestudio español del ensayo ENEST1st ha mostrado que los resultados con nilotinib pueden ser aún mejores. Al año de tratamiento, el porcentaje de pacientes que tuvieron (no se trata de probabilidad acumulada, sino de frecuencia real) una RM4 o una RM4,5 fue del 67% y el 35%, respectivamente<sup>(10)</sup>. Por lo tanto, estimamos que a los 36 meses de tratamiento más de la mitad de los pacientes estarán en una respuesta molecular de idéntica profundidad a la obtenida por el TPH.

Una vez obtenida esta respuesta molecular completa, necesitamos que se mantenga y se profundice. Para al menos mantenerla precisamos que el paciente tome la medicación. La imperfecta adherencia al tratamiento se da en un 30% de los pacientes, y es la principal causa de pérdida de la respuesta citogenética completa<sup>(11,12)</sup>. No sabemos si también lo es de la pérdida de la RMC, pero en el estudio del RELMC la RMC se mantenía sólo en un 45%\*.

Si la RMC continúa, puede ser por cuatro razones:

1. La primera, la depleción de progenitores leucémicos. Se ha comprobado que la curva de disminución de *BCR-ABL* es bifásica, siendo más rápida en el primer trimestre y más lenta después. La primera fase puede reflejar la muerte de células más maduras, y la segunda, la más lenta desaparición de un compartimento mieloide más inmaduro y resistente a imatinib<sup>(13)</sup>. Nuestros resultados muestran que el nilotinib

presenta un patrón de extinción similar, aunque más rápido (Figura 1).

2. La segunda, la extinción por agotamiento de la célula *stem* (*exhaustion*). Esta extinción podría venir dada por la coincidencia del estrés hemopoyético a la que se vería sometida una población de célula *stem* leucémica cuando su descendencia más madura está siendo eliminada por imatinib u otros ITK. Si en ese compartimento de células madre predominan las divisiones asimétricas (es decir, aquellas en que una célula madre da origen a una célula madre y una diferenciada) algunos autores postulan que las células *stem* podrían ser eliminadas sin necesidad de que el ITK actuase sobre ellas<sup>(14)</sup>.

3. La tercera razón de una RMC continuada sería que el tratamiento con ITK facilitase una reacción inmune antileucémica. Se ha comprobado que la aparición de linfocitos T o NK clonales es común en el tratamiento con dasatinib, y se asocia a mejor respuesta. Aunque el efecto no es cuantitativamente importante, se postula que revela una ruptura de la tolerancia hacia la leucemia<sup>(15)</sup>. Este efecto no está referido con otros ITK.

4. La cuarta vendría dada por acción directa de los fármacos sobre las células leucémicas. No parece muy probable. Se ha comprobado que las células *stem* son resistentes a imatinib<sup>(16)</sup>, por múltiples mecanismos<sup>(17)</sup>.

Puede ser que los primeros tres mecanismos sean los responsables de que la suspensión de imatinib tras un periodo prolongado de RMC no se siga de recaída molecular en un 40% de los casos<sup>(18,19)</sup>. De hecho, las variables que se han asociado con menor probabilidad de recidiva fueron la duración del tratamiento con imatinib, el no tener un alto riesgo de

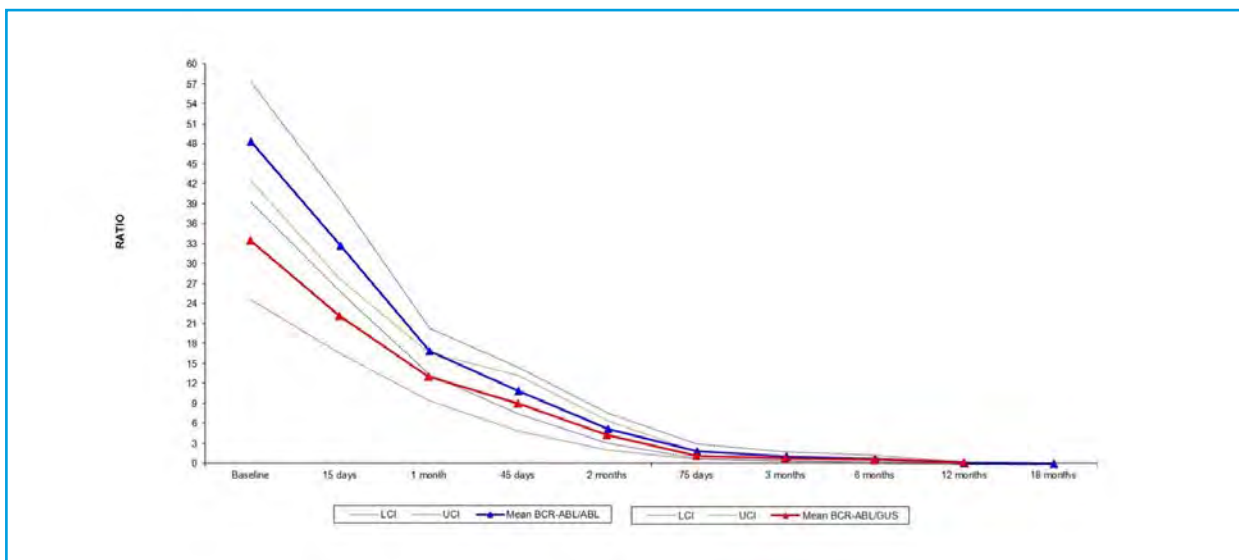


Figure 1. Disminución de la ratio BCR-ABL/ABL ( azul) y de la ratio BCR-ABL/GUS ( rojo) tras tratamiento con nilotinib en pacientes con LMC en fase crónica, de nuevo diagnóstico (ref. 10).

Sokal, y el IFN alfa previo<sup>(18-21)</sup>. Es curioso que el efecto beneficioso de la duración de la RMC sólo se ha detectado en un estudio<sup>(20)</sup>, pero puede ser que lo estricto de los criterios de inclusión en cuanto a la duración haya podido ocultar el efecto.

El efecto negativo del alto riesgo de Sokal podría explicarse por una mayor abundancia de células *stem* leucémicas en estos pacientes<sup>(22)</sup> o en mayor resistencia intrínseca. Por contra, el efecto beneficioso de la duración del tratamiento con imatinib o del IFN alfa previo se explicarían por depleción de progenitores y por efectos inmunológicos, respectivamente.

Por otra parte, sabemos que la inmensa mayoría de los pacientes que han recaído tras suspensión de imatinib, siempre que se hiciese tras una RMC muy duradera, han respondido con una nueva RMC. Desde mi punto de vista, esto significa que el tratamiento continuado con imatinib en pacientes con respuesta óptima disminuye la probabilidad de mutaciones que conlleven resistencia, y que el periodo libre de tratamiento no selecciona clones resistentes.

Dicho esto, ¿cual sería la estrategia que lleve a la curación de la LMC?

El primer requisito es una estrategia no conformista que tenga como objetivo la curación y no la terapia de mantenimiento.

Hemos de recordar que la presencia de BCR-ABL en una PCR de sangre significa que hay leucocitos que descienden de una célula madre que se dividía activamente y, por lo tanto, estaba sometida a riesgos mutacionales, que sabemos incrementados por el propio BCR-ABL.

Incluso en RMC (es decir, ARN *bcr-abl* indetectable), el grupo australiano ha demostrado que es posible tener la translocación *BCR-ABL* a nivel ADN. De 18 pacientes con RMC, 17 tuvieron en algún momento ADN positivo, si bien es cierto que el seguimiento con PCR para ADN no fue tan frecuente como el de ARN<sup>(23)</sup>.

Se precisa por tanto una estrategia dirigida a obtener la RMC. No voy a ofrecer una lista de fármacos que pueden ser de interés para potenciar el efecto de los ITK, ya que puede ser encontrada en otros artículos<sup>(2,24)</sup>.

Entre todas las posibles estrategias, la que a mí me resulta más prometedora es la que pasa por obtener una RMC (RM4,5 mejor que RM4) lo antes posible. Es de señalar que, en el estudio de suspensión coreano, el tiempo para obtener RMC estaba inversamente relacionado con la probabilidad de recaída<sup>(21)</sup>. Los inhibidores de segunda generación son la elección si se persigue este objetivo, y nuestros resultados con nilotinib en primera línea así lo demuestran. Para aquellos pacientes con alto riesgo, abogo por ensayos de asociación con inhibidores de la vía Hedgehog, la vía JakStat, los activadores de fosfatasa 2A, etc.

Creo que debemos hacer un esfuerzo por desentrañar de qué manera los mecanismos inmunológicos juegan un papel en la actividad antileucémica en la LMC, también con fármacos. Ahora es clásico hablar del IFN alfa como un agente inmunomodulador, pero sin embargo se desconoce cuál es la vía por la que actúa. La discrepancia de resultados entre los estudios de asociación entre imatinib e IFN alfa ha hecho que ésta no haya sido recomendada por el panel de ELN<sup>(25)</sup>. Por otra parte, creo que el efecto inmunomodulador del dasatinib debe ser estudiado y explotado, ya que apunta a un nuevo mecanismo antileucémico de un ITK, como es el de la ruptura de la anergia ante la enfermedad.

Nada nos hacía pensar hace unos años que las estrategias de suspensión de ITK iba a tener tanto éxito, y debemos a la inteligencia de FX Mahon esta ruptura de paradigma.

Debemos seguir esa ruta. El camino pasa por obtener una pronta obtención de la RMC, su consolidación, y el desentrañar los mecanismos, inmunológicos o de otro tipo, que permitan una suspensión segura y prolongada de la medicación. Es decir, la curación.

## Bibliografía

1. Goldman J, Gordon M. Why do chronic myelogenous leukemia stem cells survive allogeneic stem cell transplantation or imatinib: does it really matter? *Leuk Lymphoma* 2006; 47(1): 1-7.
2. Melo JV, Ross DM. Minimal residual disease and discontinuation of therapy in chronic myeloid leukemia: can we aim at a cure? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011; 2011: 136-42.
3. Pavlu J, Szydlo RM, Goldman JM, Apperley JF. Three decades of transplantation for chronic myeloid leukemia: what have we learned? *Blood* 2011; 117(3): 755-63.
4. Baccarani M, Saglio G, Goldman J, Hochhaus A, Simonsson B, Appelbaum F et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2006; 108(6): 1809-20.
5. Baccarani M, Cortes J, Pane F, Niederwieser D, Saglio G, Apperley J et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol* 2009; 27(35): 6041-51.
6. Ross DM, Hughes TP. How complete is "complete" molecular response in imatinib-treated chronic myeloid leukemia? *Leuk Lymphoma* 2008; 49(7): 1230-1.
7. Garcia-Gutierrez V, Maestro B, Casado LF, Perez-Encinas M, Massagué I, de Paz R et al. Early and deep responses to imatinib predict not only complete molecular response but also the probability for maintaining the response. Results of the CML Spanish National Registry (RELMC). *Haematologica* 2013; 98: 717.
8. Kantarjian HM, Shah NP, Cortes JE, Baccarani M, Agarwal MB, Undurraga MS et al. Dasatinib or imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: 2-year follow-up from a randomized phase 3 trial (DASISION). *Blood* 2012; 119(5): 1123-9.
9. Larson RA, Hochhaus A, Hughes TP, Clark RE, Etienne G, Kim DW et al. Nilotinib vs imatinib in patients with new-

- ly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia in chronic phase: ENESTnd 3-year follow-up. *Leukemia* 2012; 26(10): 2197-203.
10. Steegmann JL, Casado LF, Gómez-Casares MT, Rozman M, Echeveste MA, Garcia-Gutierrez V et al. Very Early Molecular Responses During The First Two Months Of Therapy Are Highly Predictive Of Deep Molecular Responses In Newly-Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia In Chronic Phase (CML-CP) Patients Treated Upfront With Nilotinib. The Spanish Substudy Of The ENEST1st Trial ASH 2013, submitted 2013.
  11. Noens L, van Lierde MA, De Bock R, Verhoef G, Zachée P, Berneman Z et al. Prevalence, determinants, and outcomes of nonadherence to imatinib therapy in patients with chronic myeloid leukemia: the ADAGIO study. *Blood* 2009; 113(22): 5401-11.
  12. Eliasson L, Clifford S, Barber N, Marin D. Exploring chronic myeloid leukemia patients' reasons for not adhering to the oral anticancer drug imatinib as prescribed. *Leuk Res* 2011; 35(5): 626-30.
  13. Roeder I, Horn M, Glauche I, Hochhaus A, Mueller MC, Loeffler M. Dynamic modeling of imatinib-treated chronic myeloid leukemia: functional insights and clinical implications. *Nat Med* 2006; 12(10): 1181-4.
  14. Lenaerts T, Pacheco JM, Traulsen A, Dingli D. Tyrosine kinase inhibitor therapy can cure chronic myeloid leukemia without hitting leukemic stem cells. *Haematologica* 2010; 95(6): 900-7.
  15. Kreutzman A, Juvonen V, Kairisto V, Ekblom M, Stenke L, Seggewiss R et al. Mono/oligoclonal T and NK cells are common in chronic myeloid leukemia patients at diagnosis and expand during dasatinib therapy. *Blood* 2010; 116(5): 772-82.
  16. Graham SM, Jorgensen HG, Allan E, Pearson C, Alcorn MJ, Richmond L et al. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood* 2002; 99(1): 319-25.
  17. Jiang X, Zhao Y, Smith C, Gasparetto M, Turhan A, Eaves A et al. Chronic myeloid leukemia stem cells possess multiple unique features of resistance to BCR-ABL targeted therapies. *Leukemia* 2007; 21(5): 926-35.
  18. Mahon FX, Rea D, Guilhot J, Guilhot F, Hugué F, Nicolini F et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol* 2010; 11(11): 1029-35.
  19. Ross DM, Branford S, Seymour JF, Schwarzer AP, Arthur C, Yeung DT et al. Safety and efficacy of imatinib cessation for CML patients with stable undetectable minimal residual disease: results from the TWISTER study. *Blood* 2013; 122(4): 515-22.
  20. Takahashi N, Kyo T, Maeda Y, Sugihara T, Usuki K, Kawaguchi T et al. Discontinuation of imatinib in Japanese patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 2012; 97(6): 903-6.
  21. Yhim HY, Lee NR, Song EK, Yim CY, Jeon SY, Shin S et al. Imatinib mesylate discontinuation in patients with chronic myeloid leukemia who have received front-line imatinib mesylate therapy and achieved complete molecular response. *Leuk Res* 2012; 36(6): 689-93.
  22. Mustjoki S, Richter J, Barbany G, Ehrencrona H, Fioretos T, Gedde-Dahl T et al. Impact of malignant stem cell burden on therapy outcome in newly diagnosed chronic myeloid leukemia patients. *Leukemia* 2013.
  23. Ross DM, Branford S, Seymour JF, Schwarzer AP, Arthur C, Bartley PA et al. Patients with chronic myeloid leukemia who maintain a complete molecular response after stopping imatinib treatment have evidence of persistent leukemia by DNA PCR. *Leukemia* 2010; 24(10): 1719-24.
  24. Rea D, Rousselot P, Guilhot J, Guilhot F, Mahon FX. Curing chronic myeloid leukemia. *Curr Hematol Malig Rep* 2012; 7(2): 103-8.
  25. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood* 2013.



## Las técnicas de laboratorio y sus avances en el contexto clínico: ¿qué debe saber el clínico?

COORDINADORAS: NEUS VILLAMOR CASAS. *Unidad de Hematopatología. Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Clínic. Barcelona*  
TERESA CABALLERO VELÁZQUEZ. *Servicio de Hematología. Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla*

En los últimos años hemos asistido a un gran avance en el diagnóstico de las hemopatías malignas, de manera que, en el momento actual, éste se basa en el estudio no de una sino de un conjunto de técnicas como son la morfología, la histología, la inmunohistoquímica, la genética y la biología molecular. Todos estos cambios han dado lugar a una enorme complejidad que requiere la aplicación de diversos conceptos para llegar a un diagnóstico integrado, evitando la interpretación de dichas técnicas de manera independiente. En este simposio se pretende establecer, de la mano de expertos en la materia, el papel de estas técnicas en la rutina clínica actual, así como las posibles perspectivas de futuro tanto de la histología y de la citometría como de la genética.

En la primera conferencia, la Dra. Rozman nos expondrá las mejoras técnicas en el procesamiento de la biopsia ósea que permiten realizar técnicas de biología molecular y cuál es el papel actual de la biopsia ósea en el diagnóstico, estudio de extensión y seguimiento de los pacientes con neoplasias hematológicas mieloides y linfoides. La citometría de flujo es una herramienta que nos permite definir la línea celular y el estadio madurativo y que se ha convertido en los últimos años en una técnica de laboratorio imprescindible en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes.

El Dr. Orfao nos sintetizará los últimos avances en este campo que permiten disponer de una técnica estandarizada, fruto del trabajo cooperativo de grupos de trabajo internacionales, y que requieren un nuevo enfoque en el laboratorio. Además, nos hablará de los recientes avances en el conocimiento de la hematopoyesis normal y patológica y del uso de nuevas y potentes herramientas para su estudio que posiblemente tendrán en un futuro próximo un fuerte impacto en la rutina clínica. El tercer pilar del diagnóstico hematológico lo constituye la citogenética, que, desde su primera aportación con la integración del primer marcador cromosómico, ha ido adquiriendo importancia a la hora de establecer clonalidad, proporcionarnos una herramienta pronóstica y en la identificación de dianas terapéuticas que nos permiten acercarnos a la deseada medicina personalizada.

En la tercera conferencia, dedicada a la citogenética y biología molecular, el Dr. Cigudosa nos hablará del estado actual de estas técnicas en el diagnóstico de las distintas hemopatías, de la relevancia del desarrollo de herramientas más precisas y potentes en los últimos años y de su posible incorporación en la actividad clínica.

La rapidez del avance científico en el momento actual nos pone de manifiesto la necesidad de mantener una continua revisión de nuestros conocimientos y de la elaboración de guías que unifiquen nuestros criterios. En este simposio disponemos de la oportunidad de discutir con especialistas de reconocido prestigio la mejor manera de interpretar y aplicar la información que obtenemos a partir de las distintas técnicas disponibles y las próximas incorporaciones a la práctica clínica.

## La biopsia ósea en la hematología actual

MARÍA ROZMAN JURADO

Consultora senior. Sección de Hematopatología. Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Clínic. IDIBAPS. Universidad de Barcelona

### Introducción

La histopatología de la médula ósea ocupa un lugar preeminente en la práctica hematológica. Sin embargo, esto no era así hasta 1980, cuando Hernández-Nieto y Rozman<sup>(1)</sup> sentenciaron “afortunadamente la técnica ha entrado por fin a formar parte del arsenal diagnóstico cotidiano en manos del hematólogo, y ello desde hace sólo dos o tres años”. Ya en aquella época apuntaban que la biopsia medular tiene una característica especial, pues constituye un área puente entre la anatomía patológica y la hematología, que en ocasiones “parecen hablar idiomas distintos”. En los tiempos actuales suele darse una colaboración exquisita entre patólogos y hematólogos en esta materia, lo que redundará en un enriquecimiento para ambos y en definitiva en beneficio del paciente<sup>(1,2)</sup>. Además, en los últimos años hemos asistido a grandes avances en la hematología, lo que ha dado lugar a que el papel de la biopsia medular haya experimentado una serie de cambios. Dichos cambios afectan tanto a aspectos técnicos como a su utilización en la práctica diaria, tanto en las neoplasias linfoides como en las mieloides.

### Aspectos técnicos

El procedimiento de extracción de la biopsia medular ha mejorado gracias a la introducción de los sistemas atrapamuestras en el diseño del trocar de Jamshidi<sup>(2)</sup>. Con la utilización de estos nuevos trocates se evita el movimiento de tracción lateral, que además de poco confortable para el paciente podía conducir a la rotura de dicho trocar en el interior del hueso. Los nuevos sistemas simplifican, acortan y hacen menos desagradable la extracción de la biopsia y permiten la obtención de un cilindro de más calidad. Además, en algunos centros se ha implementado el empleo sistemático de sedación empleando las combinaciones de uso habitual en otras

pruebas invasivas (hipnóticos de acción corta como el propofol, más morfínicos de acción ultracorta, como el remifentanilo), lo que ha supuesto un auténtico paso adelante en lo que respecta al confort del paciente.

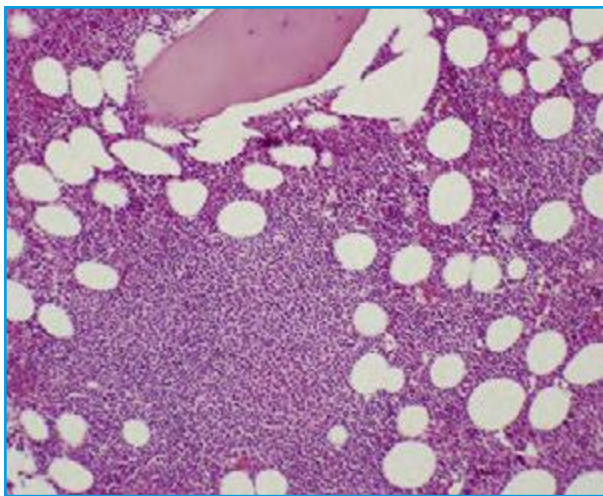
Sin embargo, los avances más relevantes en esta área se han producido en el campo de las técnicas aplicables sobre el tejido obtenido. Las técnicas inmunohistoquímicas son hoy en día imprescindibles para el diagnóstico hematopatológico<sup>(3)</sup>, y disponemos de un número creciente de anticuerpos monoclonales que funcionan en cortes de parafina. Estos anticuerpos nos permiten determinar el origen de las células objeto de estudio (linfoide, mieloide, etc.) y más recientemente nos permiten también detectar alteraciones genéticas de dichas células<sup>(3)</sup>. Es el caso de la mutación de nucleofosmina (NPM1) en las leucemias mieloides agudas; la tinción desarrollada por el grupo del Dr. Falini detecta inmunohistoquímicamente la deslocalización de la proteína NPM, que en caso de mutación se desplaza al citoplasma celular, mientras que en caso contrario queda restringida al núcleo de la célula<sup>(4)</sup>. En los últimos años también estamos asistiendo a un gran avance en la aplicación de técnicas de hibridación *in situ* a cortes de parafina. Estas técnicas nos permiten detectar la implicación tanto de alteraciones genéticas (p. ej.: hibridación *in situ* fluorescente para IgH/MYC, reacción en cadena de la polimerasa para IgH) como de virus (VEB, HHV8) en la patogenia de algunas hemopatías.

Pero para poder utilizar adecuadamente estas nuevas herramientas es necesario que el tejido medular esté adecuadamente preservado a nivel de proteína y ADN. Ello ha obligado a estandarizar al máximo el proceso de fijación. Si antiguamente las biopsias se fijaban de 2 a 4 días, con resultados aleatorios de las tinciones inmunohistoquímicas, en los últimos años hemos conseguido resultados homogéneos ajustando la fijación a 24 horas; más recientemente la fijación en formol durante 3 horas se ha mostrado idónea para la aplicación de hibridación *in situ* o PCR.

## Neoplasias linfoides

La biopsia medular se considera imprescindible para el diagnóstico y/o estadiaje de los síndromes linfoproliferativos<sup>(1-3)</sup> (Figura 1). El patrón de afectación medular es bastante característico de cada entidad, y la médula ósea es en ocasiones el tejido donde se establece el primodiagnóstico de la enfermedad. Además, la afectación medular *per se* confiere peor pronóstico a la mayoría de los linfomas, y el grado de infiltración y su patrón también tienen valor pronóstico (por ejemplo, el patrón de infiltración difuso confiere mal pronóstico en pacientes con leucemia linfática crónica)<sup>(4,5)</sup>.

En los últimos años algunas de estas afirmaciones han dejado de ser tan categóricas. Continuando a modo de paradigma con el ejemplo de la leucemia linfática crónica, el diagnóstico se establece hoy en día en la sangre periférica, en base a la citología y un perfil fenotípico característico, y su pronóstico, aunque la clasificación en estadios clínicos sigue teniendo gran valor, se ajusta de manera cada vez más precisa en base a las alteraciones biológicas<sup>(6)</sup>. Para ello nos ayudamos de un número creciente de técnicas complementarias. La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) detecta anomalías citogenéticas en el 85% de los pacientes con LLC, y las deleciones de 17p y de 11q confieren mal pronóstico de forma independiente. La detección de la hipermutación somática de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgVH) por secuenciación, y sobre todo su indicador indirecto por citometría de flujo, ZAP70, nos han permitido conocer que aquellos pacientes con gen IgVH no mutado suelen tener



**Figure 1.** Biopsia medular en un caso de leucemia linfática crónica en la que se muestra un patrón infiltrativo mixto. Se observa un agregado linfóide de localización centromedular, junto a infiltración intersticial por linfocitos. Tinción de hematoxilina-eosina.

citogenética adversa, requieren tratamiento precozmente y tienen supervivencia más corta que aquellos que lo tienen mutado<sup>(6)</sup>. Más recientemente por técnicas de secuenciación masiva hemos encontrado nuevas mutaciones en la LLC, entre ellas las de SF3B1 y NOTCH1, presentes en alrededor de un 10% de los pacientes con estadios precoces de la enfermedad y asociadas a mal pronóstico<sup>(7,8)</sup>. Por último, actualmente hemos observado diferentes patrones de metilación de ADN en la LLC que podrían tener relevancia clínica<sup>(9)</sup>. La biopsia medular, imprescindible hace unos años para establecer el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad, se reserva ahora fundamentalmente para evaluar la hematopoyesis antes y después del tratamiento, orientando los posibles mecanismos fisiopatológicos de la anemia y la trombocitopenia o detectando posibles hemopatías secundarias<sup>(5,10)</sup>. Un estudio muy reciente concluye que el patrón de infiltración medular se asocia al estado mutacional de IgHV, aunque pierde su valor pronóstico independiente en el estudio multiparamétrico a favor del estadio clínico y el estado mutacional de IgHV<sup>(10)</sup>.

Las técnicas de secuenciación masiva están generando también información de gran utilidad para el diagnóstico de otras neoplasias linfoides que actualmente se basa fundamentalmente en la biopsia medular. Esto ha ocurrido con la demostración de la mutación de BRAF V600E en la tricoleucemia, en la cual la escasez de células neoplásicas en sangre periférica puede dificultar su diagnóstico a pesar de tener una morfología y un fenotipo característicos<sup>(11)</sup>. La mutación de BRAF puede estudiarse ya mediante inmunohistoquímica<sup>(12)</sup> y también mediante PCR cuantitativa aleloespecífica, y existe un inhibidor de BRAF utilizado en otras neoplasias que podría ensayarse en esta enfermedad. Algo parecido sucede con la mutación de MYD88 L265P en el linfoma linfoplasmocítico, al parecer bastante característica de esta entidad de difícil diagnóstico debido a que posee alteraciones clínico-biológicas poco específicas<sup>(13,14)</sup>. Es posible que en un futuro no muy lejano podamos detectar fácilmente estas alteraciones en los linfocitos de la sangre periférica, pudiendo prescindir de la biopsia medular, o que por el contrario estudiemos estas mutaciones por inmunohistoquímica, necesitando entonces la biopsia.

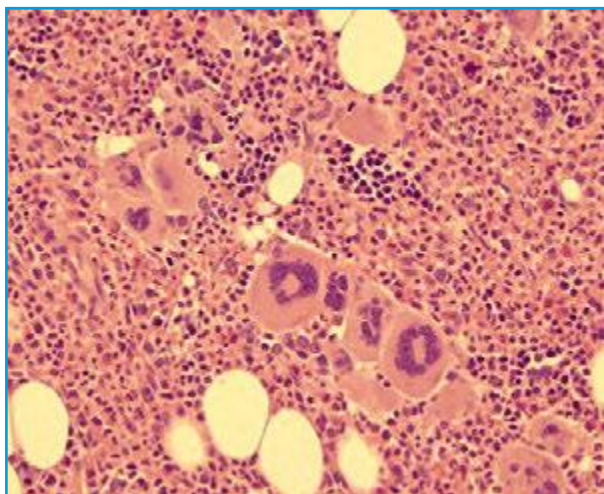
El desarrollo de nuevos fármacos cada vez más efectivos para el tratamiento de las neoplasias linfoides conlleva la necesidad de evaluar con mayor precisión la enfermedad residual al finalizar el mismo. Así, en la leucemia linfática crónica la enfermedad residual se evalúa por citometría de flujo, mediante la cual somos capaces de detectar una célula patológica de entre  $1 \times 10^{-4}$  normales<sup>(15)</sup>, por lo que la biopsia de médula no se suele practicar de manera rutinaria para este fin. En este contexto, un cambio

relativamente reciente que afecta a la interpretación de la biopsia en los pacientes con linfoma es el uso terapéutico de anticuerpos monoclonales como anti-CD20. Cabe señalar que su aplicación dificulta la evaluación de la persistencia de enfermedad por técnicas inmunohistoquímicas, por lo que es recomendable utilizar más de un marcador de línea B para este objetivo. Por otro lado, estas técnicas permiten testar la posibilidad de nuevas dianas terapéuticas (por ejemplo, anti-CD22 o el anteriormente citado inhibidor de BRAF), añadiendo una nueva utilidad a la biopsia medular.

## Neoplasias mieloides

La biopsia medular era clásicamente la técnica de elección para el diagnóstico de las neoplasias mieloproliferativas crónicas<sup>(1,2)</sup> (Figura 2). Hace ya algunos años, con la introducción del primer inhibidor de tirosín-quinasas masivamente utilizado, imatinib para la leucemia mieloide crónica (LMC), el estado de la enfermedad se evalúa perfectamente estudiando por PCR-cuantitativa la cantidad de transcritos del reordenamiento BCR/ABL en la sangre de los pacientes. Es por ello por lo que la indicación de realizar una biopsia medular es hoy en día anecdótica.

Sin embargo, el desarrollo de nuevos inhibidores de tirosín-quinasas ha conducido a situaciones dispares en el resto de las neoplasias mieloproliferativas crónicas clásicas, las Filadelfia-negativas<sup>(3,16)</sup>. Si bien la biopsia medular se consideraba de elección para el diagnóstico de todas ellas, desde el descubrimiento de las mutaciones de JAK2 el panorama ha cambiado totalmente. Así, hoy en día la histología de la médula no se considera imprescindible para muchos casos de policitemia vera (es un crite-



**Figure 2.** Biopsia medular en un caso de mielofibrosis primaria. Panmielosis y agregados densos de megacariocitos atípicos. Tinción de hematoxilina-eosina.

rio menor; no es necesaria si se cumplen los dos criterios mayores de poliglobulia y mutación de JAK2, y uno menor, la disminución de eritropoyetina sérica). Por el contrario, hace unos años el hematólogo clínico podía retrasar en ocasiones la realización de la biopsia ante la sospecha de trombocitemia esencial o mielofibrosis primaria, a la espera de que el cuadro clínico estuviera perfectamente establecido, pues el tratamiento existente era fundamentalmente sintomático o preventivo. Sin embargo, la reciente incorporación de los inhibidores de JAK al arsenal terapéutico obliga a evaluar la histología medular de manera más precoz. Además, la evaluación de la efectividad de estos medicamentos requiere realizar biopsias secuenciales. No sólo eso; también es necesario que el diagnóstico de los pacientes así tratados sea establecido de manera homogénea para evaluar los resultados de forma consistente. Salvo contadas excepciones, el diagnóstico histopatológico de la biopsia medular lo establece el patólogo. Para conseguir el objetivo de diagnósticos consistentes y homogéneos es imprescindible que exista un diálogo fluido entre el hematólogo responsable del paciente y el patólogo que interpreta la biopsia. En los últimos meses he tenido la oportunidad de coordinar un grupo de hematólogos y patólogos encargados de facilitar esta tarea. Los miembros de este grupo estamos elaborando unas guías para estandarizar el informe de la biopsia de médula ósea en las neoplasias mieloproliferativas crónicas, con especial énfasis en el diagnóstico diferencial entre mielofibrosis primaria y el resto de entidades.

En este contexto las técnicas de secuenciación masiva también nos están aportando información relevante; el hallazgo de mutaciones en SF3B1 no sólo en la LLC, sino también de forma característica en la anemia refractaria sideroblástica<sup>(17)</sup>, ha llevado a que se esté estudiando su implicación en la anemia refractaria sideroblástica con trombocitosis, entidad a caballo entre las neoplasias mielodisplásicas y las mieloproliferativas y cuyo principal diagnóstico diferencial es con la mielofibrosis primaria. De nuevo los avances científicos pueden hacernos cambiar nuestros algoritmos diagnósticos.

## Conclusiones

En conclusión, la biopsia medular constituye una herramienta de la que nos servimos para el manejo de nuestros pacientes. Puede ser útil tanto para el establecer el diagnóstico como para evaluar el pronóstico, la enfermedad residual o conocer nuevas posibles dianas terapéuticas. Además es una herramienta dinámica, es decir, su utilización se modifica en el tiempo adaptándose a los avances que se producen en nuestra especialidad.

## Agradecimientos

*A todos mis compañeros de la Sección de Hematopatología y del Servicio de Hematología Clínica, los miembros del Grupo Catalán y del Grupo Español de Citología y los del Club Español de Linfomas. A la empresa Novartis por el soporte logístico al grupo de trabajo de hematólogos-patólogos.*

## Bibliografía

1. L.Hernández-Nieto y C. Rozman. Biopsia medular en la clínica hematológica, Salvat Editores S.A., Barcelona 1980.
2. Hernández-Nieto L. Biopsia de la médula ósea. Perspectiva clínico-patológica. Acción Médica S.A. y Fundación Española de Hematología y Hemoterapia, Madrid, 2006.
3. Swerdlow,S.H., Campo,E., Harris,N.L., Jaffe,E.S., Pileri,S., Stein,H., Thiele,J., & Vardiman,J.W. (2008) WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues, 4th edn, IARC Press, Lyon, France.
4. Pasqualucci L, Liso A, Martelli MP, Bolli N, Pacini R, Tabarini A, et al. Mutated nucleophosmin detects clonal multilineage involvement in acute myeloid leukemia: Impact on WHO classification. *Blood*. 2006 Dec 15;108(13):4146-55. Epub 2006 Aug 22.
5. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia. A report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008 Jun 15;111(12):5446-56.
6. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2003; 348(18):1764-75.
7. Quesada V, Conde L, Villamor N, Ordóñez GR, Jares P, Basaganyas L, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*. 2011 Dec 11;44(1):47-52.
8. Villamor N, Conde L, Martínez-Trillos A, Cazorla M, Navarro A, Beà S, et al. NOTCH1 mutations identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with high risk of transformation and poor outcome. *Leukemia*. 2012 Dec 6.
9. Kulis M, Heath S, Bibikova M, Queirós AC, Navarro A, Clot G, et al. Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*. 2012 Nov;44(11):1236-42.
10. Baliakas P, Kanellis G, Stavroyianni N, Fameli M, Anagnostopoulos A, Stamatopoulos K, et al. The role of bone marrow biopsy examination at diagnosis of chronic lymphocytic leukemia: a reappraisal. *Leuk Lymphoma*. 2013 Mar 13. [Epub ahead of print]
11. Tiacci E, Trifonov V, Schiavoni G, Holmes A, Kern W, Martelli MP, et al. BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med*. 2011 Jun 16;364(24):2305-15.
12. Andrulis M, Penzel R, Weichert W, von Deimling A, Capper D. Application of a BRAF V600E mutation-specific antibody for the diagnosis of hairy cell leukemia. *Am J Surg Pathol*. 2012 Dec;36(12):1796-800.
13. Treon SP, Xu L, Yang G, Zhou Y, Liu X, Cao Y, et al. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia. *N Engl J Med*. 2012 Aug 30;367(9):826-33.
14. Jiménez C, Sebastián E, Del Carmen Chillón M, Giraldo P, Mariano Hernández J, Escalante F, et al. MYD88 L265P is a marker highly characteristic of, but not restricted to, waldenström's macroglobulinemia. *Leukemia*. 2013 Feb 28.
15. Rawstron AC, Villamor N, Ritgen M, Böttcher S, Ghia P, Zehnder JL, et al. International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*. 2007 May;21(5):956-64. Epub 2007 Mar 15.
16. Barosi G, Mesa RA, Thiele J, Cervantes F, Campbell PJ, Verstovsek S, et al. Proposed criteria for the diagnosis of post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a consensus statement from the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Leukemia*. 2008 Feb;22(2):437-8.
17. Malcovati L, Papaemmanuil E, Bowen DT, Boultonwood J, Della Porta MG, Pascutto C, et al. Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011 Dec 8;118(24):6239-46.

## Avances tecnológicos y conceptuales en citometría de flujo

JUAN FLORES-MONTERO, ANTONIO LÓPEZ, JUANA CIUDAD, JULIA ALMEIDA, MARTÍN PÉREZ-ANDRÉS, SERGIO MATARRAZ, SUSANA BARRENA, ARANCHA RODRÍGUEZ CABALLERO, CRISTINA TEODOSIO, QUENTIN LECREVISSEI, LOURDES MARTÍN, CARLOS FERNÁNDEZ-JIMÉNEZ, PALOMA BÁRCENA, LUZ SÁNCHEZ, ROSA ANA RIVAS-AMOEDO, MIRIAM FIERRO, ALBERTO ORFAO  
*Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC-CSIC). Departamento de Medicina y Servicio Central de Citometría. Universidad de Salamanca (USAL) e Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL). Salamanca*

### Introducción

La citometría de flujo (CMF) como técnica diagnóstica cuenta ya con una larga tradición en el campo de la hematología clínica, donde tiene probada utilidad en el diagnóstico, clasificación y la evaluación de la respuesta al tratamiento de pacientes con hemopatías malignas<sup>(1-22)</sup>. Esto es debido a que ya desde las primeras etapas de su desarrollo en la segunda mitad del siglo XX la citometría de flujo ha demostrado ser una tecnología particularmente adaptada al estudio de células hematopoyéticas normales, reactivas y malignas. Desde la década de 1970 al año 2000, la aplicación de la citometría de flujo al estudio de las hemopatías se ha beneficiado de las tecnologías de producción masiva de anticuerpos monoclonales (i.e. tecnología de hibridomas), de la disponibilidad de un abanico progresivamente más amplio de reactivos de calidad contrastada y de un número creciente de fluorocromos técnicamente compatibles. Todo ello ha contribuido a que el inmunofenotipo de las células tumorales por citometría de flujo se haya convertido en este periodo en un pilar básico de la clasificación diagnóstica de las leucemias linfoblásticas (LLA) y mieloblásticas (LMA) agudas y de los síndromes linfoproliferativos crónicos (SLPC) B, T y NK<sup>(1,18,20-28)</sup>.

Desde finales de los años 1980, la explotación creciente de las capacidades de análisis multiparamétrico de la citometría de flujo ha conducido a la necesidad de identificar correctamente las poblaciones celulares objeto de estudio. Por ello, han adquirido especial relevancia las combinaciones de anticuerpos en las que, junto a reactivos cuyo objeto es la identificación de las células tumorales, se combinan marcadores útiles para su caracterización fenotípica; si se emplean varias alícuotas para el estudio de una misma muestra, es necesario por tanto identificar de forma específica (y sensible) las células tumorales en cada alícuota de la muestra, para su posterior recuento y caracterización fenotípica. El conocimiento progresivamente creciente de los perfiles fenotípicos

de las células hematopoyéticas y linfoides normales ha permitido identificar un número cada vez mayor de fenotipos aberrantes asociados a leucemia/linfoma. Con ello se ha extendiendo la utilidad clínica de la citometría desde la clasificación de las LLA, LMA y SLPC, al estudio de las gammapatías monoclonales (GM) y los síndromes mielodisplásicos (SMD) a su rastreo diagnóstico y a la evaluación de los efectos del tratamiento –i.e. monitorización de la posible persistencia de niveles mínimos ( $< 10^{-3}$ ) de células tumorales resistentes al tratamiento o enfermedad mínima residual (EMR)–.

En las últimas décadas, el potencial de los análisis multiparamétricos por citometría de flujo de las células hematopoyéticas se ha visto incrementado de forma sustancial, entre otros, por tres desarrollos: 1) la posibilidad de evaluar simultáneamente un número creciente de parámetros en células individuales, 2) la mayor velocidad de análisis de los citómetros de flujo digitales y, como consecuencia de todo ello, 3) la gran transformación que ha sufrido el análisis de los datos, incluidas las herramientas de representación y visualización de los mismos. De cara al futuro, resulta especialmente prometedora la contribución de la función de separación de poblaciones celulares desarrollada técnicamente hace ya más de 40 años<sup>(29-31)</sup>.

A continuación revisaremos los avances tecnológicos y conceptuales que han ocurrido en la última década en áreas como la instrumentación, los reactivos y técnicas de preparación de muestras y el análisis, la representación y visualización de datos de citometría.

### Avances técnicos en instrumentación y los citómetros de flujo digitales

En la última década, los citómetros de flujo digitales han supuesto más que una sustitución de la tecnología analógica, una verdadera transformación de los citómetros de flujo, afectando a todos sus componentes básicos. A modo de ejemplo, el sistema ópti-

co de los citómetros de flujo se ha beneficiado de la inclusión de múltiples láseres que, emitiendo en tres o más longitudes de onda, incluyen desde configuraciones estándar de láseres ultravioleta (405 nm), azul (488 nm) y rojo (635 nm) usados en la rutina diagnóstica, a configuraciones más complejas que incorporan un cuarto láser verde (532 nm) o amarillo (561 nm). El incremento en el número de láseres ha ido paralelo a la incorporación de un número progresivamente más elevado de detectores de fluorescencia y, por lo tanto, de parámetros medibles, con configuraciones capaces de detectar simultáneamente entre 8 y > 20 emisiones fluorescentes distintas<sup>(32,33)</sup>.

Así, en la rutina del laboratorio de diagnóstico hematológico en estos años se han incorporado equipos de tres láseres con capacidad para evaluar entre 8 y 10 emisiones fluorescentes. Además, merece destacar que esta evolución que han sufrido los equipos de citometría ha ido asociada a una transformación del diseño empleado para disponer los filtros dedicados a la recolección de luz, con la incorporación de sistemas más eficientes, en especial para los parámetros asociados a luz con mayor longitud de onda y menor energía. Un claro ejemplo de alguna de estas modificaciones lo constituyen los sistemas de triángulos y octágonos y el empleo de la fibra óptica para una conducción eficiente de la luz a los detectores de fluorescencia<sup>(32)</sup>.

No obstante los avances anteriores, una de las características más notables de los citómetros de flujo digitales es el incremento significativo de la velocidad de análisis celular<sup>(34)</sup>. Así, la utilización de señal digital, unida al aumento de la velocidad del sistema de procesamiento y almacenamiento informático, permitieron elevar la velocidad de análisis desde unos pocos miles a decenas de miles de células/segundo (como ejemplo, véanse las especificaciones técnicas de FACSCalibur *versus* FACSCantoII en [www.bd-biosciences.com](http://www.bd-biosciences.com)).

En conjunto, las mejoras introducidas en los láseres y en los sistemas óptico y electrónico de los citómetros de flujo, con el incremento de su capacidad analítica, han conducido a una mayor capacidad de evaluación de la complejidad fenotípica y funcional de las poblaciones de células hematopoyéticas normales y neoplásicas, con una sensibilidad significativamente incrementada. Esto ha supuesto una clara ventaja de los nuevos equipos respecto a los citómetros analógicos tanto en lo que se refiere a la identificación de subtipos celulares con un mayor grado de precisión y exactitud como a la capacidad de proporcionar una caracterización fenotípica más detallada y eficiente. En conjunto, estos aspectos han beneficiado, no sólo las aproximaciones convencionales de diagnóstico y clasificación de hemopatías, sino también, y de forma especial, a los estudios encaminados a la detec-

ción de EMR o al análisis de muestras con celularidad muy escasa como es el caso de muestras del líquido cefalorraquídeo o humor vítreo<sup>(35)</sup>. Cabe resaltar que el éxito de la ampliación de las capacidades de análisis multiparamétrico de los nuevos citómetros de flujo ha estado íntimamente unido al desarrollo de nuevos fluorocromos y reactivos.

---

### Ampliación del panel de fluorocromos y reactivos para citometría de flujo

En la última década se ha incrementado de forma notable la disponibilidad de fluorocromos técnicamente compatibles para ser usados simultáneamente en citometría de flujo. Así, a la lista de fluorocromos “clásicos” (i.e., isotiocianato de fluoresceína, ficoeritrina o alofocianina –FITC, PE y APC, respectivamente–), se han ido incorporando nuevos pigmentos fluorescentes y tándems de fluorocromos<sup>(36-39)</sup>. Especial mención merecen los fluorocromos Pacific Blue, Pacific Orange o las familias de los fluorocromos horizon (HV450, HV500) y brilliant violet (BV421, BV510, BV605, BV650, etc.) para el láser violeta, junto con los tándems de PE (i.e. PE-Cy7) y APC (i.e. APCCy7 o APCH7) o alexa (i.e. APC-Alexa Fluor 750). En paralelo se ha incrementado también el panel de anticuerpos monoclonales conjugados con estos y otros fluorocromos, incorporándose a esta lista también, un número creciente de especificidades o clones disponibles.

---

### Evolución del diseño y la evaluación de paneles de anticuerpos

Salvo excepciones, las recomendaciones realizadas durante décadas para el diseño de paneles de anticuerpos se limitaban a proporcionar una lista de marcadores informativos basada en la experiencia de expertos, grupos de consenso y laboratorios individuales<sup>(40-42)</sup>. Con ello, habitualmente se corre el riesgo de excluir de la selección de marcadores relevantes aquellos sobre los que hay menos información y/o experiencia. Hoy en día, se recomienda que al indicar un panel de referencia debe proporcionarse siempre, además de los clones de referencia, los conjugados idóneos, incluyendo las combinaciones más importantes para dar respuesta a las preguntas clínicas específicas para las que estaría indicado dicho panel de anticuerpos<sup>(43)</sup>.

En la práctica, el diseño de paneles de anticuerpos va mucho más allá de un simple listado de combinaciones de los mismos, resultando una tarea laboriosa y delicada, aun cuando disponemos de la lista de marcadores informativos; esto es debido a que resulta en gran medida impredecible el resultado de una combinación teórica de marcadores<sup>(44)</sup>. Por este motivo, se recomienda además una evaluación prospec-

tiva de los paneles de anticuerpos de forma previa a cualquier recomendación de consenso<sup>(44)</sup>; en esta evaluación deben incluirse, por un lado, nuevos marcadores potencialmente informativos que complementen a los de ya probada utilidad y, por otra parte, deben eliminarse marcadores redundantes<sup>(44)</sup>. En el proceso de evaluación de paneles de anticuerpos, son especialmente útiles las herramientas informáticas que permiten determinar la contribución específica de cada marcador en las combinaciones y paneles testados, y finalmente recomendados<sup>(45)</sup>.

En este apartado, no podemos dejar de mencionar el número creciente de reactivos disponibles. Especial destaque merecen las microesferas que permiten detectar de forma rápida, sensible y específica, por citometría de flujo, la presencia de proteínas de fusión derivadas de translocaciones cromosómicas como bcr-abl y pml-rara<sup>(46,47)</sup>, y que resultan especialmente útiles en aquellos lugares en los que no se cuenta con las técnicas moleculares convencionales para su detección.

### Procesamiento de muestras

La ampliación del abanico de aplicaciones de la citometría de flujo ha ido asociada al incremento de los tipos de muestras y del número de células a analizar, entre otras variables<sup>(1,43)</sup>. Con relativa frecuencia, estos avances conllevan también la necesidad de adaptar las estrategias y técnicas de procesamiento de muestras. Esto resulta especialmente evidente en el caso de muestras con escaso número de células (i.e., LCR o humor vítreo)<sup>(35,43)</sup> y en el análisis (identificación, caracterización y recuento) de poblaciones celulares presentes en muy baja frecuencia ( $< 10^{-4}$ ), como es el caso de la detección de EMR<sup>(48,49)</sup>. El incremento en el número de parámetros analizables simultáneamente y en la velocidad de análisis de los citómetros de flujo actuales ha obligado de forma complementaria a modificar los protocolos de preparación de muestras para poder procesar volúmenes significativamente mayores de las mismas; por este motivo, han adquirido mayor relevancia los protocolos de análisis seguidos de marcaje<sup>(50)</sup>.

### Avances informáticos en el análisis de datos de citometría

Tanto el aumento del número de parámetros analizables por célula como la posibilidad de incrementar el número global de células analizadas por muestra han contribuido a incrementar el conjunto de información generada en una medición. Tal incremento ha llevado al límite la posibilidad de seguir empleando procedimientos tradicionales de análisis de datos de citometría, basados en la interpretación de repre-

sentaciones uni- o biparamétricas de los datos por un experto, en un proceso que carece de referencias o estándares objetivos y que, por tanto, resulta altamente subjetivo y dependiente del “experto”<sup>(45,51)</sup>.

Por todo ello, en los últimos años se han desarrollado nuevas herramientas informáticas para el tratamiento de datos, incluyendo herramientas de fusión de ficheros, de cálculo de información fenotípica entre alícuotas de una misma muestra, y de análisis, visualización e interpretación de datos<sup>(52)</sup>. Así, hoy en día es posible fusionar en un solo fichero de datos toda la información fenotípica disponible sobre una muestra, extrapolar incluso información (datos) entre alícuotas. Con ello podemos generar ficheros de datos que contienen información sobre un número ilimitado de parámetros para cada célula individual contenida en una o más poblaciones celulares de esa muestra<sup>(53)</sup>. Con esta estrategia de tratamiento de ficheros de datos de citometría es posible realizar, en un solo paso, un análisis fenotípico completo de una muestra que incluya la caracterización detallada de cada subpoblación celular presente en la misma<sup>(54)</sup>. No obstante, estos procedimientos y herramientas informáticas han incrementado aún más la cantidad y complejidad de la información fenotípica obtenida sobre una muestra, obligando al desarrollo paralelo de nuevas herramientas informáticas para el análisis, la visualización y la interpretación de los datos<sup>(52,53)</sup>. Así, en las nuevas herramientas informáticas se han introducido algoritmos matemáticos y modelos estadísticos encaminados a: i) la automatización de la identificación de poblaciones celulares, ii) el análisis multivariante de datos de citometría (i.e., análisis de componentes principales) y iii) los correspondientes sistemas de representación de datos multidimensionales. Finalmente, se han introducido bases de datos de referencia para la comparación directa de los resultados obtenidos en una muestra y poder así realizar una interpretación más objetiva de los mismos. Es precisamente en esta área donde los avances metodológicos han generado una verdadera revolución conceptual respecto a la forma como deben diseñarse los paneles de anticuerpos, analizarse los resultados o llevar a cabo la interpretación de los mismos<sup>(43,45)</sup>. Además, han abierto nuevas vías en la estandarización de los procedimientos y el control de calidad de los resultados de los laboratorios de citometría<sup>(54)</sup>.

A modo de ejemplo, las nuevas herramientas informáticas permiten realizar una identificación rápida (incluso automatizada) de las diferentes poblaciones celulares presentes en una muestra. Además, permiten la comparación automática del fenotipo global de cada célula individual presente en la muestra analizada, respecto a un conjunto de células normales y/o patológicas, clasificándola de acuerdo a su línea ce-



**Tabla 1.** Avances relevantes en citometría de flujo ocurridos en la última década

CAMPO DE LA CITOMETRÍA				
	Equipos	Panel de fluorocromos y reactivos	Informática	Procesamiento de muestras
Avances	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tecnología digital</li> <li>• N.º de láseres</li> <li>• Configuración del sistema óptico</li> <li>• ↑ N.º de detectores de fluorescencia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↑ n.º de clones de AcMo</li> <li>• ↑ n.º de fluorocromos</li> <li>• Nuevas estrategias de diseño y construcción de paneles de AcMo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Compensación de fluorescencias</li> <li>• Fusión de ficheros</li> <li>• Cálculo de datos entre ficheros</li> <li>• Análisis multivariantes</li> <li>• Representaciones de análisis multivariantes</li> <li>• Ficheros de referencia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estabilización de muestras</li> <li>• Marcaje de &gt; volúmenes de muestra</li> <li>• Inmunoesferas para detección de proteínas de fusión de translocaciones cromosómicas</li> </ul>

AcMo: anticuerpos monoclonales

lular y estadio madurativo o subgrupo diagnóstico, según su parecido y sus diferencias con las células presentes en los ficheros de referencia de muestras normales, reactivas y/o patológicas. Finalmente, esta aproximación permite detectar desviaciones sistemáticas que pueden resultar de diferencias técnicas y/o metodológicas. De esta forma, las nuevas herramientas informáticas proporcionan una importante ayuda a la hora de alcanzar un análisis y una interpretación más objetiva y reproducible de los datos de citometría, no sólo dentro de un laboratorio, sino también entre distintos laboratorios<sup>(43,44)</sup>. Todo ello facilita y promueve la estandarización de técnicas de preparación y tinción de muestras, así como de procedimientos de análisis e interpretación de datos, tanto para la detección de células tumorales al diagnóstico o tras tratamiento como para su clasificación diagnóstica<sup>(43)</sup>. Indudablemente, estos procedimientos tendrán una importante repercusión en las clasificaciones futuras de las hemopatías malignas, y los criterios fenotípicos empleados, tanto en lo que hace referencia al establecimiento de la línea celular y el estadio madurativo de las células neoplásicas como a la identificación de sus aberraciones fenotípicas.

### Estandarización y control de calidad

Ante lo anteriormente expuesto queda claro que las nuevas herramientas informáticas disponibles para la evaluación de datos de citometría han proporcionado un importante impulso a la estandarización en citometría haciendo necesario obtener resultados comparables, no sólo dentro de cada laboratorio, sino también en diferentes laboratorios, para que dichos laboratorios puedan utilizar los mismos ficheros de referencia<sup>(52,55)</sup>. Con ello se ha impulsado la mejoría y automatización de las técnicas de procesamiento de muestras, la puesta a punto y calibración de equipos, la compensación de fluorescencias, la calidad de los reactivos y los paneles de anticuerpos utilizados y de los procedimientos de control de calidad de los mismos<sup>(52)</sup>.

### Conclusiones

En la última década se han introducido importantes avances técnicos en los equipos de citometría. Estos avances se han visto impulsados por la disponibilidad de un número creciente de reactivos de calidad y fluorocromos técnicamente compatibles, que han incrementado de forma notable la cantidad y complejidad de los datos fenotípicos obtenidos, obligando a un desarrollo paralelo de las herramientas informáticas destinadas a su análisis. A su vez, los avances informáticos han supuesto una revolución en las estrategias empleadas para el análisis, visualización e interpretación de los resultados, haciendo de la caracterización fenotípica de las hemopatías malignas una herramienta diagnóstica más robusta, reproducible y, en definitiva, más útil. Con ello se vislumbra también que estas nuevas herramientas y avances tengan un importante impacto en el futuro próximo, en el diagnóstico, clasificación y monitorización terapéutica de las hemopatías malignas.

### Bibliografía

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, 4th edn. International Agency for Research on Cancer: Lyon, 2008, 439 p.pp.
2. Orfao A, Schmitz G, Brando B, Ruiz-Arguelles A, Basso G, Braylan R, et al. Clinically useful information provided by the flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies: current status and future directions. Clin Chem 1999 Oct; 45(10): 1708-1717.
3. DiNardo CD, Luger SM. Beyond morphology: minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. Curr Opin Hematol 2012 Mar; 19(2): 82-88.
4. Mejstrikova E, Volejnikova J, Fronkova E, Zdrahalova K, Kalina T, Sterba J, et al. Prognosis of children with mixed phenotype acute leukemia treated on the basis of consistent immunophenotypic criteria. Haematologica 2010 Jun; 95(6): 928-935.
5. Grimwade D, Vyas P, Freeman S. Assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. Curr Opin Oncol 2010 Nov; 22(6): 656-663.
6. van de Loosdrecht AA, Alhan C, Bene MC, Della Porta MG, Dräger AM, Feuillard J, et al. Standardization of flow cytometry

- etry in myelodysplastic syndromes: report from the first European LeukemiaNet working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2009 Aug; 94(8): 1124-1134.
7. Babusikova O, Stevulova L, Fajtova M. Immunophenotyping parameters as prognostic factors in T-acute leukemia patients. *Neoplasma* 2009; 56(6): 508-513.
  8. Al-Mawali A, Gillis D, Lewis I. The role of multiparameter flow cytometry for detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Am J Clin Pathol* 2009 Jan; 131(1): 16-26.
  9. Kraan J, Gratama JW, Haioun C, Orfao A, Plonquet A, Porwit A, et al. Flow cytometric immunophenotyping of cerebrospinal fluid. *Curr Protoc Cytom* 2008 Jul; Chapter 6: Unit 6 25.
  10. van de Loosdrecht AA, Westers TM, Westra AH, Drager AM, van der Velden VH, Ossenkoppele GJ. Identification of distinct prognostic subgroups in low- and intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes by flow cytometry. *Blood* 2008 Feb 1; 111(3): 1067-1077.
  11. Van de Loosdrecht AA, Ireland R, Kern W, Alhan C, Balleisen JS, Bene MC, et al. Rationale for the clinical application of flow cytometry in patients with myelodysplastic syndromes. Position paper of the European LeukemiaNet working group on flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, in press 2012.
  12. Paiva B, Almeida J, Perez-Andres M, Mateo G, Lopez A, Rasillo A, et al. Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders. *Cytometry B Clin Cytom* 2010 Jul; 78(4): 239-252.
  13. Paiva B, Vidriales MB, Perez JJ, Mateo G, Montalban MA, Mateos MV, et al. Multiparameter flow cytometry quantification of bone marrow plasma cells at diagnosis provides more prognostic information than morphological assessment in myeloma patients. *Haematologica* 2009 Nov; 94(11): 1599-1602.
  14. Chiaretti S, Foa R. T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2009 Feb; 94(2): 160-162.
  15. Seegmiller AC, Kroft SH, Karandikar NJ, McKenna RW. Characterization of immunophenotypic aberrancies in 200 cases of B acute lymphoblastic leukemia. *Am J Clin Pathol* 2009 Dec; 132(6): 940-949.
  16. Szczepanski T, van der Velden VH, van Dongen JJ. Classification systems for acute and chronic leukaemias. *Best Pract Res Clin Haematol* 2003 Dec; 16(4): 561-582.
  17. Dworzak MN, Froschl G, Printz D, Mann G, Potschger U, Muhlegger N, et al. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002 Mar 15; 99(6): 1952-1958.
  18. Cady FM, Morice WG. Flow cytometric assessment of T-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Clin Lab Med* 2007 Sep; 27(3): 513-532, vi.
  19. Lima M, Almeida J, Montero AG, Teixeira Mdos A, Queiros ML, Santos AH, et al. Clinicobiological, immunophenotypic, and molecular characteristics of monoclonal CD56-/+dim chronic natural killer cell large granular lymphocytosis. *Am J Pathol* 2004 Oct; 165(4): 1117-1127.
  20. Braylan RC. Impact of flow cytometry on the diagnosis and characterization of lymphomas, chronic lymphoproliferative disorders and plasma cell neoplasias. *Cytometry A* 2004 Mar; 58(1): 57-61.
  21. Sanchez ML, Almeida J, Gonzalez D, Gonzalez M, Garcia-Marcos MA, Balanzategui A, et al. Incidence and clinicobiologic characteristics of leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders with more than one B-cell clone. *Blood* 2003 Oct 15; 102(8): 2994-3002.
  22. Matutes E. Chronic T-cell lymphoproliferative disorders. *Rev Clin Exp Hematol* 2002 Dec; 6(4): 401-420; discussion 449-450.
  23. van den Ancker W, Terwijn M, Westers TM, Merle PA, van Beckhoven E, Drager AM, et al. Acute leukemias of ambiguous lineage: diagnostic consequences of the WHO2008 classification. *Leukemia* 2010 Jul; 24(7): 1392-1396.
  24. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* 2008 Apr 15; 111(8): 3941-3967.
  25. DiGiuseppe JA. Acute lymphoblastic leukemia: diagnosis and detection of minimal residual disease following therapy. *Clin Lab Med* 2007 Sep; 27(3): 533-549, vi.
  26. Han X, Bueso-Ramos CE. Precursor T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoblastic lymphoma and acute biphenotypic leukemias. *Am J Clin Pathol* 2007 Apr; 127(4): 528-544.
  27. Szczepanski T, van der Velden VH, van Dongen JJ. Flow-cytometric immunophenotyping of normal and malignant lymphocytes. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44(7): 775-796.
  28. Ravandi F, O'Brien S. Chronic lymphoid leukemias other than chronic lymphocytic leukemia: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* 2005 Dec; 80(12): 1660-1674.
  29. Bonner WA, Hulett HR, Sweet RG, Herzenberg LA. Fluorescence activated cell sorting. *Rev Sci Instrum* 1972 Mar; 43(3): 404-409.
  30. Hulett HR, Bonner WA, Sweet RG, Herzenberg LA. Development and application of a rapid cell sorter. *Clin Chem* 1973 Aug; 19(8): 813-816.
  31. Hulett HR, Bonner WA, Barrett J, Herzenberg LA. Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. *Science* 1969 Nov 7; 166(3906): 747-749.
  32. Perfetto SP, Chattopadhyay PK, Roederer M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nat Rev Immunol* 2004 Aug; 4(8): 648-655.
  33. Chattopadhyay PK, Roederer M. Cytometry: today's technology and tomorrow's horizons. *Methods* 2012 Jul; 57(3): 251-258.
  34. Zilmer NA, Godavarti M, Rodriguez JJ, Yopp TA, Lambert GM, Galbraith DW. Flow cytometric analysis using digital signal processing. *Cytometry* 1995 Jun 1; 20(2): 102-117.
  35. Quijano S, Lopez A, Manuel Sancho J, Panizo C, Deben G, Castilla C, et al. Identification of leptomeningeal disease in aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma: improved sensitivity of flow cytometry. *J Clin Oncol* 2009 Mar 20; 27(9): 1462-1469.
  36. Roederer M, Kantor AB, Parks DR, Herzenberg LA. Cy7PE and Cy7APC: bright new probes for immunofluorescence. *Cytometry* 1996 Jul 1; 24(3): 191-197.
  37. Telford W, Kapoor V, Jackson J, Burgess W, Buller G, Hawley T, et al. Violet laser diodes in flow cytometry: an update. *Cytometry A* 2006 Nov 1; 69(11): 1153-1160.
  38. Chattopadhyay PK, Gaylord B, Palmer A, Jiang N, Raven MA, Lewis G, et al. Brilliant violet fluorophores: a new class of ultrabright fluorescent compounds for immunofluorescence experiments. *Cytometry A* 2012 Jun; 81(6): 456-466.
  39. Berlier JE, Rothe A, Buller G, Bradford J, Gray DR, Filanoski BJ, et al. Quantitative comparison of long-wavelength Alexa Fluor dyes to Cy dyes: fluorescence of the dyes and their bioconjugates. *J Histochem Cytochem* 2003 Dec; 51(12): 1699-1712.
  40. Bene MC, Nebe T, Bettelheim P, Buldini B, Bumbea H, Kern W, et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia* 2011 Apr; 25(4): 567-574.
  41. Wood BL, Arroz M, Barnett D, DiGiuseppe J, Greig B, Kussick SJ, et al. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. *Cytometry B Clin Cytom* 2007; 72 Suppl 1: S14-22.

42. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995 Oct; 9(10): 1783-1786.
43. van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VHJ, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. Submitted to *Leukemia* 2012.
44. van Dongen JJ, Orfao A. EuroFlow: Resetting leukemia and lymphoma immunophenotyping. Basis for companion diagnostics and personalized medicine. *Leukemia* 2012 Sep; 26(9): 1899-1907.
45. Pedreira CE, Costa ES, Lecrevisse Q, van Dongen JJM, Orfao A. Overview of clinical flow cytometry data analysis: recent advances and future challenges. *Trends in Biotechnology*, 2013, In press: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.1004.1008>.
46. Dekking EHA, van der velden VHJ, Varro R, Wai H, Böttcher S, Kneba M, et al. Flow cytometric immunobead assay for fast and easy detection of PML-RARA fusion proteins for the diagnosis of acute promyelocytic leukemia. Submitted to *Leukemia* 2012.
47. Weerkamp F, Dekking E, Ng YY, van der Velden VH, Wai H, Böttcher S, et al. Flow cytometric immunobead assay for the detection of BCR-ABL fusion proteins in leukemia patients. *Leukemia* 2009 Jun; 23(6): 1106-1117.
48. Campana D, Coustan-Smith E. Advances in the immunological monitoring of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2002 Mar; 15(1): 1-19.
49. Weir EG, Cowan K, LeBeau P, Borowitz MJ. A limited antibody panel can distinguish B-precursor acute lymphoblastic leukemia from normal B precursors with four color flow cytometry: implications for residual disease detection. *Leukemia* 1999 Apr; 13(4): 558-567.
50. Menendez P, Redondo O, Rodriguez A, Lopez-Berges MC, Ercilla G, Lopez A, et al. Comparison between a lyse-and-then-wash method and a lyse-non-wash technique for the enumeration of CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Cytometry* 1998 Dec 15; 34(6): 264-271.
51. Haynes JL. Principles of flow cytometry. *Cytometry Suppl* 1988; 3: 7-17.
52. Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VHJ, Martin-Ayuso M, Böttcher S, Ritgen M, et al. EuroFlow standardization of flow cytometry instrument settings and immunophenotyping protocols. Submitted to *Leukemia* 2012.
53. Pedreira CE, Costa ES, Barrena S, Lecrevisse Q, Almeida J, van Dongen JJ, et al. Generation of flow cytometry data files with a potentially infinite number of dimensions. *Cytometry A* 2008 Sep; 73(9): 834-846.
54. Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VH, Martin-Ayuso M, Böttcher S, Ritgen M, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia* 2012 Sep; 26(9): 1986-2010.
55. Costa ES, Pedreira CE, Barrena S, Lecrevisse Q, Flores J, Quijano S, et al. Automated pattern-guided principal component analysis vs expert-based immunophenotypic classification of B-cell chronic lymphoproliferative disorders: a step forward in the standardization of clinical immunophenotyping. *Leukemia* 2010 Nov; 24(11): 1927-1933.

## Aplicación asistencial de técnicas citogenéticas y moleculares experimentales

JUAN CRUZ CIGUDOSA, SARA ÁLVAREZ DE ANDRÉS

*Grupo de Citogenética Molecular. Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO). Madrid*

### Introducción: la genética como herramienta diagnóstica en oncohematología

Es de recibo introducir este capítulo con la primera contribución de la Genética al estudio de una leucemia humana. Se trataba de la descripción de una alteración citogenética, el marcador cromosómico Philadelphia, observada en los cariotipos obtenidos tras cultivar las células de la médula ósea de pacientes con leucemia mielode crónica (LMC)<sup>(1)</sup>. El diagnóstico de una leucemia mielode crónica (LMC), cuyas células hematopoyéticas presentaban el marcador cromosómico Philadelphia (Ph+), conllevaba, hasta el reciente año 2000, un pronóstico fatal dilatado en un periodo de no más de 5 años. Esta situación cambió radicalmente tras la rápida inclusión del inhibidor específico de la actividad tirosín quinasa (imatinib mesilato) como terapia de primera línea en pacientes con LMC Ph+<sup>(2,3)</sup>. Esta situación no es aislada en la práctica de la Oncohematología, ya que pertenece al dominio de la conversación común, entre los profesionales y los pacientes, que las leucemias tienen casi siempre alteraciones genéticas y que estas alteraciones pueden emplearse para dirigir u orientar el tratamiento. Asumimos, por tanto, que el cáncer es una enfermedad celular de origen genético<sup>(4)</sup>. Esta frase, sencilla y simple, tiene un impacto de enormes dimensiones sobre cualquier tipo de aproximación, científica o clínica, que las ciencias biosanitarias han de seguir para estudiar el fenómeno oncológico. La principal consecuencia de la definición del cáncer como enfermedad genética es que, de forma casi excluyente, la investigación oncológica ha de estar basada en herramientas de análisis genético.

Si asumimos este origen genético del cáncer **¿cómo se investiga la relación gen-enfermedad?** El esquema de investigación habitualmente seguido para caracterizar esa relación consiste, en esencia, en estudiar un gen y su efecto en el modelo biológico estudiado, en determinar las relaciones con otros genes y, por último, en diseñar modificaciones (inhibidores

o activadores) de su expresión para regular su efecto en condiciones patológicas. Este sistema ha sido muy útil pero se adivina un tanto insuficiente si tenemos en cuenta que el número de genes es de unos 30.000, que se traducen en unas 100.000 proteínas y que las interacciones gen-gen, proteína-proteína y gen-proteína, por simple combinatoria, alcanzan números casi inimaginables.

En los últimos años, las herramientas de análisis genético han sufrido una revolución técnica de dimensiones inimaginables. Los sistemas de análisis genómico masivo (básicamente los microarrays y las técnicas de secuenciación masiva) permiten analizar en un solo experimento el estado de miles de genes, de todo el genoma. Es decir, ahora estudiar la relación gen-enfermedad no está basado en analizar un gen único y sus efectos sino en analizar el comportamiento de miles de genes de forma simultánea. Estos sistemas, estas nuevas capacidades están cambiando nuestra forma de plantear problemas y extraer conclusiones de los experimentos ya que nos ofrecen una foto compleja del conjunto del genoma. Este conjunto de datos sobre el estado mutacional de los genes, sobre su expresión génica, las relaciones entre genes tratados de forma sistemática mediante herramientas de análisis masivo, constituye el cuerpo esencial de lo que denominamos Genómica. La Genómica intenta proporcionar a los investigadores en biología el equivalente de la Tabla Periódica de los Elementos, es decir, un inventario de todos los genes y de su estado (activado, mutado, sobreexpresado, silenciado) que contribuyen y se coordinan para explicar la existencia y funcionalidad de cualquier ser vivo. Aplicar estos avances a la investigación en oncohematología, realizar con cuidado este inventario, detallarlo al máximo, hacerlo corresponder de forma exquisita a los diferentes estados patológicos, tiene como objetivo no sólo aumentar nuestra capacidad para predecir el pronóstico y la respuesta al tratamiento de estos pacientes, sino para facilitar y promover el desarrollo de terapias dirigidas frente a estas dianas moleculares.

Sin duda, la mayor contribución de los estudios genómicos reside en dos grandes áreas. Por un lado, la taxonomía de las enfermedades. Clasificar un determinado tumor con un nombre y apellidos de la forma menos ambigua posible permite ajustar el diagnóstico y el tratamiento casi de forma individual. **Es la base, la piedra angular, de la medicina individualizada.** Sin embargo, como todos sabemos, realizar una filiación adecuada de un caso real depende de muchas variables: las circunstancias de recogida de la muestra (hospital, laboratorio), el rigor en la descripción inicial de todas las condiciones (anamnesis, datos de laboratorio), la disponibilidad de herramientas de diagnóstico adecuadas y, finalmente, la experiencia del profesional. Conjuguar todos estos elementos tendría que tener como final el desarrollo de una clasificación de los tumores que sea universal y efectiva.

Para que cualquier nueva tecnología tenga una aplicación real en la práctica clínica ha de cumplir con un requisito imprescindible: ha de proporcionar nuevos y/o mejores biomarcadores que los ya existentes. Por ello, es importante remarcar en este punto que todas las técnicas genómicas (microarrays, secuenciación masiva) que vayan a incorporarse a la práctica clínica han de recorrer un camino de descubrimiento y caracterización de biomarcadores. En primer lugar, las tecnologías y su aplicación deben reflejar sin ambigüedades el reconocimiento de una diferencia morfológica de una manera reproducible y sistemática. En segundo lugar, han de establecer la relación entre las características del tumor (sus biomarcadores ya conocidos) y las del tejido normal del que se origina. En tercer lugar, su aplicación debe facilitar el establecimiento de asociaciones entre la evolución del paciente o la respuesta al tratamiento y los biomarcadores que se proponga, de forma que éstos tengan una utilidad clínico-terapéutica. Así, por ejemplo, la tecnología de microarrays puede usarse para derivar clasificaciones basadas en biomarcadores, establecer asociaciones con la línea celular de origen y ayudar en el pronóstico, pero con la ventaja añadida de ser capaz de identificar los genes que determinan esa clasificación<sup>(5)</sup>.

## Las tecnologías genómicas: nociones sobre su origen, tipos y utilidades

### Los microarrays de expresión génica

Los ensayos de hibridación en microarrays, descritos a finales de los años ochenta, se basan en la disposición de material genético sobre un sustrato (plástico, cristal, membranas), en posiciones conocidas. En la actualidad existen en el mercado científicos diferentes herramientas de análisis genómico (matrices o

microarrays). En todos los casos, cada material genético que se coloca en el array está referido a una región del genoma cuya situación y características son conocidas o predichas con cierta verosimilitud. Es decir, cada uno de los puntos del microarray puede representar un gen, y la información que nos genera se refiere al estatus de ese gen en la muestra analizada. Los experimentos en los que son empleadas son, casi exclusivamente, estudios sobre análisis masivo o global de la expresión genética de organismos.

El material obtenido de la muestra problema, convenientemente tratado y marcado con una molécula que permite su identificación o lectura (fluorescencia) se pone en contacto con el array, hibridando en aquellas posiciones en que se complementa con las sondas. El patrón de hibridación es revelado empleándose un escáner basado en microscopía confocal, y la imagen resultante se convierte a valores numéricos que constituyen los resultados del ensayo. En el ejemplo más frecuente de los microarrays de expresión, este sistema permite la cuantificación de expresión génica diferencial. El nivel de expresión de un gen se refleja en el número de copias de mRNA presentes en la muestra problema y, por tanto, es proporcional al nivel de señal detectado.

El alto grado de integración del array permite, en un solo ensayo, obtener multitud de valores de expresión génica relativa para distintas condiciones biológicas, lo que convierte a esta técnica en una herramienta de alto rendimiento para trabajos en el área de la genómica funcional. El gran volumen de datos generados debe ser tratado con herramientas y métodos bioinformáticos.

### Los microarrays de DNA genómico

Aunque la aplicación más conocida de los biochips de DNA es la determinación de perfiles de transcripción, el formato microarray también ha sido utilizado de manera eficaz, al menos en otros dos tipos de experimentos: los microarrays diseñados para la detección masiva y simultánea en una muestra problema de cientos de miles de polimorfismos de un único nucleótido (*single nucleotide polymorphisms* o SNPs); y los microarrays de DNA genómico diseñados para el estudio de las alteraciones en el número de copias de DNA (*copy number variations* o CNVs) presentes en la muestra a estudio.

Los microarrays de DNA genómico diseñados para detectar CNVs han surgido como la evolución en clave genómica de la técnica conocida como hibridación genómica comparada (*comparative genomic hybridization* o CGH), desarrollada en 1992<sup>(6)</sup>. La técnica de CGH se aplicó extensamente a los más diversos tipos de neoplasias pero quedó muy limitada debido a su poca resolución (7-10 megabases, es decir,

segmentos del genoma que pueden contener decenas de genes cuyo comportamiento se escapa al análisis). Esta limitación se ha salvado mediante la introducción de los microarrays como plataforma para hibridar las muestras problema. Esta aproximación se denomina **array de CGH o CGH array**. La hibridación se realiza sobre segmentos de DNA de menor tamaño, lo más frecuente, oligonucleótidos de unos 60 pares de bases que pueden contener variantes de tipo SNP. Estos segmentos de DNA son secuencias genómicas cuya localización en el genoma es conocida y cuyo contenido génico es conocido. En esta nueva situación el nivel de resolución pasa, por tanto, de megabases (cromosómico) a kilobases (oligonucleótidos). La técnica se alimenta de la gran cantidad de datos aportados por el Proyecto Genoma Humano, sobre la ubicación, secuencia y contenido de genes de estos fragmentos de DNA que son, en buena medida, conocidos.

Los microarrays diseñados para el genotipado masivo de SNPs han sido los últimos en aparecer en el campo de la genómica aplicada pero su desarrollo tiene muchos visos de ser imparable. Estos microarrays están diseñados para detectar, en una muestra problema, la presencia o ausencia de un determinado SNP. Por lo tanto, permiten conocer simultáneamente la secuencia de cientos de miles (con frecuencia más de un millón) de variantes génicas presentes en la muestra. Esta tecnología se denomina **array de SNP o SNP array**. Ofrece una gran ventaja respecto a las pruebas genéticas empleadas hasta ahora para determinar el genotipo de una serie de marcadores: es una prueba global, que no selecciona previamente los genes a estudiar sino que realiza un escaneo general del genoma en busca de genotipos de interés. Supone el paso de la Farmacogenética a la Farmacogenómica. Además, estos tipos de arrays también pueden ser empleados (aunque con algo menos de eficiencia) para detectar los CNVs en una muestra, por lo que también pueden ser considerados como CGH arrays.

Entre las tecnologías genómicas emergentes pero similares en su concepto a las de microarrays, se encuentran las plataformas que determinan la presencia de metilación aberrante en el genoma. Si bien hasta la fecha los estudios de epigenética se han centrado en estudiar el estado de metilación de las islas de dinucleótidos CpG en las regiones que condicionan la transcripción de un determinado gen, la incorporación de tecnología genómica permite hacer esta determinación con un carácter global (incluyendo todo el genoma). Este tipo de análisis, denominado epigenómica, ya ha producido datos relevantes en el campo de las neoplasias mieloides<sup>(7-9)</sup> y más recientemente, desde nuestro país, en el campo de la leucemia linfocítica crónica<sup>(10)</sup>.

### Las técnicas de secuenciación masiva

La popularización de metodologías de alto rendimiento y en especial la secuenciación de nueva generación (NGS de sus siglas inglesas, *next generation sequencing*), está a punto de cambiar el panorama de la clínica en un futuro inminente. La NGS se ha empezado a aplicar con un gran éxito en el descubrimiento de genes de enfermedades mendelianas y en cáncer; es la herramienta ideal para hacer realidad las promesas de la medicina personalizada.

El desarrollo de estas técnicas de secuenciación masiva o ultrasecuenciación ha permitido la identificación de nuevas mutaciones no descritas previamente además de la identificación de mutaciones en poblaciones celulares presentes en pequeña proporción. Específicamente en el caso del cáncer, la ultrasecuenciación permite la identificación de mutaciones en estadios iniciales en los cuales las mutaciones pueden estar presentes en una proporción menor del 20%, necesario para los sistemas clásicos de secuenciación. De hecho, la secuenciación de genomas completos ha tenido como primer objetivo la oncohematología ya que las primeras publicaciones del área recogieron de forma específica dos casos independientes de LMA *de novo*<sup>(11,12)</sup>. Recientemente, dentro de la iniciativa del International Cancer Genome Consortium ([www.icgc.org](http://www.icgc.org)), el equipo español coliderado por los Dres. Carlos López-Otin y Elías Campo ha llevado a cabo un gran esfuerzo en el área. Desde este equipo español se han publicado datos genómicos de exomas y genomas completos de pacientes con leucemia mieloide crónica<sup>(13,14)</sup>.

Con todo lo descrito y publicado sobre este tema, es fácil ver que la NGS va a convertirse en una práctica rutinaria en clínica en un plazo de pocos años pero, para que esta situación se produzca habrá que resolver una gran disyuntiva. Por un lado, el precio de un exoma en la actualidad ronda los 1.000€ y la tendencia de los precios ha sido reducirse a la mitad cada 8 meses, aproximadamente. Esto quiere decir que su precio será asequible en clínica en un plazo de 2 años, como mucho. Por otro lado, aunque el precio de la tecnología esté cerca de considerarse asequible, el precio del análisis de estos datos dista mucho de serlo. Se calcula que, por cada exoma completo secuenciado, los gastos derivados para su análisis bioinformático y validación por tecnología estandarizada y emisión del informe con interpretación clínica serían posiblemente superiores a 40.000€. Ante este escenario es preciso plantearse el impacto que esta práctica va a tener en los sistemas sanitarios. Llevar a cabo un diagnóstico clínico tendría varios elementos que incorporar en su proceso de transferencia. Por un lado, los gastos derivados de la tecnología (aparatos costosos, mantenimiento y siste-

mas de almacenamiento de datos) y de su análisis. Por otro lado, la incorporación efectiva de diferentes profesionales como bioinformáticos y analistas de datos masivos, actualmente ajenos a la dinámica de trabajo clínica. Por último, también requerirá, debido a la complejidad de los hallazgos en cuanto al elevado número de mutaciones y variantes de significado desconocido, o en lo referente a la presencia de mutaciones no esperadas que tengan repercusión en otras patologías y/o con posible impacto en la familia si son germinales, una mayor participación de profesionales con experiencia en Genética Clínica en la toma de decisiones.

## Conclusiones

Esta ponencia, en primer lugar, introduce y resume históricamente las diferentes tecnologías experimentales en la investigación de los tumores hematológicos. Después analiza la situación y disponibilidad actual de los biomarcadores genómicos en la práctica clínica oncohematológica. En este análisis se incluyen y presentan los marcadores genéticos de utilidad clínicamente probada y se apuntan las futuras incorporaciones esperables, algunas de ellas derivadas del caudal de datos generados mediante tecnologías genómicas. Finalmente, se apuntan los problemas más frecuentes en la incorporación de este tipo de análisis genómicos en la rutina de la actividad clínica y se indican las posibilidades de desarrollos futuros en este campo.

## Bibliografía

1. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*. 1960 Nov;132:1497.
2. Goldman JM, Melo JV. Targeting the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2001 Apr 5;344(14):1084-6.
3. O'Hare T, Corbin AS, Druker BJ. Targeted CML therapy: controlling drug resistance, seeking cure. *Curr Opin Genet Dev*. 2006 Feb;16(1):92-9.
4. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*. 2004 Aug;10(8):789-99.
5. Miller LD, Long PM, Wong L, Mukherjee S, McShane LM, Liu ET. Optimal gene expression analysis by microarrays. *Cancer Cell*. 2002 Nov;2(5):353-61.
6. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 1992 Oct 30;258(5083):818-21.
7. Figueroa ME, Lugthart S, Li Y, Erpelinck-Verschueren C, Deng X, Christos PJ, et al. DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2010 Jan 19;17(1):13-27.
8. Bullinger L, Armstrong SA. HELP for AML: methylation profiling opens new avenues. *Cancer Cell*. 2010 Jan 19;17(1):1-3.
9. Bullinger L, Ehrich M, Dohner K, Schlenk RF, Dohner H, Nelson MR, et al. Quantitative DNA methylation predicts survival in adult acute myeloid leukemia. *Blood*. 2010 Jan 21;115(3):636-42.
10. Kulis M, Heath S, Bibikova M, Queiros AC, Navarro A, Clot G, et al. Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*. 2012 Nov;44(11):1236-42.
11. Ley TJ, Mardis ER, Ding L, Fulton B, McLellan MD, Chen K, et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature*. 2008 Nov 6;456(7218):66-72.
12. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med*. 2009 Sep 10;361(11):1058-66.
13. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordonez GR, Villamor N, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2011 Jul 7;475(7354):101-5.
14. Quesada V, Conde L, Villamor N, Ordonez GR, Jares P, Basaganyas L, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*. 2011 Jan;44(1):47-52.

## Actualización de las anemias hemolíticas inmunes

COORDINADORES: BEATRIZ ARRIZABALAGA AMUCHÁSTEGUI. *Servicio de Hematología. Hospital Universitario de Cruces. Baracaldo (Vizcaya)*  
ARTURO PEREIRA SAAVEDRA. *Servicio de Hemoterapia y Hemostasia. Hospital Clínic. Barcelona*

La anemia hemolítica autoinmune (AHAI) engloba a un grupo de enfermedades, algunas muy poco frecuentes, cuyo diagnóstico requiere que el Laboratorio de Inmunoematología demuestre la presencia de autoanticuerpos (auto-Ac) eritrocitarios. La principal causa de la heterogeneidad que se observa dentro de la AHAI viene dada precisamente por el tipo de auto-Ac implicado, que determina la fisiopatología de la hemólisis, y por la existencia o no de una causa subyacente. Para el diagnóstico de algunas de estas AHAI es imprescindible que se produzca una colaboración muy estrecha entre la clínica y el laboratorio, colaboración que resulta indispensable para el manejo transfusional de esta entidad.

En este simposio llevaremos a cabo una revisión actualizada del comportamiento clínico y biológico de la AHAI por Ac calientes (Dr. Ataúlfo González) y por Ac fríos (Dra. Montserrat López). Se examinará, además, un tipo de AHAI reconocida cada vez con más frecuencia y que es la asociada al trasplante de progenitores hematopoyéticos (Dra. Nelly Carpio). Por último, se presentarán tanto las últimas novedades como los principios clásicos del tratamiento de este grupo de enfermedades (Dr. Javier Peñalver).

El Dr. González y colaboradores evaluarán la importancia de la clasificación de las AHAI (Ac fríos vs. Ac calientes; etiología primaria vs. secundaria) ya que tanto la patogenia como la terapéutica de estos grupos difieren entre sí. Los autores se centrarán en la AHAI por auto-Ac calientes y revisarán las hipótesis que se han planteado sobre la etiología de esta enfermedad: reactividad cruzada, alteraciones del complemento, del sistema de presentación de autoantígenos, anomalías funcionales de los linfocitos T y B y pérdida de regulación en la producción de citocinas. Revisarán, también, el valor de la prueba directa de antiglobulina, conocida popularmente como test de Coombs, tanto en cuanto a las posibilidades de falsos positivos o negativos como al diagnóstico diferencial que debe plantearse ante los resultados de esta prueba. Por último, pero no menos importante, se referirán a las dificultades que plantea la transfusión de hematíes en estos pacientes tanto por lo que hace a la garantía de compatibilidad frente a posibles aloanticuerpos ocultos como a la hemólisis de los hematíes transfundidos mediada por el propio auto-Ac.

La Dra. López comenzará su exposición de la “enfermedad hemolítica por Ac fríos” explicando la patogenia de las crioaglutininas (CA), la importancia de su titulación, del espectro térmico y del carácter monoclonal o no de las mismas. La patogenia y la fisiopatología de este grupo de anemias determinan tanto la presentación clínica y la historia natural como la eficacia de las diferentes terapéuticas. Aunque conocida de antiguo, no siempre se tiene en cuenta esa fisiopatología, lo que lleva, con cierta frecuencia, a errores en el diagnóstico y en la terapéutica. Dentro de este grupo de Ac fríos se dedicará un espacio a la hemoglobinuria paroxística *a frigore* (HPF) o anemia de Donath-Landsteiner, entidad fascinante y que fue la primera enfermedad autoinmune descrita en humanos, hace ahora algo más de un siglo, si bien esa forma clásica de HPF prácticamente ha desaparecido en la actualidad.

La Dra. Carpio nos presentará una actualización de las anemias de causa inmune asociadas al trasplante de precursores hematopoyéticos (TPH) y al de órganos sólidos. Es éste un grupo de anemias inmunes en el que a veces resulta difícil escoger entre los prefijos “auto” y “alo”. Se encuentran aquí algunas entidades poco conocidas fuera del ámbito de la Inmunoematología, como el síndrome del linfocito pasajero, que viene a ser una forma de “enfermedad del injerto contra el huésped” específica de los hematíes, y que seguramente están infradiagnosticadas, así como enfermedades que pueden llegar a ser muy graves, como la AHAI asociada al TPH de sangre de cordón umbilical.

Finalmente, el Dr. Peñalver nos pondrá al día del tratamiento de este grupo de enfermedades. Destaca en su ponencia el hecho de que la AHAI escapa a los preceptos de la denominada “medicina basada en la evidencia”, pues los esquemas terapéuticos más empleados se fundamentan más en la experiencia asistencial acumulada día a día que en ensayos clínicos potentes, de los que curiosamente se carece a pesar de estar ante enfermedades relativamente frecuentes. El ponente revisará en particular la calidad de la evidencia que apoya el uso de rituximab en las AHAI ya que tal anticuerpo monoclonal constituye la aportación más reciente al armamentario terapéutico de la AHAI.



Éste es un simposio dedicado a refrescar el conocimiento de un grupo de anemias que podemos considerar como clásicas, en muchas de las cuales ha habido pocos avances diagnósticos y terapéuticos pero en las que no es raro cometer errores de bulto tanto en su diagnóstico diferencial como en el tratamiento, quizá precisamente por eso, porque quedan habitualmente fuera de los programas educativos de los congresos y de los cursos de formación continuada. Os invitamos, pues, a este simposio con la ilusión de que lo que aquí se aprenda o rememore resulte útil en la práctica clínica cotidiana.

## Anemias hemolíticas inmunes, actualización clínico-biológica

FERNANDO ATAÚLFO GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, MARIBEL SÁEZ SERRANO,  
MARÍA PAZ MARTÍN HERNÁNDEZ

*Servicio de Hematología. Hospital Clínico San Carlos. Madrid*

### Introducción

Las anemias hemolíticas autoinmunes (AHAI) constituye un grupo de cuadros clínicos de etiopatogenia y manifestaciones heterogéneas que se caracterizan por un acortamiento de la vida media de los hematíes causado por autoanticuerpos dirigidos contra hematíes autólogos, que se unen a antígenos de la superficie del hematíe y desencadenan su destrucción a través del sistema mononuclear-fagocítico y/o del complemento.

### Clasificación

Las AHAI se clasifican, según el rango térmico óptimo al cual los autoanticuerpos se unen a los hematíes en el organismo, en: AHAI por anticuerpos calientes (AHAI-C), AHAI por anticuerpos fríos (AHAI-F) y AHAI mixtas. En las AHAI-C, los autoanticuerpos reaccionan con mayor afinidad a temperaturas cercanas a 37 °C y desciende su afinidad a temperaturas menores, suelen ser clase IgG y menos frecuentemente IgA, generalmente son policlonales y constituyen el 80-90% de los casos de AHAI. En las AHAI-F la reactividad máxima del autoanticuerpo se observa a temperaturas inferiores a 37 °C (0-20 °C), suelen ser de clase IgM y menos frecuente IgG, y generalmente son monoclonales. La gran mayoría de los autoanticuerpos fríos se comportan como crioaglutininas, siendo menos frecuente su comportamiento como hemolisinas. La hemoglobinuria paroxística *a frigore* es una forma especial de crioaglutinina, ya que el anticuerpo es IgG y se fija al hematíe en frío pero produce su lisis a 37 °C. Un pequeño número de pacientes presentan autoanticuerpos reactivos fríos y calientes, y en estas AHAI mixtas la hemólisis generalmente es más severa<sup>(1)</sup>.

Además, las AHAI se pueden clasificar, de acuerdo con su etiopatogenia o fisiopatología, en primaria o idiopática cuando no presentan una asociación aparente con ninguna enfermedad subyacente y en secundaria cuando se asocia a otra enfermedad. Se puede

considerar AHAI secundaria cuando: 1) la asociación AHAI y enfermedad subyacente ocurre más frecuentemente que cada uno de los cuadros por separado; 2) la resolución o el tratamiento de la enfermedad asociada revierte la AHAI; 3) la AHAI y la enfermedad asociada están relacionadas por la evidencia de alteraciones inmunológicas. Con estos estrictos criterios de clasificación la AHAI primaria o idiopática supone alrededor del 50% de los casos de AHAI<sup>(1)</sup>. Sin embargo, se encuentra una causa secundaria de AHAI en el 20-80% de las series publicadas. Estas causas secundarias incluyen síndromes linfoproliferativos (SLP), enfermedades autoinmunes (EAI), infecciones, situaciones de inmunodeficiencia, trasplantes de órganos sólidos y de progenitores hemopoyéticos, tumores y fármacos (Tabla 1)<sup>(2)</sup>. Los SLP suponen aproximadamente el 50% de los casos de AHAI secundaria tanto por anticuerpos calientes como fríos. Las EAI, en especial el lupus eritematoso sistémico (LES), son la siguiente causa principal de AHAI-C, mientras que las infecciones lo son de la AHAI-F<sup>(1)</sup>.

Algunos fármacos pueden desencadenar mediante diferentes mecanismos un cuadro hemolítico de naturaleza inmune. Algunos fármacos (como la penicilina) actúan como haptenos dosis-dependiente al adherirse a la membrana del hematíe y provocar la aparición de anticuerpos y hemólisis. Otros, por un mecanismo dosis-independiente, se unen al anticuerpo formando inmunocomplejos que se adhieren a la membrana del hematíe activando la cascada del complemento. Por último, determinados fármacos (como la metildopa o fludarabina) pueden provocar la aparición de un fenómeno de autoinmunidad, indistinguible de una AHAI-C, con formación de anticuerpos dirigidos contra antígenos eritrocitarios y hemólisis en ausencia del fármaco<sup>(3)</sup>.

Estas diferenciaciones van a tener implicaciones patogénicas y terapéuticas importantes, por lo que ante el diagnóstico de una AHAI nos debemos plantear siempre estas dos cuestiones: cuál es el tipo de anticuerpo responsable de la hemólisis y si la AHAI es primaria o secundaria.

**Tabla 1.** Prevalencia y tipo de anticuerpos en la AHAI secundaria

Enfermedad o condición asociada	Prevalencia de AHAI (%)	AHAI-C	AHAI-F
Leucemia linfática crónica (LLC)	2,3-4,3	87%	7%
Linfoma no Hodgkin (no LLC)	2,6	Más común	Menos común
Gammapatía monoclonal IgM	1,1	No	Todos
Enfermedad de Hodgkin	0,19-1,7	Casi todos	Raro
Tumores sólidos	Muy raro	2/3	1/3
Quiste dermoide ovárico	Muy raro	Todos	No
Lupus eritematoso sistémico	6,1	Casi todos	Raro
Colitis ulcerosa	1,7	Todos	No
Inmunodeficiencia común variable	5,5	Todos	No
Enfermedad linfoproliferativa autoinmune	50	Todos	No
Trasplante alogénico de PH	4,4	Sí	Sí
Trasplante de órganos sólidos	5,6 (páncreas)	Sí	No
Fármacos en LLC	2,9-10,5	Casi todos	Raro
Interferón $\alpha$	Incidencia: 11,5/100.000 pacientes-año	Todos	0

Lechner K, Jäger U. *Blood* 2010; 116(11): 1831-8

## Incidencia

Pese a ser las anemias hemolíticas adquiridas más frecuentes en nuestro medio, presentan una baja incidencia, algo inferior a la púrpura trombopénica idiopática, que se estima en torno a 1 caso por 100.000 habitantes/año y una prevalencia de 17 por 100.000 habitantes. Aunque pueden aparecer en cualquier grupo de edad, dos tercios de los pacientes diagnosticados de AHAI son mayores de 40 años. Como en la mayoría de las enfermedades autoinmunes, existe una mayor incidencia en mujeres, sobre todo en la 4.<sup>a</sup> y 5.<sup>a</sup> década de la vida, con un pico de incidencia alrededor de la séptima década de la vida con predominio en varones, que parece estar relacionado con el aumento de la incidencia de neoplasias linfoproliferativas con la edad. La mayoría de los casos de AHAI primaria son esporádicos, siendo los casos familiares una excepción<sup>(4)</sup>.

En esta revisión vamos a resumir los aspectos patogénicos y diagnósticos centrándonos en las AHAI por anticuerpos calientes ya que la AHAI por anticuerpos fríos y el tratamiento serán desarrollados en otras ponencias del simposio.

## Patogénesis

La patogénesis de las AHAI es un proceso complejo en el que varios factores juegan un papel esencial en la pérdida de la tolerancia inmunológica a antígenos propios eritrocitarios<sup>(5)</sup>. Se han postulado diferentes hipotéticos mecanismos no excluyentes entre sí para justificar la producción de autoanticuerpos en

tre los que destacan: reactividad cruzada o mimetismo molecular; alteraciones en el sistema del complemento; pérdida en la efectividad de presentación de autoantígenos; anormalidad funcional de linfocitos B y T; pérdida de la regulación en la producción de citocinas (Tabla 2)<sup>(6)</sup>.

### Reactividad cruzada o mimetismo molecular

En la mayoría de los casos de AHAI-C los antígenos diana sobre los que van dirigidos son polipéptidos del grupo Rh que presentan un epítipo polimórfico que está presente en todas las personas, excepto en aquéllos con el fenotipo inusual (Rh nulo). En algunos casos, el epítipo puede incluir algunos o la totalidad de la parte polimórfica de la proteína que define un antígeno específico (por lo general, el antígeno "e"). En una minoría de pacientes otros epítipos de proteínas de otros grupos sanguíneos constituyen los antígenos diana, como las glicoforinas o las proteínas del complejo molecular de la banda 3<sup>(7)</sup>. El mecanismo que más a menudo se ha propuesto para explicar el papel de los autoantígenos en las enfermedades autoinmunes es la reactividad cruzada o el mimetismo entre antígenos medioambientales y autoantígenos, de forma que los antígenos medioambientales determinarían una mayor avidez en el reconocimiento de secuencias de autoantígenos que superarían la tolerancia inmunológica de éstos<sup>(8)</sup>.

En el modelo murino NZB (cepa de ratones negros de Nueva Zelanda), donde los ratones desarrollan una AHAI entre los 5 y 6 meses de edad, el autoantígeno dominante es la banda 3<sup>(9)</sup>. Se ha identificado la

**Tabla 2. Posibles mecanismos de autoinmunidad en la AHAI****Reactividad cruzada o mimetismo molecular**

- Los polipéptidos del grupo Rh constituyen la mayoría de los antígenos en la AHAI-C
- En el modelo murino NZB existe una alta homología entre el autoepítipo de la banda 3 y secuencias bacterianas
- En modelos murinos NZB *knock-out* con ausencia de la banda 3 también se desarrolla una AHAI
- El CD47 sirve como marcador de autoidentidad de los hematíes en modelos murinos
- La interacción de CD47 y de la SIRP- $\alpha$  no juega un papel importante en la hemólisis en humanos

**Alteraciones en el sistema del complemento**

- Disminución de la expresión del CD55 (DAF), CD59 (MIRL), CD35 (CR1) y CD (MCP) en pacientes con enfermedades autoinmunes

**Pérdida en la efectividad de presentación de autoantígenos**

- Alteración en el procesamiento enzimático endosomal de los epítipos de las estructuras moleculares de los autoantígenos
- Unión débil al complejo mayor de histocompatibilidad en su membrana
- Presencia de linfocitos T autorreactivos quiescentes
- Presentación de epítipos crípticos en el procesamiento de autoantígenos

**Anormalidad funcional de linfocitos B y T**

- Activación policlonal de los linfocitos B como consecuencia a la exposición de superantígenos o mitógenos
- Mutaciones somáticas en la secuencia de la región variable de los autoanticuerpos contra la banda 3 en el modelo murino NZB
- El tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-CD4 determina un retraso en la generación de autoanticuerpos en modelos murinos
- La depleción de las células T en ratones impide la inducción de la AHAI en respuesta a la inmunización por hematíes de rata
- Altos niveles del receptor de la interleucina 2 (CD25 +) en linfocitos Treg de pacientes con AHAI y otras enfermedades autoinmunes frente a controles sanos
- Modelos murinos *knock-out* CD25 desarrollan enfermedades autoinmunes
- La transferencia de linfocitos Treg CD4 y CD25 purificados de ratones inmunizados previene el desarrollo de la AHAI

**Pérdida de la regulación en la producción de citocinas**

- La estimulación *in vitro* de las células mononucleadas con autoantígenos Rh determina la proliferación de linfocitos Th1 que producen INF- $\gamma$  e IL-2
- Niveles altos de IL-4 y 10 y bajos de INF- $\gamma$  en pacientes con AHAI en comparación con controles sanos

existencia de una alta homología entre el autoepítipo de la banda 3 y secuencias bacterianas, por lo que éstas o cualquier otro agente medioambiental pueden iniciar, en este modelo, la respuesta inmune contra la banda 3<sup>(10)</sup>. Sin embargo, en modelos murinos NZB *knock-out* con ausencia de la banda 3 también se desarrolla una AHAI de las mismas características, salvo que en estos casos los autoantígenos contra los que se dirigen los autoanticuerpos corresponden a las glicoforinas<sup>(10)</sup>. Por tanto, en los ratones NZB el desarrollo de la AHAI no depende fundamentalmente de la expresión de la banda 3, lo que sugiere que la enfermedad se puede desarrollar sin la necesidad de la existencia de una reactividad cruzada.

El CD47 es una glicoproteína transmembrana que está estrechamente relacionada con las proteínas del grupo Rh en un complejo multiproteico y tiene secuencias homólogas a las inmunoglobulinas, por lo que se ha sugerido que podría estar involucrada en la hemólisis. En modelos murinos *knock-out* se ha demostrado que el CD47 sirve como marcador de autoidentidad de los hematíes, de forma que su unión con la proteína de regulación alfa (SIRP- $\alpha$ ) en la superficie de los macrófagos inhibe su activación y la fagocitosis. Sin embargo, en estudios en humanos no se han observado diferencias en la expresión del

CD47 en hematíes y de la SIRP- $\alpha$  en monocitos en pacientes con AHAI y en individuos sanos, lo que sugiere que no juega un papel importante en la hemólisis<sup>(11)</sup>.

**Alteraciones en el sistema del complemento**

Se han relacionado algunas alteraciones en el sistema del complemento con la pérdida de la tolerancia inmunológica. En este sentido, se ha observado una disminución de ciertas proteínas reguladoras del sistema del complemento en la superficie de los linfocitos T, neutrófilos y hematíes en pacientes con enfermedades con fenómenos autoinmunes como el LES, el sida o la lepra lepromatosa. Así, la disminución de la expresión del CD55 (DAF), CD59 (MIRL), CD35 (CR1) y CD (MCP) se ha relacionado con la presencia de citopenias y el grado de actividad de la enfermedad<sup>(12)</sup>.

**Pérdida en la efectividad de presentación de autoantígenos**

Una de las hipótesis formuladas para explicar el desarrollo de las enfermedades autoinmunes se basa en una alteración en la presentación de los autoan-

tígenos de las células diana por parte de las células presentadoras de antígenos (células dendríticas y macrófagos). En condiciones normales las células presentadoras de antígenos (células dendríticas y macrófagos) capturan estructuras antigénicas y posteriormente las presentan a linfocitos T autorreactivos para inducir una tolerancia inmunológica de los linfocitos T bien por delección (selección negativa) de las clonas reactivas (tolerancia central) o bien por anergia (tolerancia periférica)<sup>(13)</sup>. Una alteración en el procesamiento enzimático endosomal de los epítomos de las estructuras moleculares de los autoantígenos de las células presentadoras de antígenos o una unión débil al complejo mayor de histocompatibilidad en su membrana podría dar como resultado que linfocitos T autorreactivos vírgenes escaparan de los mecanismos de tolerancia inmunológica y permanecieran en el pool de linfocitos T periféricos. Estos linfocitos T autorreactivos permanecerían quiescentes incluso si los autoantígenos que reconocen están presentes y podrían ser activados por reactividad cruzada de estímulos antigénicos ambientales o por nuevos cambios inducidos por citocinas en el procesamiento de autoantígenos que determinarían la presentación de epítomos crípticos<sup>(14)</sup>.

### **Anormalidad funcional de linfocitos B y T**

En las enfermedades autoinmunes se han descrito diferentes alteraciones funcionales que afectan a linfocitos B y T como posibles responsables de su desarrollo. Así, en las AHAI se ha involucrado a una activación policlonal de los linfocitos B como consecuencia a la exposición de superantígenos o mitógenos que escaparían a los diferentes mecanismos de control de la linfoproliferación<sup>(15)</sup>. En diferentes infecciones virales y parasitarias, en modelos murinos y en humanos, se observa un aumento de la producción de autoanticuerpos dirigidos a antígenos eritrocitarios asociado a hiper-gammaglobulinemia policlonal y otros fenómenos autoinmunes como la presencia de inmunocomplejos circulantes o de factor reumatoide<sup>(16)</sup>. Sin embargo, en el modelo murino NZB la secuencia de la región variable de los autoanticuerpos contra la banda 3 muestra la existencia de mutaciones somáticas<sup>(10)</sup>, lo que indica que ha existido una maduración en la afinidad antígeno-anticuerpo y que por tanto la producción de los autoanticuerpos es antígeno-dirigida, lo que va en contra de que la producción de autoanticuerpos, al menos en este modelo murino, sea una manifestación de una activación policlonal de los linfocitos B (por ejemplo, por superantígenos, como se había sugerido previamente).

En cualquiera de los casos, la producción de los autoanticuerpos parece dependiente de linfocitos T. Así, en los ratones NZB, el tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-CD4 determina un retraso en la generación de los autoanticuerpos, y la depleción de las células T de estos ratones impide la inducción de la AIHA en respuesta a la inmunización por hematíes de rata<sup>(17)</sup>. Dentro de las poblaciones de linfocitos T, en varios estudios se ha demostrado la existencia de alteraciones funcionales y numéricas en los linfocitos T CD4 reguladores (T reg), que expresan altos niveles del receptor de la interleucina 2 (CD25 +) en pacientes con AHAI y otras enfermedades autoinmunes frente a controles sanos. En este sentido, en modelos murinos *knock-out* CD25, los ratones desarrollan enfermedades autoinmunes y AHAI con la edad, y en ratones tratados con anticuerpos anti-CD25 la incidencia de AHAI aumentó del 30% al 90% al ser inmunizados con hematíes de rata. Sin embargo, la transferencia de linfocitos T reg CD4 y CD25 purificados de ratones inmunizados en estos modelos prevenía el desarrollo de la AHAI<sup>(18)</sup>. Por tanto, estos linfocitos T reg parece que tienen un importante papel en la generación y el mantenimiento de la tolerancia inmunológica periférica.

### **Pérdida de la regulación en la producción de citocinas**

Los linfocitos T CD4 cooperadores (Th) se pueden clasificar en diferentes tipos funcionales sobre la base de las citocinas que segregan. Los linfocitos Th1 sintetizan interleucina-2 (IL-2), interferón- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), y factor de necrosis tumoral  $\beta$  (TNF- $\beta$ ), e intervienen en la promoción de la inmunidad mediada por células, en la hipersensibilidad de tipo retardado, en la activación de los macrófagos y en la producción de anticuerpos opsonizantes. Por el contrario, los linfocitos Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 y promueven la respuesta alérgica y humoral. El papel de las citocinas Th1 y Th2 en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes es un campo de la investigación en el momento actual. En este sentido, se ha observado que la estimulación *in vitro* de las células mononucleadas con autoantígenos Rh en pacientes con AHAI determina la proliferación de linfocitos Th1 que producen INF- $\gamma$  e IL-2. En contraste también se han observado en pacientes con AHAI niveles altos de IL-4 y 10 y bajos de INF- $\gamma$  en comparación con controles sanos. Estos resultados sugieren que hay una disminución basal de las citocinas Th1 y un aumento de las citocinas Th2 como resultado de una respuesta patógena inicial de linfocitos Th1 seguida de una respuesta Th2 que podría mediar como protección contra la formación de autoanticuerpos<sup>(19)</sup>.

### **Mecanismo de destrucción de los hematíes por los autoanticuerpos IgG**

La destrucción de los hematíes cubiertos por los autoanticuerpos es mediada principalmente por el secuestro y la fagocitosis en los macrófagos de los cordones de Billroth en el bazo y en cierta medida en las células de Kupffer del hígado. Los macrófagos expresan en su superficie receptores para la región Fc de la IgG, en particular para los IgG1 e IgG3 y para los fragmentos opsonizantes de las proteínas C3 y C4 del complemento. Cuando las IgG y el complemento están presentes juntos en la superficie de glóbulos rojos actúan de forma sinérgica potenciándose su opsonización y favoreciendo la fagocitosis de los hematíes. Son necesarias dos moléculas de IgG para fijar el complemento y, dado que los antígenos del sistema Rh, contra los que están dirigidos en la mayoría de las ocasiones los autoanticuerpos, suelen estar separados, la fijación y activación del complemento no es frecuente. La mayoría del secuestro de glóbulos rojos en la AHAI-C ocurre en el bazo, pero la captura en el hígado se puede producir en presencia de grandes cantidades de anticuerpos IgG o la presencia simultánea de proteínas del complemento en la superficie de los hematíes. Éstos, una vez atrapados, pueden ser parcial o totalmente ingeridos por un macrófago. La fagocitosis parcial es más común y conduce a la formación de esferocitos, los cuales, al ser más rígidos y menos deformables que los glóbulos rojos normales, están sujetos a una mayor fragmentación y destrucción en los futuros pasos a través del bazo. Aunque en algunas ocasiones se puede fijar el complemento, la hemólisis intravascular y hemoglobinuria por la activación de los componentes terminales del complemento (C5-C9) son inusuales, en parte por la capacidad de las proteínas reguladoras del complemento en el plasma y en la superficie de glóbulos rojos para abortar la fijación de estos componentes terminales del complemento<sup>(1)</sup>.

### **Diagnóstico**

El diagnóstico de las AHAI se fundamenta, por un lado, en la evidencia clínica y analítica de hemólisis y, por otro, en la demostración serológica de un autoanticuerpo<sup>(20)</sup>.

La naturaleza hemolítica de la anemia se debe confirmar con datos analíticos de destrucción de los hematíes como un aumento de la LDH, una disminución de la haptoglobina y un aumento de la bilirrubina indirecta. Dado que en la AHAI-C el mecanismo de destrucción de los hematíes es fundamentalmente a nivel del sistema mononuclear-fagocítico en el bazo, la existencia de datos de hemólisis intravascular como hemoglobinuria y hemosiderinuria son poco frecuentes. Por tanto, ante la presencia de datos de hemólisis

intravascular, habrá que considerar la posibilidad de otras formas de anemia hemolítica como la AHAI-F, la hemoglobinuria paroxística al frío, la AHAI mixta y la AHAI por drogas<sup>(1)</sup>.

El grado de anemia puede ser muy variable, desde casos prácticamente sin anemia con una hemólisis compensada hasta casos con hemólisis muy severa que comprometa la vida del paciente. Ocasionalmente se puede acompañar de leucopenia, neutropenia o trombopenia, aunque lo habitual es que exista una leve leucocitosis con neutrofilia y una cifra de plaquetas dentro de la normalidad. La existencia de trombopenia por destrucción de mecanismo inmune de las plaquetas se conoce con el nombre de síndrome de Evans, en el que los anticuerpos dirigidos contra las plaquetas son distintos y reconocen estructuras antigénicas diferentes a las de los hematíes<sup>(20)</sup>.

En la sangre periférica es característica la presencia de esferocitos, y su grado se correlaciona con la severidad de la hemólisis. Además existen signos de eritropoyesis acelerada y regeneración medular como la presencia de reticulocitosis y la posible presencia de eritroblastos en sangre periférica. Sin embargo, hasta en un tercio de los pacientes puede presentarse una reticulocitopenia transitoria a pesar de existir una médula ósea normal o con hiperplasia eritroide por destrucción prematura de los reticulocitos. Ante la existencia de una reticulocitopenia persistente habrá que descartar un compromiso medular por una enfermedad subyacente relacionada o no con el trastorno autoinmune, una infección por parvovirus, la existencia de tóxicos o un déficit nutricional. El estudio de la médula ósea no es necesario para establecer el diagnóstico y habitualmente muestra una hiperplasia eritroide y permite descartar la existencia de un proceso linfoproliferativo<sup>(1)</sup>.

La demostración serológica de un autoanticuerpo se realiza mediante la prueba directa de la antiglobulina (PDA) o test de Coombs directo, que demuestra la presencia de anticuerpos o proteínas del complemento en la superficie de los hematíes. Sin embargo, la existencia de una PDA no es diagnóstico de AHAI si no existe evidencia de hemólisis. De esta forma, en el 0,01-0,1% de los donantes de sangre es positivo, y hasta en un 1-15% de los pacientes hospitalizados por adsorción inespecífica de IgG plasmática debidos a cambios en la membrana del hematíe provocados por medicamentos, la PDA puede ser positiva sin que exista hemólisis<sup>(21)</sup>. Por tanto, aunque el hallazgo de una PDA positiva en un paciente afecto de anemia hemolítica se va a corresponder en la gran mayoría de los casos con la naturaleza inmune de la misma, algunos pacientes con anemia hemolítica no inmune como drepanocitosis, beta-talasemia y enfermedades renales también pueden presentar un resultado positivo pero sin una clara relación con la hemólisis.

La PDA se basa en la aglutinación en un tubo de ensayo de los hematíes, que tienen en su superficie moléculas de IgG o complemento, inducida por un antisuero que contiene anticuerpos contra la porción Fc de las IgG, así como frente a determinadas fracciones del complemento (anti-C3d y, en algunos casos, anti-C3b). La obtención de un resultado positivo de la PDA con un antisuero poliespecífico conduce a la repetición de la prueba con los reactivos mono-específicos IgG, C3d y también IgM e IgA, para conocer la naturaleza exacta de las moléculas fijadas a los hematíes. En esta nueva PDA con antisueros mono-específicos pueden presentarse tres posibles patrones:

1) PDA positiva con IgG mono-específica (20-66% de los casos); 2) positiva con IgG y C3d (24-64%); 3) positividad C3d (7-14%). La presencia de una PDA positiva con antisueros mono-específicos frente a IgA e IgM es muy poco frecuente y habitualmente se asocia a la presencia de IgG y/o complemento<sup>(22)</sup>. El significado diagnóstico de estos patrones de la PDA se resume en la [Tabla 3](#).

Existe poca relación entre la intensidad de la reacción de la PDA y la tasa de destrucción de los hematíes. Sin embargo, la tasa de destrucción de los hematíes sí está relacionada con la subclase de inmunoglobulina (Ig) del autoanticuerpo. La IgG1 e IgG3 son más efectivas para producir hemólisis que las IgG2 e IgG4 ya que tienen una mayor afinidad por los receptores Fc de los macrófagos y una mayor actividad en fijar complemento<sup>(22)</sup>.

Un 1-10% de los pacientes con cuadro de AHAI presentan PDA negativa, debido a que la sensibilidad de la prueba no es capaz de detectar en estos casos los anticuerpos o el complemento en los hematíes, a que el autoanticuerpo fijado a los hematíes es de clase IgM o IgA y no pueden ser reconocidos por el suero antiglobulina, o porque los anticuerpos son de

baja afinidad y son eluidos de la superficie de los hematíes *in vitro* durante el proceso de lavado previo a la adición de la antiglobulina<sup>(23,24)</sup>. Aunque no existe unanimidad, se cree que el mínimo número de moléculas de IgG por hematíe que puede ser detectado por el reactivo antiglobulina es de alrededor de 100 a 200 moléculas, dependiendo en parte del tipo de IgG implicada y de la potencia del suero antiglobulina empleado. Existe una cierta relación entre el número de moléculas de IgG fijadas a los hematíes y la intensidad de la reacción<sup>(23)</sup>. La utilización de técnicas alternativas a la PDA convencional como el test de consumo de complemento en el anticuerpo fijado, la técnica de la antiglobulina enzimática, el radioinmunoensayo con anti-IgG, citometría de flujo, aglutinación directa con PEG o polibrene, aglutinación en gel, y técnicas de concentración del eluido, se han utilizado para aumentar la sensibilidad en general, con un menor número de falsos negativos aunque con resultados dispares y difíciles de interpretar, ya que algunas de ellas todavía no están totalmente estandarizadas<sup>(24)</sup>.

En la AHAI-C, también suelen encontrarse los autoanticuerpos libres en el plasma o suero del paciente y pueden ser eluidos o despegados de la superficie de los hematíes para su identificación mediante una prueba de antiglobulina indirecta (PAI). La cantidad de autoanticuerpos en el suero o plasma depende de la cantidad de anticuerpos presente en los hematíes y la afinidad del anticuerpo por los antígenos de los hematíes. En general, cuanto más autoanticuerpos estén presentes y menor sea su afinidad de unión, más probable es que se identifiquen autoanticuerpos en el plasma del paciente. De esta forma, un paciente con un anticuerpo en el plasma (PAI positivo) pero no en los hematíes (PDA negativa) es más probable que no tenga un proceso autoinmune, sino un aloanticuerpo causado por una transfusión o una sensibilización fetomaterna previa<sup>(25)</sup>.

Generalmente, los autoanticuerpos se comportan como panaglutininas, que reaccionarán frente a todos los hematíes normales, dando un resultado positivo en el escrutinio y en la identificación de anticuerpos irregulares, así como en las pruebas cruzadas pretransfusionales. Por tanto, la transfusión de hematíes en la AHAI presenta dos problemas: por un lado, que los hematíes transfundidos también pueden ser hemolizados por el autoanticuerpo y, por otro, que la identificación de posibles aloanticuerpos es muy complicada al estar enmascarados por el autoanticuerpo. En este sentido, el fenotipo antigénico y la autoadsorción con hematíes autólogos para eliminar los autoanticuerpos pueden demostrar o descartar la presencia de aloanticuerpos que faciliten la identificación de sangre lo más compatible posible<sup>(26)</sup>.

No obstante, en las mujeres sin antecedentes de em-

**Tabla 3.** Significado diagnóstico de los patrones de la prueba directa de la antiglobulina (PDA)

Resultado de PDA	Diagnóstico diferencial
Sólo IgG	1) AHAI por anticuerpos calientes 2) secundaria a fármacos (por hapteno o autoanticuerpos)
Sólo complemento	1) AHAI por anticuerpos calientes con baja afinidad 2) AHAI por anticuerpos fríos 3) Hemoglobinuria paroxística <i>a frigore</i> 4) secundaria a fármacos (por inmunocomplejos)
IgG y complemento	1) AHAI por anticuerpos calientes 2) secundaria a fármacos (por autoanticuerpos)

Packman CH. *Blood Reviews* 2008; 22: 17-31

barazo y transfusiones y en los hombres no transfundidos, el riesgo de aloanticuerpos se considera casi ausente, lo que puede permitir la transfusión de hemáties sólo ABO y Rh-compatibles en estos casos ante situaciones de extrema urgencia. La realización de un fenotipo o genotipo extendido con respecto a los subgrupos Rh (C, C, E, e), Kell, Kidd, duffy, y S/s permite transfundir sangre, en lo posible, lo más similar fenotípicamente. Con ello, no sólo se va a asegurar la ausencia de aloanticuerpos dirigidos contra estos antígenos, sino que además se va a minimizar el riesgo de aloinmunización. La aloinmunización constituye otro problema asociado con la transfusión, ya que su frecuencia en estos pacientes, comparada con otros que reciben un número similar de transfusiones, es mucho más elevada<sup>(27)</sup>. En cualquier caso, en situaciones críticas la transfusión no se debe retrasar por estos motivos porque incluso pequeñas cantidades de sangre transfundidas pueden salvar la vida del paciente.

## Bibliografía

- Charles H. Packman. Hemolytic anemia due to warm autoantibodies. *Blood Reviews* 2008; 22: 17-31.
- Lechner K, Jäger U. How I treat autoimmune hemolytic anemias in adults. *Blood* 2010; 116(11): 1831-1838.
- Garratti G. Review: drug-induced immune hemolytic anemia-the last decade. *Immunohematology* 2004; 20(3): 138-146.
- Eaton WW, Rose NR, Kalaydjian A, Pedersen. MG, Mortensen PB. Epidemiology of autoimmune diseases in Denmark. *J Autoimmun.* 2007; 29(1): 1-9.
- Semple JW, Freedman J. Autoimmune Pathogenesis and Autoimmune Hemolytic Anemia. *Semin Hematol* 2005; 42: 122-130.
- Barros MMO, Blajchman MA, Bordin JO. Warm autoimmune hemolytic anemia: recent progress in understanding the immunobiology and the treatment. *Trans Medicine Rev* 2012; 24(3): 195-210.
- Leddy JP, Falany JL, Kissel GE, et al: Erythrocyte membrane proteins reactive with human (warm-reacting) anti-red cell autoantibodies. *J Clin Invest* 1993; 91: 1672-1680.
- Todd JA, Steinman L. The environment strikes back. *Curr Opin Immunol* 1993; 5: 863-865.
- DeHeer DH, Edgington TS. Cellular events associated with the immunogenesis of anti- erythrocyte autoantibody responses of NZB mice. *Transplant Rev* 1976; 31: 116-155.
- Hall AM, Ward FJ, Shen CR, et al: Deletion of the dominant autoantigen in NZB mice with autoimmune hemolytic anemia: Effects on autoantibody and T-helper responses. *Blood* 2007 110: 4511-4517.
- Ahrens N, Pagenkopf C, Kiesewetter H, et al: CD47 is expressed at normal levels in patients with autoimmune haemolytic anaemia and/or immune thrombocytopenia. *Transfus Med* 2006; 16: 397-402.
- Ruiz-Argüelles A, Llorente L: The role of complement regulatory proteins (CD55 and CD59) in the pathogenesis of autoimmune hemocytopenias. *Autoimmun Rev* 2007; 6: 155-161.
- Ohashi PS, DeFranco AL: Making and breaking tolerance. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 744-759.
- Barker RN, Vickers MA, Ward FJ: Controlling autoimmunity-Lessons from the study of red blood cells as model antigens. *Immunol Lett* 2007; 108: 20-26.
- Dziarski R. Autoimmunity: polyclonal activation or antigen induction?. *Immunol Today* 1988; 9: 340-342.
- Musaji A, Meite M, Detalle L, et al: Enhancement of autoantibody pathogenicity by viral infections in mouse models of anemia and thrombocytopenia. *Autoimmun Rev* 2005; 4: 247-252.
- Oliveira GG, Hutchings PR, Roitt IM, et al: Production of erythrocyte autoantibodies in NZB mice is inhibited by CD4 antibodies. *Clin Exp Immunol* 1994; 96: 297-302.
- Mqadmi A, Zheng X, Yazdanbakhsh K: CD4+CD25+ regulatory T cells control induction of autoimmune hemolytic anemia. *Blood* 2005; 105: 3746-3748.
- Hall AM, Ward FJ, Vickers MA, et al: Interleukin-10-mediated regulatory T-cell responses to epitopes on a human red blood cell autoantigen. *Blood* 2002; 100: 4529-4536.
- Dacie SJ. The immune haemolytic anaemias: a century of exciting progress in understanding. *Br J Haematol* 2001; 114(4): 770-85.
- Sokal RJ, Booker DJ, Stamps R. The pathology of autoimmune haemolytic anaemia. *J Clin Pathol* 1992; 45:1047-52.
- Dacie JV. The Haemolytic Anaemias. 3d ed. The Autoimmune Haemolytic Anaemias, vol. 3. New York: Churchill Livingstone; 1992.
- Leger RM, Co A, GHunt P, Garratty G. Attempts to support an immune etiology in 800 patients with direct antiglobulin test-negative hemolytic anemia. *Immunohematology* 2010; 26(4): 156-160.
- Garratty G. Immune hemolytic anemia associated with negative routine serology. *Semin Hematol* 2005; 42: 156-164.
- Branch DR, Petz LD: Detecting alloantibodies in patients with autoantibodies. *Transfusion* 39:6-10, 1999.
- Garraty G, Petz LD. Approaches to selecting blood for transfusion to patients with utoimmune haemolytic anemia. *Transfusion* 2002; 42: 1390-1392.
- Shirey RS, Boyd JS, Parwani AV, Tanz, WS, Ness PM, King KE. Prophylactic antigen matched donor blood for patients with warm autoantibodies: an algorithm for transfusion management. *Transfusion* 2002;42:1936-41.



## Enfermedad hemolítica por anticuerpos fríos

MONTSERRAT LÓPEZ RUBIO

Servicio de Hematología. Hospital Universitario Príncipe de Asturias. Alcalá de Henares (Madrid)

### Introducción

Las anemias hemolíticas autoinmunes (AHAI) son un grupo de enfermedades caracterizadas por hemólisis debida a autoanticuerpos dirigidos contra antígenos de la superficie de los hematíes. Los autoanticuerpos pueden ser reactivos a temperatura corporal (37 °C), en cuyo caso se denominan anticuerpos calientes, o a temperatura inferior, denominándose anticuerpos fríos. Las AHAI se clasifican según la temperatura de reactividad de los anticuerpos y por la presencia o ausencia de enfermedad asociada<sup>(1)</sup> (Tabla 1). Las AHAI por anticuerpos fríos suponen del 13% al 15% de todas las AHAI<sup>(2)</sup>. La patogénesis y el manejo de las AHAI difieren sustancialmente dependiendo de las características del autoanticuerpo; por ello es fundamental un diagnóstico preciso del subtipo.

### Patogenicidad de las aglutininas frías

La hemaglutinación en frío fue descrita en humanos en 1918 y la asociación con hemólisis en 1937. La hemólisis por crioaglutininas causadas por anticuerpos monoclonales fue descrita por primera vez por Dacie en 1957.

Las crioaglutininas (CA) son anticuerpos definidos por su capacidad para aglutinar hematíes a una temperatura óptima de 0-4 °C. La mayoría de las CA son de clase IgM, pero pueden encontrarse IgG o IgA de manera ocasional. Las CA pueden determinarse de manera semicuantitativa, mediante titulación, basada en su capacidad para aglutinar hematíes a 4 °C.

La presencia de anticuerpos fríos circulantes es un fenómeno inespecífico que puede observarse en personas sanas y en un número elevado de enfermedades, como ciertas infecciones víricas, cirrosis hepática y SLPC, sin hemólisis ni enfermedad<sup>(3)</sup>. En estos casos, normalmente la CA es policlonal y se encuentra en títulos bajos, generalmente menores de 64 y raramente por encima de 256. La AHAI por crioaglutininas ocurre en 1:100.000 personas, con un pico de edad en la 7.<sup>a</sup> década de la vida, edad que corresponde con la mayor prevalencia de proteínas monoclonales. En pacientes con componentes monoclonales IgM en suero, se encontraron CA en el 8,5%, con títulos de entre 512 y 65.000, y todos ellos presentaban hemólisis<sup>(4)</sup>. Por tanto, la CA monoclonal es más patogénica que la CA policlonal.

La amplitud térmica se define como la temperatura más alta a la cual la CA reacciona con el antígeno. En general, la patogenicidad de la CA es más dependiente de la amplitud térmica que del título. Si la amplitud térmica excede los 28-30 °C, los hematíes aglutinan en las partes acras del cuerpo, fijan complemento y se produce hemólisis mediada por complemento.

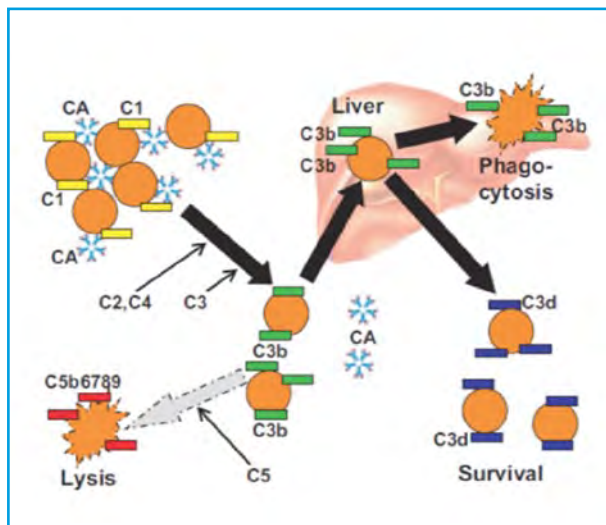
La CA se dirige la mayoría de las veces contra el sistema de grupo sanguíneo I/i, macromoléculas de carbohidratos con distribución diferente según la edad del individuo. Los hematíes de los neonatos expresan casi exclusivamente antígeno i, mientras que el antígeno I predomina en individuos mayores de 18 meses. Las CA con especificidad anti-I son por tanto más patogénicas que los anti-i. Ocasionalmente la CA puede presentar especificidad contra el antígeno Pr, siendo altamente patogénicos<sup>(5)</sup>.

Tabla 1. Clasificación de las anemias hemolíticas autoinmunes

<b>Anticuerpos calientes</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Primaria</li> <li>· Secundaria</li> </ul>
<b>Anticuerpos fríos</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Enfermedad por aglutininas frías primaria crónica</li> <li>· Síndrome de aglutininas frías secundaria:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Asociada con enfermedad maligna (crónica)</li> <li>- Asociada a infección (aguda)</li> </ul> </li> <li>· Hemoglobinuria paroxística a frigore</li> </ul>
<b>Mixta, por anticuerpos calientes y fríos</b>

El mecanismo por el que la CA produce la hemólisis es representado en la [Figura 1](#). El enfriamiento de la sangre a su paso por las partes acras de la circulación provoca la unión de la CA a los hematíes y causa la aglutinación y la unión de la fracción C1 del complemento, que puede iniciar la vía clásica del complemento activando C4 y C2, generando C3 convertasa y formando C3b. Cuando la sangre retorna a las zonas centrales del cuerpo, con una temperatura de 37 °C, la CA se separa de la membrana del hematíe, mientras que C3b se mantiene unido. Una porción de hematíes unidos a C3b son secuestrados por el sistema retículo-endotelial, principalmente en el hígado. En la superficie de los hematíes supervivientes, el C3b es fragmentado, produciendo C3d en la superficie del hematíe. La activación del complemento puede provocar la activación de C5 y posterior formación del complejo de ataque a la membrana provocando hemólisis intravascular, pero está regulada por proteínas de superficie CD55 y CD59, impidiendo la mayoría de las veces la activación de la vía terminal del complemento. Por tanto, el principal mecanismo de hemólisis es la destrucción extravascular de los hematíes unidos a C3b en el SRE.

Estos mecanismos explican por qué el test de Coombs es fuertemente positivo a C3d y negativo para IgM e IgG. En un 20% de pacientes con enfermedad por CA primaria, el test de Coombs es débilmente positivo para IgG, lo cual no debería llevar a un diagnóstico erróneo de AHAI de tipo mixto.



**Figura 1.** Hemólisis mediada por complemento en la enfermedad por crioglobulinas (ver texto). La hemólisis intravascular predomina en situaciones de hemólisis aguda, mientras que en la hemólisis crónica es extravascular, fundamentalmente hepática.

## Enfermedad por crioglobulinas crónica primaria

### 1. Epidemiología

La enfermedad por crioglobulinas crónica primaria acontece en el 15% de todos los casos de AHAI<sup>(2,6)</sup>. La prevalencia en Noruega es de 16 casos por millón de habitantes, y la incidencia, de 1 por millón de habitantes por año. La mediana de edad de los pacientes es de 76 años, y la mediana de comienzo de los síntomas, de 67 años<sup>(7)</sup>.

### 2. Patogenia y manifestaciones clínicas

Por definición, todos los pacientes tienen hemólisis, pero pueden no estar anémicos si la hemólisis está compensada. En el estudio de Berentsen *et al.*<sup>(7)</sup> la mayoría presentaba anemia, con cifras de hemoglobina de entre 4,5 g/dL y valores normales, siendo la mediana de 8,9 g/dL. La mitad de los pacientes precisaron transfusiones durante periodos más o menos largos de tiempo, y el 70% recibió tratamiento farmacológico. Aunque el término “frío” se refiere a las propiedades biológicas de la CA, el 90% de los pacientes experimentaron acrocianosis inducida por el frío y/o fenómeno de Raynaud desde leve a incapacitante. En casos aislados se ha descrito gangrena de extremidades, tanto en enfermedad de CA primaria como asociada a tumores o infecciones<sup>(8)</sup>.

La severidad de la anemia hemolítica está relacionada con la temperatura de los distintos periodos estacionales, pero en al menos 2/3 de los pacientes se producen exacerbaciones con la fiebre en episodios infecciosos y en traumatismos severos<sup>(9)</sup>. La explicación para esta paradójica exacerbación es que durante la reacción de fase aguda aumentan los niveles de C3 y C4, aumentando la hemólisis inducida por complemento.

En el 90% de los pacientes se demuestra IgM monoclonal, generalmente con restricción de cadenas ligeras kappa, pero puede no detectarse debido a baja sensibilidad. La CA anti-I en estos pacientes muestra restricción al segmento génico IGHV4-34<sup>(10)</sup>. La mayoría de los pacientes (75-90%) presentan clonalidad B demostrable por citometría o inmunohistoquímica en el estudio de médula ósea<sup>(7,11)</sup>, siendo el linfoma linfoplasmocítico (50%) y el linfoma de la zona marginal (8%) los más frecuentes.

Debido a que el linfoma linfoplasmocítico es un frecuente hallazgo y la mayoría de los pacientes tienen IgM monoclonal, existe una considerable superposición entre la enfermedad por CA primaria y la macroglobulinemia de Waldenström. En la mayoría de los pacientes que no cumplen la totalidad de los criterios de MW o LZM, la enfermedad por CA puede clasificar-

se como enfermedad relacionada con IgM. A diferencia de las AHAI de anticuerpos calientes, no se asocia con otras enfermedades autoinmunes.

### 3. Diagnóstico

Se debe sospechar enfermedad por CA en un paciente mayor con anemia hemolítica crónica o con clínica hemolítica inducida por el frío. La hemólisis debe confirmarse por test bioquímicos y se requiere la positividad del test de Coombs para demostrar su patogénesis inmune, así como títulos de la CA superiores a 64.

Debido a la aglutinación de los hematíes, el hemograma presenta un número de hematíes bajo y un VCM y CHCM altos, siendo la Hb el único parámetro fiable. Los parámetros se corrigen tras la incubación de la muestra a 37 °C durante 5 minutos en la mayoría de los pacientes. Los reticulocitos están generalmente aumentados, y en el frotis se observa aglutinación con/sin esferocitos, y no es infrecuente encontrar eritroblastos.

En la [Tabla 2](#) se exponen los test diagnósticos a realizar para confirmar el diagnóstico de enfermedad crónica por CA y excluir patología asociada.

### 4. Tratamiento de la enfermedad por crioaglutininas crónica primaria

La mayoría de los pacientes son ancianos, con una supervivencia similar a la de la población de su edad. Aunque sólo el 50% presenta anemia con requerimiento transfusional, más del 90% tiene manifestaciones vasculares que van desde una acrocianosis moderada a fenómeno de Raynaud incapacitante provocado por la exposición al frío, por lo que no se puede calificar como una enfermedad indolente en términos de calidad de vida.

**Tabla 2.** Criterios diagnósticos de enfermedad crónica por CA primaria

	Criterios	Procedimientos y comentarios
Requeridos para el diagnóstico	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Hemólisis crónica</li> <li>· Coombs poliespecífico +</li> <li>· Coombs C3d++</li> <li>· Título de CA &gt; 64 a 4 °C</li> <li>· No enfermedad maligna o infecciosa asociada</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Coombs generalmente IgG-, pero ocasionalmente +débil</li> <li>· Mantener la muestra a 37 °C hasta separar el suero o plasma</li> <li>· Evaluación clínica y radiológica</li> </ul>
Confirmatorios	<ul style="list-style-type: none"> <li>· IgM kappa monoclonal en suero (raramente IgG, IgA o λ)</li> <li>· Excluir SLP clonal por citometría e inmunohistoquímica en biopsia de médula ósea</li> </ul>	Realizar inmunofijación, aunque no banda visible en EEF

Como en la mayoría de las citopenias autoinmunes, la baja prevalencia dificulta el diseño de ensayos clínicos aleatorizados, siendo la mayoría de los resultados extraídos de casos aislados o series retrospectivas con escaso número de pacientes.

#### 4.1. Manejo no farmacológico

Se debe proteger al paciente del frío, especialmente la cara y las extremidades, ya que alivia los síntomas y en muchos casos previene las crisis de hemólisis, al mismo tiempo que evita las infusiones de líquidos fríos.

Se pueden realizar transfusiones de hematíes con determinadas consideraciones:

- A diferencia de los problemas de compatibilidad en las AHAI por anticuerpos calientes, es generalmente fácil encontrar sangre compatible, y el escrutinio de anticuerpos irregulares es generalmente negativo.
- Las pruebas de compatibilidad y escrutinio deben realizarse a 37 °C.
- Se debe mantener cálido al paciente y especialmente la extremidad donde se realiza la transfusión.
- Transfundir productos sanguíneos con escaso contenido en plasma para evitar aportar complemento.

La plasmaféresis resulta eficaz de manera transitoria en situación de hemólisis aguda o previa a cirugía que requiera hipotermia<sup>(12)</sup>.

La esplenectomía no tiene eficacia debido a que la hemólisis es intravascular o hepática.

#### 4.2. Indicaciones para el tratamiento farmacológico

Las recomendaciones para no administrar fármacos en el pasado estaban basadas en la ineficacia de los tratamientos utilizados en las AHAI por anticuerpos calientes por una parte y la infraestimación de la severidad de la anemia y los síntomas clínicos. Un considerable número de pacientes tienen una enfermedad leve, con discreta anemia y con síntomas circulatorios bien tolerados o ausentes. Por tanto, la indicación de tratamiento debe realizarse de manera individualizada.

Los criterios para iniciar tratamiento son: anemia sintomática, dependencia transfusional y los síntomas circulatorios discapacitantes<sup>(13)</sup>.

#### 4.3. Tratamiento de soporte e inmunosupresores inespecíficos

Como medidas generales se recomiendan la administración de ácido fólico y el tratamiento precoz de las infecciones bacterianas.

El tratamiento con esteroides no está indicado ya que se requieren dosis altas y consigue respuestas

en menos del 14% de los pacientes. Los tratamientos con clorambucil y ciclofosfamida en monoterapia son de similar eficacia a los esteroides, y la azatioprina ha resultado ineficaz<sup>(7)</sup>.

El tratamiento sintomático con eritropoyetina se ha usado en USA, pero no en países europeos y no hay estudios publicados.

#### 4.4. Tratamientos dirigidos contra el clon B

El mayor avance en el tratamiento de la enfermedad por CA primaria ha sido el tratamiento con rituximab, que será abordado en la ponencia "Tratamiento de las anemias hemolíticas autoinmunes. Papel de los anticuerpos monoclonales", tanto de forma aislada como asociado a otros fármacos.

#### Síndrome de crioglobulina crónica secundaria a enfermedad maligna

El término síndrome por CA secundaria debe reservarse para aquellos pacientes en los cuales la anemia hemolítica por CA complica una enfermedad maligna bien definida y diferente del LLP o LZM<sup>(14)</sup>.

La frecuencia del síndrome de CAC secundaria es del 2-4%<sup>(2)</sup> y se ha encontrado asociada a LNH difuso de células grandes, enfermedad de Hodgkin, carcinomas, sarcomas, melanomas metastásicos y síndromes mieloproliferativos. Pero la incidencia probablemente esté sobreestimada, ya que en muchos casos es difícil distinguir si realmente son dos entidades independientes o asociadas en un paciente concreto. Clínicamente muestran hallazgos similares a los de la CAC primaria así como características clínicas dependientes de la enfermedad maligna asociada.

El diagnóstico se basa en la presencia de AHAI mediada por CA en un paciente ya diagnosticado de otro tumor. El test de Coombs no difiere de la forma primaria, pero el componente monoclonal no tiene preferencia por la cadena ligera kappa.

#### Síndrome agudo de aglutininas frías asociadas a infección

Se pueden asociar a múltiples infecciones, pero las más frecuentes son la neumonía por *Mycoplasma pneumoniae* (MN) y la infección por el virus de Epstein-Barr (VEB).

En la mayoría de los pacientes con infección por MN se detectan CA, pero generalmente no se produce hemolisis significativa. Sólo en algunos se producen CA en títulos altos y con gran amplitud térmica, provocando hemolisis que puede ser severa<sup>(15)</sup>.

Los anticuerpos son policlonales, generalmente con especificidad anti-I y casi siempre IgM. Los títulos de la CA varían entre 512 y 32.000, y el test de Coombs

es positivo para C3d. La mayoría de los pacientes son adultos, y el cuadro hemolítico ocurre típicamente durante la 2.ª o 3.ª semanas después del comienzo del cuadro febril. En la mayoría de los casos publicados el comienzo es súbito, con palidez, ictericia y algunas veces con postración. La hemolisis intravascular se manifiesta por hemoglobinuria. En general, el pronóstico es bueno y la hemolisis se autolimita en 4-6 semanas, aunque algunos casos pueden ser de evolución fatal.

Comparada con la infección por MN, la mononucleosis infecciosa es una causa infrecuente de AHAI, ocurriendo en el 1% de los casos<sup>(2)</sup>. La incidencia de hemolisis significativa en las infecciones por VEB es desconocida. La CA es policlonal y de especificidad anti-i, con títulos entre 256 y 512. La clase de inmunoglobulina es IgM o IgG, y la anemia hemolítica es transitoria y generalmente leve<sup>(16)</sup>.

Se han descrito casos aislados de AHAI por CA en infecciones por CMV, adenovirus, varicela, rubeola, legionella y listeriosis. La especificidad de los autoanticuerpos puede ser anti-I, anti-i y anti-Pr.

El diagnóstico se sospecha en pacientes adolescentes o adultos jóvenes con infección por MN o mononucleosis infecciosa que presentan anemia o hemoglobinuria, confirmándolo mediante el test de Coombs y titulación de la crioglobulina.

#### Otros síndromes de crioglobulinas secundarios

Se han descrito casos aislados de hemolisis relacionada con CA en pacientes con lupus eritematoso sistémico<sup>(17)</sup>, después de trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos asociados o no a infección viral<sup>(18)</sup> y durante el embarazo<sup>(19)</sup>. También se han descrito casos aislados asociados con fármacos, entre los que se encuentra la lenalidomida<sup>(20)</sup>, aunque es más frecuente que ésta se asocie a AHAI por anticuerpos calientes.

#### Hemoglobinuria paroxística a frigore

La hemoglobinuria paroxística a frigore (HPF) fue descrita como entidad clínica asociada a la sífilis en 1872. El anticuerpo con actividad hemolítica lo describieron Donath y Landsteiner en 1904.

El anticuerpo de Donath-Landsteiner (DL) es un ac. IgG generalmente encontrado en niños tras una infección viral (gripe, rubeola, paperas, varicela o mononucleosis infecciosa) o administración de vacunas. El anticuerpo generalmente aparece 1 semana después del comienzo de la enfermedad y puede persistir durante 1-3 meses.

El anticuerpo es siempre policlonal y dirigido contra el antígeno P de la superficie de la membrana eritrocitaria. El anticuerpo activa la cascada del comple-

mento, causando activación del complejo de ataque a la membrana y hemólisis intravascular.

Es un síndrome hemolítico agudo cuya presentación típica es la de un niño con un síndrome posviral que se inicia algunas horas después de la exposición al frío (exposición corporal parcial o total, ingesta de bebidas muy frías, etc.), con la aparición de ictericia, fiebre, cefalea, dolor lumbar o abdominal, calambres musculares y emisión de orinas oscuras (como la Coca-Cola®). Generalmente es un proceso autolimitado, pero la severidad de la anemia puede provocar muerte súbita. Se han descrito casos de HPF recidivantes<sup>(21)</sup>.

El diagnóstico se basa en el cuadro clínico, signos bioquímicos de hemólisis, con hemoglobinemia y hemoglobinuria y la demostración de la crioaglutinina.

El frotis de sangre periférica muestra policromasia, esferocitos, poiquilocitos, eritroblastos y en algunos casos eritrofagocitosis neutrofílica.

La detección del anticuerpo de DL es técnicamente un reto. El test de Coombs es positivo, pero puede ser débil o negativo debido a que la IgG puede eluirse durante la preparación de las células. Por otra parte, el test de DL es positivo sólo cuando el título del anticuerpo en suero es alto.

La forma más sensible de realizar el test es usando hematíes O papainizados ya que la papainización expone más antígenos P en la membrana de las células. El complemento se añade después de que las células se han sensibilizado con el anticuerpo de DL a 0 °C y se llevan a 37 °C.

El tratamiento es casi siempre de soporte, ya que es un proceso autolimitado, que se resuelve generalmente tras calentar al paciente. Los esteroides son eficaces<sup>(21)</sup> y en algunos adultos se han tratado con ciclofosfamida. La esplenectomía no tiene ningún papel, ya que la hemólisis es intravascular.

## Bibliografía

- Berentsen S, Tjonnfjord GE. Diagnosis and treatment of cold agglutinin mediated autoimmune hemolytic anemia. *Blood Rev* 2012;26(3):107-115.
- Sokol RJ, Hewitt S, Stamps BK. Autoimmune haemolysis: an 18-year study of 865 cases referred to a regional transfusion centre. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1981;282(6281):2023-2027.
- Gertz MA. Management of cold haemolytic syndrome. *Br J Haematol* 2007;138(4):422-429.
- Stone MJ, McElroy YG, Pestronk A, Reynolds JL, Newman JT, Tong AW. Human monoclonal macroglobulins with antibody activity. *Semin Oncol* 2003;30(2):318-324.
- Brain MC, Ruether B, Valentine K, Brown C, ter KH. Life-threatening hemolytic anemia due to an autoanti-Pr cold agglutinin: evidence that glycophorin A antibodies may induce lipid bilayer exposure and cation permeability independent of agglutination. *Transfusion* 2010;50(2):292-301.
- Genty I, Michel M, Hermine O, Schaeffer A, Godeau B, Rochant H. [Characteristics of autoimmune hemolytic anemia in adults: retrospective analysis of 83 cases]. *Rev Med Interne* 2002;23(11):901-909.
- Berentsen S, Ulvestad E, Langholm R et al. Primary chronic cold agglutinin disease: a population based clinical study of 86 patients. *Haematologica* 2006;91(4):460-466.
- Karunaratne S, Weerasinghe S, Govindapala D, Fernando H, Jayaratne B. Cold autoimmune haemolytic anaemia secondary to Epstein Barr virus infection presenting with peripheral gangrene; case report. *Thromb J* 2012;10(1):4.
- Ulvestad E. Paradoxical haemolysis in a patient with cold agglutinin disease. *Eur J Haematol* 1998;60(2):93-100.
- Pascual V, Victor K, Spellerberg M, Hamblin TJ, Stevenson FK, Capra JD. VH restriction among human cold agglutinins. The VH4-21 gene segment is required to encode anti-I and anti-i specificities. *J Immunol* 1992;149(7):2337-2344.
- Berentsen S, Bo K, Shammans FV, Myking AO, Ulvestad E. Chronic cold agglutinin disease of the "idiopathic" type is a premalignant or low-grade malignant lymphoproliferative disease. *APMIS* 1997;105(5):354-362.
- Zoppi M, Oppliger R, Althaus U, Nydegger U. Reduction of plasma cold agglutinin titers by means of plasmapheresis to prepare a patient for coronary bypass surgery. *Infusionsther Transfusionsmed* 1993;20(1-2):19-22.
- Berentsen S. How I manage cold agglutinin disease. *Br J Haematol* 2011;153(3):309-317.
- Niaianle F, Hamnvik OP, Gulmann C et al. Diffuse large B-cell lymphoma with isolated bone marrow involvement presenting with secondary cold agglutinin disease. *Int J Lab Hematol* 2008;30(5):444-445.
- Linz DH, Tolle SW, Elliot DL. Mycoplasma pneumoniae pneumonia. Experience at a referral center. *West J Med* 1984;140(6):895-900.
- Dacie J. Auto-immune haemolytic anaemia (AIHA): cold-antibody syndromes IV: haemolytic anaemia following infectious mononucleosis and other viral infections. In: Dacie J, editor. *The Haemolytic Anaemias*. London: Churchill Livingstone; 1992:313-328.
- Srinivasan N, Oswal A, Garg S, Nahar J, Gosmonova A, Nahar R. Cold agglutinin induced hemolysis in a newly diagnosed systemic lupus erythematosus. *Am J Med Sci* 2010;339(3):270-273.
- Azuma E, Nishihara H, Hanada M et al. Recurrent cold hemagglutinin disease following allogeneic bone marrow transplantation successfully treated with plasmapheresis, corticosteroid and cyclophosphamide. *Bone Marrow Transplant* 1996;18(1):243-246.
- Batalias L, Trakakis E, Loghis C et al. Autoimmune hemolytic anemia caused by cold agglutinins in a young pregnant woman. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2006;19(4):251-253.
- Brauer DL, Edelman B, Rapoport AP, Hess JR, Akpek G. Plasma exchange and rituximab treatment for lenalidomide-associated cold agglutinin disease. *Transfusion* 2012;52(11):2432-2435.
- Evans-Jones G, Clough V. Recurrent paroxysmal cold haemoglobinuria. *Transfus Med* 2004;14(4):325.

## Hemolisis inmune asociada a trasplante

N. CARPIO MARTÍNEZ<sup>1</sup>, F MOSCARDÓ<sup>2</sup>, P SOLVES<sup>2</sup>, MA SANZ<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Jefe de Sección; <sup>2</sup> Médico Adjunto; <sup>3</sup> Jefe de servicio.

Servicio de Transfusión. Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Universitario La Fe. Valencia

### Introducción

La anemia hemolítica de causa inmune es uno de los efectos adversos que aparecen en el curso del trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) y en los trasplantes de órganos sólidos (TOS). La evaluación de los factores de riesgo de desarrollar hemolisis y un adecuado manejo de los pacientes y del soporte transfusional necesario pueden ayudarnos a minimizar los efectos de la hemolisis en estos pacientes críticos.

Aunque ambos tipos de trasplantes comparten causas de hemolisis que explican la sintomatología, las diferencias entre el tipo de trasplante, el tipo de inmunidad implicada y la agresividad del tratamiento concomitante al trasplante hace recomendable estudiar estos cuadros por separado.

### Trasplante de progenitores hematopoyéticos

La hemolisis inmune, ya sea por aloinmunidad o autoinmunidad, es una complicación bien definida en el TPH. El mecanismo patogénico más común es la incompatibilidad en los antígenos de los glóbulos rojos (GR), principalmente del sistema ABO. La identidad HLA no garantiza la identidad de grupo ABO<sup>(1)</sup> y sabemos que hasta el 40% de los injertos alogénicos emparentados y el 50% de los injertos alogénicos no emparentados tienen algún grado de incompatibilidad en el grupo ABO<sup>(2)</sup>. Esta incompatibilidad puede ser mayor cuando el sistema inmune del receptor es capaz de producir Ac frente a los antígenos de los GR del donante (paciente O y donante A), incompatibilidad menor cuando el sistema inmune del donante puede producir Ac frente a los GR del receptor (paciente A y donante O) o incompatibilidad mixta cuando se dan las dos circunstancias (paciente A y donante B). Éstos son ejemplos de aloinmunidad en la que intervienen donante y receptor; sin embargo, la anemia hemolítica autoinmune (AHAI) definida como hemolisis producida por la aparición de Ac

del sistema inmune del receptor frente al receptor o del donante frente al donante es más raramente observada<sup>(3)</sup>. En este caso la AHAI se ha asociado a una variedad de circunstancias tales como el GVHD crónico, depleción de células T y en donantes no emparentados.

### TPH con incompatibilidad ABO mayor entre donante y receptor

#### Hemolisis aguda

La administración de GR ABO incompatibles puede ocasionar una hemolisis aguda intravascular, sobre todo cuando la fuente de progenitores es la médula ósea. Este riesgo de hemolisis puede minimizarse realizando una depleción de los mismos mediante alguno de los métodos disponibles, hidroxietilalmidón (HES)<sup>(4)</sup> o dextrano<sup>(5)</sup>, etc., que permiten no sobrepasar los 20 mL de GR. En estas condiciones los progenitores se administran pero monitorizando siempre el riesgo de hemolisis. Cuando la fuente de progenitores es la sangre periférica, las separadoras de células pueden realizar este purgado del producto a infundir en el momento de la separación y finalmente en el caso de progenitores de cordón umbilical, al ser un producto descongelado y lavado, no precisa otras medidas. Otra manera de prevenir esta hemolisis ABO se basa en la disminución del título de aglutininas anti-A y anti-B en el receptor hasta niveles de 1/16 o menos, antes del trasplante, mediante procedimientos de plasmaféresis<sup>(6)</sup>.

#### Hemolisis retardada

Cuando los títulos de isoaglutininas son muy elevados puede aparecer una hemolisis retardada de los GR que son producidos por el injerto<sup>(7)</sup>. Si esta hemolisis es muy importante puede llegar a ocasionar una aplasia de la serie roja que puede durar meses o años y que precisa altos requerimientos transfusionales<sup>(8)</sup>.

Estos pacientes deben ser monitorizados para detectar precozmente la elevación de los títulos. Algunos autores indican en esta fase del trasplante la necesidad de realizar recambios plasmáticos para disminuir los títulos. La desaparición o disminución de los títulos parece estar en relación con los donantes no emparentados e incluso con grados importantes de enfermedad injerto contra huésped (GVHD)<sup>(9)</sup>.

La selección de los componentes sanguíneos para estos pacientes parece un buen método para minimizar este riesgo de hemólisis retardada. En este sentido, la transfusión de GR debe ser siempre compatible con donante y receptor, y la transfusión de plasma y plaquetas debe evitar el aporte de aglutininas frente al grupo del injerto. En la [Tabla 1](#) puede verse muestra la guía para la transfusión de pacientes con incompatibilidad ABO y Rh<sup>(10)</sup>.

### TPH con incompatibilidad ABO menor entre donante y receptor

Dos son los principales riesgos de hemólisis en este tipo de trasplante, la infusión de linfocitos del donante, inmunológicamente competentes, y la administración de Ac. junto con el injerto.

**Tabla 1.** Soporte transfusional en los pacientes sometidos a TPH con incompatibilidad ABO y Rh

	Receptor	Donante	Hemáties	Plasma y plaquetas <sup>a</sup>
I ABO mayor	O	A	O	A, AB
	O	B	O	B, AB
	O	AB	O	AB
	A	AB	A, O	AB
I ABO menor	B	AB	B, O	AB
	A	O	O	A, AB
	B	O	O	B, AB
	AB	O	O	AB
I ABO mayor y menor	AB	A	A, O	AB
	AB	B	B, O	AB
Incompatibilidad Rh	A	B	O	AB
	B	A	O	AB
Incompatibilidad Rh	Rh +	Rh -	Rh -	Indiferente
	Rh -	Rh +	Rh -	Indiferente

<sup>a</sup> Hay que tener en cuenta que las plaquetas pueden ir suspendidas en una solución conservante y, por tanto, los problemas con las aglutininas se minimizan. Asimismo, si la contaminación de las mismas por hemáties es importante, puede ser necesario realizar profilaxis anti-D en pacientes jóvenes

### Síndrome del linfocito pasajero

El llamado “síndrome del linfocito pasajero” es una complicación bien conocida que se produce en el TPH con incompatibilidad menor y en el trasplante de órganos sólidos cuando hay una incompatibilidad menor entre receptor e injerto.

El síndrome se produce por una proliferación de los linfocitos del injerto que producen Ac. frente a antígenos del receptor. Esta reacción antígeno-anticuerpo suele ser repentina y aparece en los 10 o 20 días del injerto, tiempo en que se cree maduran los linfocitos del donante. Diversos factores incrementan el riesgo de desarrollar esta complicación, especialmente el uso de progenitores de sangre periférica frente a los de médula ósea y los acondicionamientos pretrasplante de intensidad reducida. El uso de ciclosporina sola sin metrotexato para la prevención del EICH<sup>(11)</sup> parece jugar un papel importante.

Los signos clínicos de los casos de hemólisis grave intravascular son hemoglobinemia, hemoglobinuria y fallo renal. En casos menos severos se produce una caída de la hemoglobina, un aumento de la bilirrubina y de la LDH en sangre y una disminución de la haptoglobina. La hemólisis persiste 5 o 10 días hasta que los hematíes incompatibles son eliminados o el clon de linfocitos se agota.

El diagnóstico serológico se produce ante un DAT positivo IgG o C3d o ambos, y la presencia del anticuerpo se detecta en suero o en el eluido de los hematíes. Los Ac. más frecuentes pertenecen al sistema ABO, anti-A y anti-B. En estos casos el paciente es A, B o AB, y el donante es O y quizás estos pacientes O tienen títulos más altos de IgG anti-A e IgG anti-B.

Otros anticuerpos diferentes a anti-A y anti-B se han detectado implicados en esta complicación, aunque generalmente no causan una hemólisis tan severa. Entre ellos destaca el D<sup>(12)</sup>, anti-E, anti-s, anti-Jkb y anti-Jka<sup>(13)</sup>.

En la [Tabla 2](#) puede verse un resumen del diagnóstico diferencial de la hemólisis en pacientes después de TPH<sup>(13)</sup>.

### Hemólisis en los GR del paciente

Además de la hemólisis producida por el síndrome del linfocito pasajero, los GR del paciente pueden hemolizarse por el paso de Ac. con el injerto. En estos casos suele ser precoz, antes del prendimiento del injerto, pero hay que tener en mente que estos linfocitos del donante están ya estimulados para la producción de ese Ac. Y puede llegar a producir un cuadro de hemólisis grave.

**Tabla 2.** Diagnóstico diferencial de la hemólisis en pacientes después de TPH<sup>(18)</sup>

<b>Incompatibilidad ABO menor entre donante y receptor</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Síndrome del linfocito pasajero</li> <li>• Infusión de Ac. presentes en el injerto</li> </ul>
<b>Incompatibilidad ABO mayor entre donante y receptor</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hemólisis de los GR del donante por Ac. del receptor</li> <li>• Hemólisis temprana de GR donante por rebote de isoaglutininas en pacientes sometidos a recambio plasmático</li> <li>• Hemólisis retardada de los GR injertados por isoaglutininas residuales</li> </ul>
<b>Alotanticuerpos frente a los GR diferentes a los del sistema ABO</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Producidas por las células injertadas del sistema inmune del donante</li> <li>• Producidas por las células residuales del sistema inmune del paciente</li> </ul>
<b>Anemia hemolítica autoinmune</b>
<b>Transfusión pasiva de anticuerpos</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Por transfusión de plasma</li> <li>• Por transfusión de plaquetas</li> <li>• Por inmunoglobulinas intravenosas</li> <li>• Otras causas de transferencia pasiva de Ac., hematíes, gammaglobulina anti-D</li> </ul>
<b>Anemia hemolítica producida por drogas</b>
<b>Anemia hemolítica microangiopatía</b>
<b>Otras causas de hemólisis</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infusión de <i>stem cell</i> criopreservada</li> <li>• Infusión de DMSO</li> </ul>
<b>Septicemia por el <i>Clostridium perfringens</i></b>
<b>Hemólisis asociada con hemodialisis</b>

### TPH con incompatibilidad mixta ABO mayor y menor

En estos casos de incompatibilidad mixta, mayor y menor, pueden darse todas las complicaciones vistas hasta ahora.

### Hemólisis por anemia hemolítica autoinmune

La hemólisis autoinmune después del TPH es una complicación bien conocida<sup>(1)</sup>. Clásicamente se ha asociado a una gran variedad de circunstancias, tales como EICH, la depleción de linfocitos T y el trasplante de progenitores no emparentado. Puede aparecer entre los 3 meses y los 3 años del trasplante. El diagnóstico se establece cuando el DAT es positivo y los resultados del eluido o las absorciones son idénticos a aquellas que se producen en las AHAI convencionales.

La frecuencia de esta complicación oscila entre el 3,1% y el 6%, mucho más alta que la frecuencia de la población general (0,001%)<sup>(15)</sup>. Sabemos que en el paciente trasplantado el mecanismo de selección tímica por el que se seleccionan los linfocitos T para proteger a los antígenos del organismo puede estar alterado debido al tratamiento de acondicionamiento. Este

tratamiento incluye dosis elevadas de quimioterapia o radioterapia que alteran el timo retrasando la recuperación de su función normal. En este contexto, clones de linfocitos incapaces de reconocer los antígenos propios del donante como tales pueden expandirse y generar, en el contexto de la EICH crónica, complicaciones que se asemejan a conocidas enfermedades autoinmunes. Así, en el contexto del TPH pueden verse casos de miastenia *gravis*, miositis y polimiositis o anemias hemolíticas autoinmunes, entre otras.

En este contexto el tratamiento para la AHAI, que incluye corticoides, inmunoglobulinas, recambios plasmáticos, ciclofosfamida, rituximab, bortezomib y eculizumab, es poco efectivo. Algunos autores describen una mortalidad de hasta el 50%<sup>(14,15)</sup>. En el estudio de Sanz *et al.*<sup>(9)</sup>, que refieren una alta incidencia de AHAI, ésta puede ser debida a la realización del DAT, de manera generalizada en cada extracción de sangre para pruebas de compatibilidad, desde el momento del trasplante. De esta manera, no pasan desapercibidos cuadros de hemólisis leves que no se detectarían sin esta determinación. Finalmente la mayoría de los autores relacionan esta complicación como un aspecto más de la EICH, incluso describen que puede ser una manifestación temprana de EICH crónica<sup>(16)</sup>.



## Hemolisis en el trasplante de órganos sólidos

La identidad entre donante y receptor del grupo sanguíneo ABO en los trasplantes de órganos sólidos ha sido una barrera insalvable para el éxito del trasplante. Pero recientemente se han desarrollado programas de trasplantes, generalmente renales y de donantes vivos que permiten el trasplante incompatible ABO preparando previamente a los pacientes mediante plasmaféresis, rituximab y gammaglobulinas con el objeto de disminuir los títulos de isoaglutininas y evitar el rechazo agudo. Esta misma situación se produce en otros órganos, trasplante de corazón en neonatos incompatible ABO, o cuando se producen por error trasplantes ABO incompatibles. En este contexto la vigilancia en el título de aglutininas ha de ser estrecho para prevenir rechazos y cuadros de hemolisis.

### Síndrome del linfocito pasajero

Este síndrome es similar en su expresión clínica y en los hallazgos de laboratorio al síndrome que se ha descrito en el TPH. Se ha descrito en trasplantes de hígado, riñón, pulmón, corazón, páncreas, etc. Ramsey, en una antigua revisión en 1991<sup>(17)</sup>, señala que los trasplantes de órganos en los que existe una incompatibilidad de grupo ABO menor presentan una incidencia de hasta el 61% cuando el donante es O y el receptor B, un 22% cuando el donante es O y el receptor B y un 17% cuando el receptor es AB y el donante tiene cualquier grupo diferente al AB.

Parece que la anemia hemolítica en estos pacientes está en relación con la masa de linfocitos que pasan con el órgano trasplantado. Ramsey<sup>(17)</sup> encuentra que la frecuencia de Ac. y hemolisis era más baja en el trasplante renal (17%), intermedia en el trasplante hepático (40%) y superior en el trasplante pulmonar (70%).

La hemolisis es generalmente abrupta. En las pruebas de laboratorio aparecen los datos típicos de hemolisis, DAT positivo, aumento de bilirrubina, LDH. La hemolisis comienza entre los 3 y los 24 días del trasplante y aparecen anti-A y anti-B con mayor frecuencia aunque se han descrito otros Ac., D, c, E, etc.

El tratamiento de esta complicación se basa en transfundir sangre sin el antígeno correspondiente al Ac., generalmente hematíes de grupo O que se mantendrá hasta que el Ac. desaparezca. En la [Tabla 3](#) puede verse la selección de componentes para el trasplante de órganos en función del grupo ABO de donante y receptor<sup>(18)</sup>.

### Conclusión

El conocimiento de las interacciones inmunes que ocurren tanto en el trasplante de progenitores como en el de órganos sólidos es imprescindible para in-

**Tabla 3.** Selección de componentes sanguíneos en el trasplante de órganos<sup>(18)</sup>

Receptor	Donante	Hematíes	Plasma Plaquetas 1.ª elección	Plaquetas 2.ª elección
O	A	O	B, AB	B, O
	B	O	B, AB	A, O
	AB	O	AB	A, B, O
A	O	A, O	A, AB	B, O
	B	A, O	AB	B, A, O
	AB	A, O	AB	A, B, O
B	O	B, O	B, AB	A, O
	A	B, O	AB	A, B, O
	AB	B, O	AB	B, A, O
AB	O	AB, A, B, O	AB	A, B, O
	A	AB, A	AB	A, B, O
	B	AB, B	AB	B, A, O

vestigar y tratar estos episodios de hemolisis. Para el diagnóstico diferencial de la hemolisis en el TPH hay que valorar cuidadosamente el momento de la aparición en relación con la fecha de la infusión, el acondicionamiento pretrasplante, la fuente de progenitores utilizada y el tipo de incompatibilidad ABO.

La prevención de la hemolisis en ambos tipos de trasplante con una política transfusional adecuada y su detección precoz son la mejor herramienta para evitar incidentes y minimizar su gravedad.

### Bibliografía

- Petz, LD. Hemolysis associated with transplantation. *Transfusion* 1998; 38: 224-228.
- SD Rowley, ML Donato and P Bhattacharyya. Red blood cell-incompatible allogeneic hematopoietic progenitor cell transplantation. *Bone Marrow transplantation* 2011; 46: 1167-1185.
- J Sanz, F Arriaga, P Montesinos, G Orti, I Lorenzo. S Cantero et al. Autoimmune hemolytic anemia following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adult patients. *Bone Marrow transplantation* 2007; 39: 555-561.
- Warkentin PI, Hilden JM, Kersey JH, Ramsay NK, McCullough J. Transplantation of major ABO-incompatible bone marrow depleted of red cells by hydroxyethyl start. *Vox Sang* 1985; 48: 89-104.
- Tsang KS, Li CK, Wong AP, Leung Y, Lau TT, Li K et al. Processing of major ABO-incompatible hematopoietic bone marrow for transplantation by using dextran sedimentation. *Transfusion* 1999; 39: 1212-1219.
- Stussi G, Halter J, Bucheli E, Valli PV, Seebach L, Gmur J et al. Prevention of pure red cell aplasia after major or bidirectional ABO blood group incompatible hematopoietic stem cell transplantation by pretransplant reduction of host anti-donor isoagglutinins. *Hematologica* 2009; 94: 239-248.
- Lee JH, Lee JH, Choi SJ, Kim S, Seol M, Kwon SW et al. Changes of isoagglutinin titers after ABO-incompatible allogeneic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol* 2003; 120: 702-710.

8. Bolan CD, Leitman SF, Griffith LM, Wealey RA, Procter JL, Stroncek DR et al. Delayed donor red cell chimerism and pure red cell aplasia following major ABO-incompatible nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2001; 98: 1687-1694.
9. Mielcarek bM, Leisenring W, Torok-Storb R. Graft-versus-host disease and donor-directed hemagglutinin titers after ABO-mismatched related and unrelated marrow allografts: evidence for a graft-versus-plasma cell effect. *Blood* 2000; 96: 1150-1156.
10. Gajewski JL, Johnson VV, Sandler SG, Sayegh A, Klumpp TR. A review of transfusion practice before, during, and after hematopoietic progenitor cell transplantation. *Blood* 2008; 112:3036-3047.
11. Worel N, Greinix UT, Mitterbauer M, Lechner K, Fischer G et al. Severe Immune hemolysis after minor ABO mismatched allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation occurs more frequently after nonmyeloablative than myeloablative conditioning. *Transfusion* 2002; 42: 1293-1301.
12. Adam BR, Miller AN, and Costa LJ. Self-limited hemolysis due to anti-D passenger lymphocyte syndrome in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2010; 45: 771-773.
13. Petz LD, Garratty G. Immune hemolysis associated with transplantation, in Petz LD, Garratty G (eds): *Immune Hemolytic Anemia* (ed 2). Philadelphia, PA, Churchill Livingstone, 2004, pp 459-516.
14. O'Brien TA, Eastlung T, Peters C, Neglia JP, Defor T, Ramsay N and Baker S. Autoimmune haemolytic anemia complicating hematopoietic cell transplantation in pediatric patients: high incidence and significant mortality in unrelated donor transplants for non-malignant diseases. *British Journal of Haematology* 2004; 127: 67-75.
15. Rovira J, Cid J, Gutierrez-Garcia G, Pereira A, Fernandez-Avilés F, Rosiñol L, Martinez C et al. Fatal immune Hemolytic Anemia Following Allogeneic Stem cell Transplantation: Report of 2 cases and Review of Literature. *Transfusion Medicine Reviews* 2013;
16. Sevilla J, Gonzalez-Vicent M, Madero L and Díaz MA. Acute autoimmune hemolytic anemia following unrelated cord blood transplantation as an early manifestation of chronic graft-versus-host-disease. *Bone Marrow Transplantation* 2001; 28: 89-92.
17. Ramsey G: Red cell antibodies arising from solid organ transplants. *Transfusion* 1991; 31: 76-86.
18. Petz LD. Immune Hemolysis Associated with Transplantation. *Seminars in Hematology* 2005; 42: 145-155.

## Tratamiento de las anemias hemolíticas autoinmunes. Papel de los anticuerpos monoclonales

F. JAVIER PEÑALVER PÁRRAGA

Unidad de Hematología y Hemoterapia.

Hospital Universitario Fundación Alcorcón (Madrid). Universidad Rey Juan Carlos. Fuenlabrada (Madrid)

### Introducción

En la anemia hemolítica autoinmune (AHAI), autoanticuerpos IgG y/o IgM dirigidos contra antígenos de la superficie del hematíe desencadenan su destrucción por el sistema retículo-endotelial y el complemento, respectivamente. Alrededor del 80% de los pacientes con AHAI producen autoanticuerpos calientes de isotipo IgG que reaccionan más fuertemente *in vitro* a temperaturas cercanas a 37 °C. El resto de los pacientes presentan autoanticuerpos fríos, que se adhieren al hematíe con mayor avidez a temperaturas cercanas a 0-4 °C. Aunque la AHAI puede ser idiopática, el 20-80% de los pacientes presentan una causa secundaria como síndromes linfoproliferativos, enfermedades autoinmunes (EAI), infecciones, situaciones de inmunodeficiencia y tumores<sup>(1)</sup>.

### Visión general del tratamiento de la AHAI

Para el clínico, los 2 parámetros de crucial importancia al plantear un adecuado acercamiento terapéutico a un paciente con AHAI son el tipo de anticuerpo implicado y si la AHAI es primaria o secundaria. El objetivo primario del tratamiento sería reducir la producción de autoanticuerpos o la destrucción de hematíes, así como mantener al paciente clínicamente confortable y prevenir las crisis hemolíticas con tratamiento médico con los menores efectos secundarios tanto a corto como a largo plazo.

Las decisiones terapéuticas en la AHAI hasta el momento no están suficientemente basadas en evidencia de calidad, sino esencialmente en la experiencia<sup>(2)</sup>, pues no se dispone de bastantes estudios aleatorizados y sí de algunos estudios de fase II prospectivos.

#### Tratamiento de la anemia hemolítica autoinmune por anticuerpos calientes

En pacientes con AHAI por autoanticuerpos calientes (AHAI-C) que requieren tratamiento, los corticoi-

des representan la primera línea de tratamiento, aunque sólo el 15-20% de los pacientes alcanza remisión completa (RC)<sup>(1)</sup>.

La esplenectomía y el rituximab son los únicos tratamientos de segunda línea que han probado eficacia a corto plazo. La eficacia de la esplenectomía es alta, con respuestas a corto plazo en 2/3 de los pacientes<sup>(3)</sup> con un rango del 38% al 82%, dependiendo de la proporción de casos de AHAI secundaria<sup>(2)</sup>.

Las opciones terapéuticas para pacientes que no responden, recaen o no son candidatos a esplenectomía, y también de los que o no responden o recaen a rituximab, son limitadas. Los citotóxicos e inmunosupresores como la ciclofosfamida, azatioprina y ciclosporina consiguen tasas de respuesta del 40-60%, aunque con efectos secundarios graves. La eficacia de otras opciones como inmunoglobulinas, plasmaféresis y danazol es controvertida<sup>(1,4-5)</sup>.

#### Tratamiento de la anemia hemolítica autoinmune por anticuerpos fríos

Los cuadros de AHAI por anticuerpos fríos (AHAI-F) en niños y adultos jóvenes son principalmente transitorios y secundarios a una infección bacteriana (*Mycoplasma pneumoniae*) o viral (virus de Epstein-Barr o citomegalovirus)<sup>(6)</sup>.

La enfermedad por aglutininas frías (EAF) crónica primaria es la principal causa de AHAI-F en mayores de 60 años y supone el 13-15% de todas las AHAI<sup>(7)</sup>. La EAF crónica está asociada con la presencia de anticuerpos monoclonales IgM-k con especificidad anti-I en el 90% de los casos. La EAF crónica primaria debe ser considerada como una enfermedad linfoproliferativa clonal caracterizada por la expansión clonal de linfocitos B y características de linfoma linfoplasmocítico en la médula ósea<sup>(6)</sup>.

Los pacientes con EAF pueden ser manejados durante mucho tiempo únicamente con tratamiento de soporte y sintomático. Evitar el frío, el tratamiento temprano de los episodios febriles infecciosos y la pre-

vención de éstos mediante vacunación antiinfluenza o neumococo son medidas fundamentales en el manejo de estos pacientes. Aunque la EAF se considera una enfermedad linfoproliferativa indolente lentamente progresiva, la dependencia transfusional puede observarse en más del 50% de los pacientes con episodios recurrentes de hemólisis activa<sup>(8)</sup>.

En aquellos pacientes con hemólisis activa que necesitan ser tratados, los corticosteroides generalmente no son eficaces y no deben utilizarse. Como la hemólisis tiene lugar fundamentalmente en el hígado, la esplenectomía no es efectiva y debe evitarse. La inmunosupresión con clorambucil o ciclofosfamida oral consigue respuestas en una minoría de pacientes. También la plasmaféresis puede ser temporalmente eficaz, en casos de hemólisis severa. En pacientes dependientes de transfusión, dosis altas de darbepoetina pueden ser útiles manteniendo el estímulo para la producción compensatoria de hematíes. Sin embargo, en general estas opciones terapéuticas son insatisfactorias<sup>(6)</sup>.

### Anticuerpos monoclonales en el tratamiento de la AHAI

El rituximab ha sido el anticuerpo monoclonal más ampliamente utilizado en pacientes con AHAI. El rituximab es un anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico humano específico para el antígeno CD20 expresado en los linfocitos B maduros normales y neoplásicos. Basándose en su potente capacidad para la depleción de linfocitos B, se ha utilizado para el tratamiento de enfermedades autoinmunes hematológicas y no hematológicas<sup>(9)</sup>.

Aunque hay una buena respuesta inicial a los corticosteroides en la AHAI-C, aún hay muchos pacientes que no responden, otros que recaen al disminuir la dosis o al suspenderlos y otros pacientes que desarrollan efectos secundarios intolerables. Estos pacientes pueden ser rescatados con esplenectomía. Sin embargo, para los pacientes que no responden a esplenectomía las opciones terapéuticas se limitan a la utilización de citotóxicos e inmunosupresores que se asocian a efectos secundarios graves. En estos pacientes, así como en aquéllos con contraindicaciones para la esplenectomía o que la rehúsan, se ha utilizado el rituximab como alternativa terapéutica.

En la EAF su etiología clonal linfoproliferativa ha animado a la utilización de rituximab aportando una nueva opción terapéutica.

#### *El rituximab en el tratamiento de la AHAI-C*

El rituximab es una opción razonable para el tratamiento de segunda línea o para los pacientes que recaen tras esplenectomía.

Los datos de eficacia y seguridad del rituximab en el tratamiento de la AHAI se basan mayoritariamente en estudios retrospectivos con pocos pacientes, que incluyen pacientes con AHAI-C y EAF, así como casos primarios y secundarios. Por otro lado, es difícil la comparación de las tasas de respuesta entre estudios por la ausencia de una definición universal de respuesta, especialmente respuesta completa.

La eficacia del rituximab en la AHAI-C se comunicó inicialmente en niños mediante 3 estudios prospectivos que incluían entre 6 y 15 pacientes, con respuestas globales (RG) en el 84-100% de los pacientes<sup>(9)</sup>.

En adultos, hasta 2007 se publicaron 7 estudios<sup>(9)</sup>, 3 de los cuales fueron prospectivos, que incluyeron entre 5 y 14 pacientes (Tabla 1). En estos estudios el rituximab consiguió una media de respuesta del 74% (40-100%). Las respuestas tuvieron una duración de entre 3 y más de 95 meses. También 5 pacientes fueron retratados alcanzando un 100% de respuestas completas.

Entre 2009 y 2010 se han publicado 3 estudios retrospectivos<sup>(10-12)</sup> incluyendo un número de pacientes de entre 27 y 53 (Tabla 2). En el estudio del grupo español sobre el uso de rituximab en la AHAI<sup>(12)</sup>, se incluyeron 36 pacientes, el 75% con AHAI-C, el 37% con AHAI primaria y el 36% esplenectomizados. La tasa de RG fue del 77%, con un 61% de RC (Figura 1). Todos los pacientes que alcanzaron RC la mantuvieron durante más de 6 meses, con una mediana de seguimiento de 14 meses (1-86). En un análisis de Kaplan-Meier, la media estimada de respuesta mantenida (RM) fue de 65,9 meses (IC 95%: 52,9-78,9), y una probabilidad estimada de RM entre 6 y 83 meses de alrededor del 75% (Figura 2). Fueron predictores de RM alcanzar RC y negativizar el test de Coombs con el tratamiento (Figura 3).

En general, el tratamiento con rituximab en la AHAI es bien tolerado. Con la cautela de que la mayoría de los estudios son retrospectivos, los efectos adversos comunicados fueron predominantemente leves o moderados y en relación con la infusión. Se analizó la toxicidad del tratamiento con rituximab en pacientes con AHAI en 7 estudios que incluyeron 76 pacientes, comunicándose 5 infecciones graves y 2 pacientes que fallecieron por septicemia<sup>(13)</sup>. En otro estudio 2 pacientes tuvieron una infección grave y un paciente falleció de infarto de miocardio<sup>(10)</sup>. El rituximab ha sido asociado con reactivación del VHB en portadores. Sin embargo, la complicación más grave a largo plazo del tratamiento con rituximab es la leucoencefalopatía multifocal progresiva, que ha sido observada en 2 pacientes con AHAI<sup>(2)</sup>. Hay que considerar que cuando se utilice rituximab antes de la esplenectomía debe vacunarse previamente contra gérmenes encapsulados.

Los pacientes con AHAI-C que recaen tras el tratamiento con rituximab han sido retratados, incluso con dosis repetidas, a modo de mantenimiento, recuperando mayoritariamente el mismo patrón de respuesta que perdieron<sup>(9,10-12)</sup>.

La dosis óptima de rituximab en EAI no ha sido establecida. En general, se ha utilizado la misma dosis empleada para el tratamiento de linfomas. En un intento de minimizar los efectos secundarios, reducir costes, y considerando que en las EAI la “masa” de linfocitos B sería menor que en un linfoma, se ha explorado la utilización de dosis bajas de rituximab (100 mg, dosis fija, semanal, 4 infusiones) en citopenias autoinmunes. En la AHAI se han utilizado dosis bajas en 23 pacientes con AHAI primaria, 61% AHAI-C. La RG fue

del 82,6% a los 2 meses y cercana al 90% entre los 6 y los 12 meses. Respuestas del 100% en pacientes con AHAI-C<sup>(14)</sup>.

La combinación de rituximab, ciclofosfamida y dexametasona ha demostrado ser efectiva y bien tolerada como tratamiento de segunda línea en pacientes con citopenias autoinmunes asociadas a leucemia linfática crónica (LLC)<sup>(12)</sup>. En un trabajo reciente<sup>(15)</sup>, en 48 pacientes con citopenias autoinmunes asociadas a LLC, esta combinación logró respuesta en el 89% de los pacientes independientemente del tipo de enfermedad autoinmune. La duración mediana de la respuesta fue de 24 meses, pero fue mayor en la AHAI.

En la AHAI secundaria a linfoma, las mejores respuestas han sido obtenidas con quimioterapia anti-linfoma asociada a rituximab.

**Tabla 1.** Estudios del tratamiento con rituximab en AHAI en adultos hasta 2007 (modificada de Garvey<sup>(9)</sup>)

Autor (año)	Tipo de estudio	Pacientes (retratados)	Tipo de AHAI*	Edad (años)	Hb (g/L)	Rituximab (dosis <sup>^</sup> )	Respuesta global (%)	Respuesta completa (%)	Duración respuesta (meses)
Gupta (2002)	P	8 (5)	C	46-70	50-99	2-5	100	87,5	7-22+
Trapé (2002)	P	5	C	44-66	47-98	4	100	60	3-20+
Shanafelt (2003)	R	5	C	21-79	51-83	3-8		40	4+, 13+
Zaja (2003)	P	5	C (80%)	42-84	73-55	4		40	8+, 38+
Narat (2005)	R	11	C	18-81	40-90	4	63	27	2,5-20+
D'Arena (2006)	R	14	C	48-87	42-117	3 (3); 4 (11)	71	21	NA
D'Arena (2007)	R	11	C	23-81	43-117	4	100	73	1+-20+

AHAI: anemia hemolítica autoinmune; P: estudio prospectivo; R: estudio retrospectivo; C: AHAI por anticuerpos calientes; \*(): % de pacientes con AHAI-C; ^ dosis de rituximab: (), pacientes que recibieron el número indicado de dosis

**Tabla 2.** Estudios del tratamiento con rituximab en AHAI en adultos desde 2009

Autor (año)	Tipo de estudio	Pacientes (retratados)	Tipo de AHAI*	Edad (años)	Hb (g/L)	Rituximab (dosis <sup>^</sup> )	Respuesta global (%)	Respuesta completa (%)	Duración respuesta (meses)
Bussone <sup>(10)</sup> (2009)	R	27 (3)	C	49 +/- 21	22-98	4 (24); 2 (1); 3 (1); 1 (1)	93	30	
Driericks <sup>(11)</sup> (2009)	R	53 (9)	C (68%)	1-87	40-142	4 (93%)	79	47	15 (0,5-62)
Peñalver <sup>(12)</sup> (2010)	R	36	C (75%)	20-86	33-127	4 (80%)	77	61	19 (6-86)

AHAI: anemia hemolítica autoinmune; R: estudio retrospectivo; C: AHAI por anticuerpos calientes; \*(): % de pacientes con AHAI-C; ^ dosis de rituximab: (), número de pacientes o % de pacientes que recibieron el número de dosis señalado

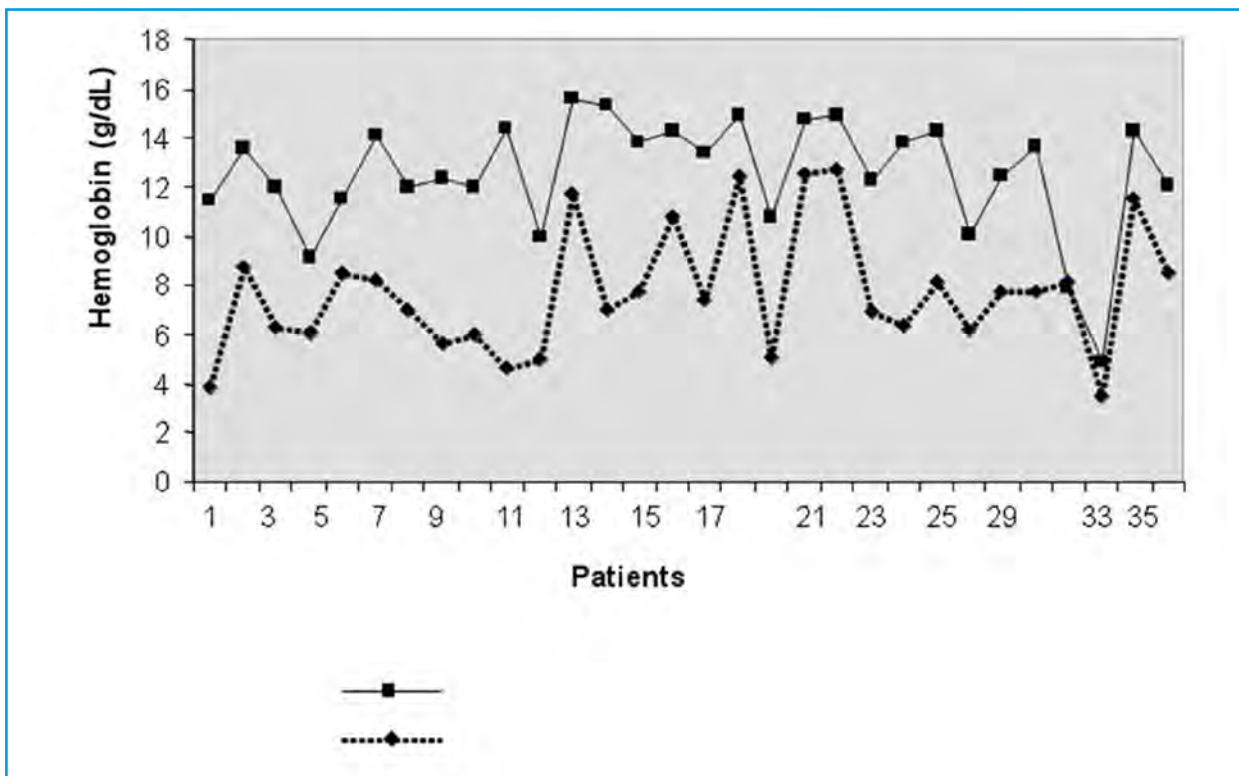


Figura 1. Evolución de los niveles de hemoglobina. La mediana de hemoglobina antes del tratamiento (línea discontinua) fue de 7 g/dL, y en la máxima respuesta, la mediana de hemoglobina fue de 13 g/dL. Hubo un aumento significativo de la hemoglobina respecto del nivel pretratamiento ( $p < 0,001$ ). Hemoglobina postratamiento (línea continua).

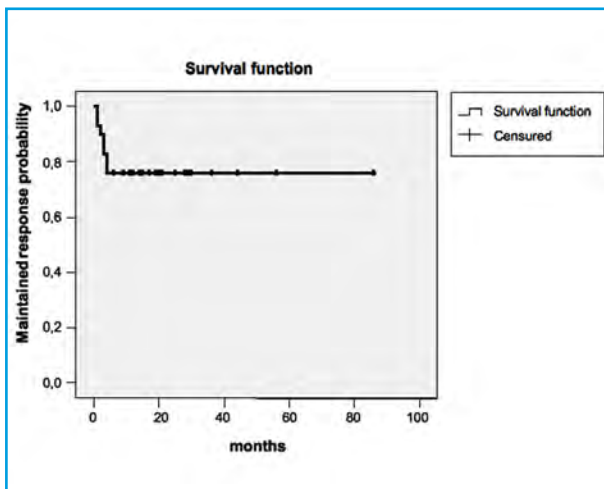


Figura 2. Análisis de Kaplan-Meier de respuesta mantenida.

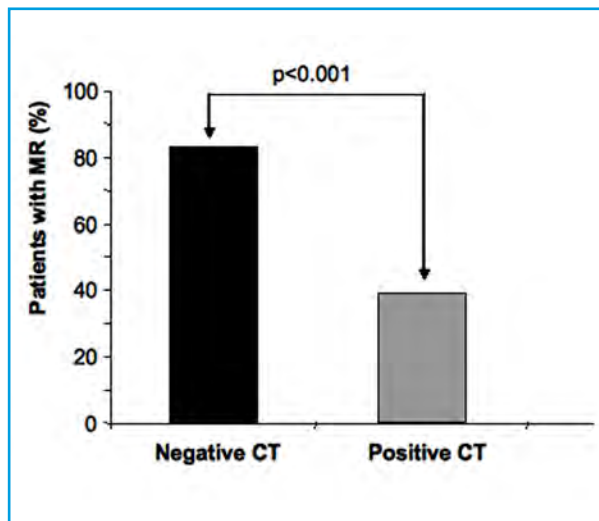


Figura 3. Relación entre Coombs directo y respuesta mantenida. 15 de 18 pacientes con RM negativizaron el Coombs directo, y el número de estos pacientes fue significativamente mayor que el de los que alcanzaron RM pero mantuvieron el Coombs directo positivo ( $p < 0,001$ ). CT indica test de Coombs

### El rituximab en el tratamiento de la EAF

La EAF primaria es definida como una AHAI-F en pacientes con una gammapatía monoclonal de significado incierto o un linfoma con infiltración medular. El rituximab ha sido el tratamiento más efectivo y mejor evaluado en la EAF. En los últimos años, la eficacia del rituximab en monoterapia o en combinación con fludarabina en la EAF ha sido valorada en 3 estudios prospectivos.

En el primero, Berentsen *et al.*<sup>(16)</sup> realizó un estudio abierto, no controlado, prospectivo de fase 2 de rituximab en monoterapia en 27 pacientes. Se consiguió una RG del 54% (una RC y 19 RP). La mediana de du-

ración de la respuesta fue de 11 meses (0,5-4 años) y muchas de las recaídas respondieron al retratamiento con rituximab. Resultados similares fueron comunicados por Schöllkop *et al.*<sup>(17)</sup> en 20 pacientes, con tasas de RG del 45%.

En un intento de mejorar los resultados obtenidos en la EAF con rituximab en monoterapia, Berentsen *et al.*<sup>(18)</sup> realizaron un estudio multicéntrico prospectivo no controlado para valorar la eficacia del tratamiento con fludarabina y rituximab. En total, 22 de 29 pacientes respondieron (76%), 6 (21%) alcanzaron RC y 16 (55%) RP. La mediana de tiempo a la respuesta fue de 4 meses. Siete de 10 pacientes que no habían respondido previamente a rituximab en monoterapia lo hicieron a la combinación. El tiempo estimado de duración de la respuesta fue de 66 meses. Doce pacientes (41%) tuvieron toxicidad hematológica G 3-4, y 1 paciente murió de neumonía 9 meses después de iniciado el tratamiento. Aunque la toxicidad puede ser limitante para esta combinación, en especial en pacientes mayores, este régimen es el más efectivo de los testados hasta el momento en la EAF.

### Otros anticuerpos monoclonales

Dado que la actividad hemolítica de las aglutininas frías es dependiente de complemento, el eculizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado anti-C5, puede ser una opción terapéutica teóricamente prometedora. Sólo se ha comunicado un caso que sugiera la eficacia del eculizumab en la EAF<sup>(19)</sup>.

En pacientes con AHAI-C secundaria a LLC dependientes de transfusión y que han fallado a tratamientos combinados con rituximab, el alemtuzumab puede ser considerado como último recurso. Cinco pacientes con LLC-B evolucionada, resistentes a tratamiento convencional, con AHAI dependiente de transfusiones frecuentes, tratados con alemtuzumab, respondieron con un aumento de la hemoglobina  $\geq 2$  g/dL y permanecieron estables sin nuevos episodios de AHAI tras una mediana de seguimiento de 12 meses<sup>(20)</sup>.

### Conclusiones

El rituximab consigue un efecto clínico no logrado por otras opciones terapéuticas en pacientes con AHAI con un perfil de toxicidad favorable. Su uso permite retrasar o evitar la esplenectomía en pacientes con AHAI-C además de reducir o evitar los inmunosupresores citotóxicos y eludir su toxicidad. La combinación de rituximab, ciclofosfamida y esteroides debe ser considerada como una opción terapéutica en pacientes con AHAI asociada a LLC, debido a los excelentes resultados obtenidos. En la EAF, los pacientes sintomáticos y con hemólisis activa pueden

ser tratados con rituximab en monoterapia o en combinación con fludarabina, que han demostrado ser los tratamientos más efectivos.

Son necesarios estudios prospectivos bien diseñados, con un buen número de pacientes para contestar las cuestiones pendientes sobre el tratamiento con rituximab en la AHAI como su “posición” en la estrategia terapéutica de la AHAI, la dosis óptima, el papel del retratamiento y las combinaciones.

### Bibliografía

- Gehrs BC, Friedberg RC. Autoimmune hemolytic anemia. *Am J Hematol.* 2002; 69:258-271.
- Lechner K, Ulrich Jäger U. How I treat autoimmune hemolytic anemias in adults. *Blood* 2010; 116(11):1831-1838.
- Packman CH. Hemolytic anemia due to warm autoantibodies. *Blood Rev.* 2008; 22(1):17-31.
- King KE, Ness PM. Treatment of autoimmune hemolytic anemia. *Semin Hematol.* 2005; 42:131-136.
- Petz LD. Treatment of autoimmune hemolytic anemias. *Curr Opin Hematol.* 2001; 8:411-416.
- Michel M. Classification and therapeutic approaches in autoimmune hemolytic anemia: an update. *Expert Rev Hematol.* 2011; 4(6):607-618.
- Berentsen S. How I manage cold agglutinin disease. *Br J Haematol.* 2011; 153: 309-317.
- Berentsen S, Ulvestad E, Langholm R, Beiske K, Hjorth-Hansen H, Ghamina W et al. Primary chronic cold agglutinin disease: a population based clinical study of 86 patients. *Haematologica.* 2006; 91:460-466.
- Garvey B. Rituximab in the treatment of autoimmune haematological disorders. *Br J Haematol.* 2008; 141(2):122-130.
- Bussone G, Ribeiro E, Dechartres A, Viallard JF, Bonnotte B, Fain O et al. Efficacy and safety of rituximab in adults' warm antibody autoimmune hemolytic anemia: retrospective analysis of 27 cases. *Am J Hematol.* 2009; 84(3):153-157.
- Dierickx D, Verhoef G, Van Hoof A, Mineur P, Roest A, Triffet A et al. Rituximab in auto-immune hemolytic anemia and immune thrombocytopenic purpura: a Belgian retrospective multicentric study. *Journal of Internal Medicine.* 2009; 266:484-491.
- Peñalver FJ, Jimenez-Yuste V, Almagro M, Alvarez-Larran A, Rodriguez L, Casado M et al. Rituximab in the management of chronic immune thrombocytopenic purpura: an effective and safe therapeutic alternative in refractory patients. *Ann Hematol.* 2006; 85:400-406.
- Gürçan HM, Keskin DB, Stern JNH, Nitzberg MA, Shekhani H, Ahmed AR. A review of the current use of rituximab in autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol.* 2009; 9(1):10-25.
- Barcellini W, Zaja F, Zaninoni A, Imperiali FG, Battista ML, Di Bona E et al. Low-dose rituximab in adult patients with idiopathic autoimmune hemolytic anemia: clinical efficacy and biologic studies. *Blood.* 2012; 119(16):3691-3697.
- Rossignol J, Michallet A-S, Oberic L, Picard M, Garon A, Willekens C, et al. Rituximab-cyclophosphamide-dexamethasone combination in the management of autoimmune cytopenias associated with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2011; 25:473-478.
- Berentsen S, Ulvestad E, Gjertsen BT, Hjorth-Hansen H, Langholm R, Knutsen H et al. Rituximab for primary chronic cold agglutinin disease: a prospective study of 37 courses of therapy in 27 patients. *Blood.* 2004; 103:2925-2928.
- Schöllkopf C, Kjeldsen L, Bjerrum OW, Mourits-Andersen HT, Nielsen JL, Christensen BE et al. Rituximab in chronic

- cold agglutinin disease: a prospective study of 20 patients. *Leuk Lymphoma*. 2006; 47:253-260.
18. Berentsen S, Randem U, Vagan AM, Hjorth-Hansen H, Vik A, Dalgaard J et al. High response rate and durable remissions following fludarabine and rituximab combination therapy for chronic cold agglutinin disease. *Blood*. 2010; 116:3180-3184.
  19. Röth A, Hüttmann A, Rother RP, Dührsen U, Philipp T. Long-term efficacy of the complement inhibitor eculizumab in cold agglutinin disease. *Blood*. 2009; 113(16):3885-3886.
  20. Karlsson C, Hansson L, Celsing F, Lundin J. Treatment of severe refractory autoimmune hemolytic anemia in B-cell chronic lymphocytic leukemia with alemtuzumab (humanized CD52 monoclonal antibody). *Leukemia*. 2007; 21:511-514.



## Evolución clonal y su importancia en el tratamiento del mieloma múltiple

COORDINADORES: JOAQUÍN MARTÍNEZ LÓPEZ. *Servicio de Hematología. Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid*  
ENRIQUE OCIO SAN MIGUEL. *Servicio de Hematología. Hospital Clínico Universitario de Salamanca*

En los últimos 2 años se han producido grandes avances en el conocimiento de la biología del mieloma múltiple. Gran parte de estos avances se han debido al desarrollo de técnicas moleculares de alta capacidad y sensibilidad (en concreto; la secuenciación masiva paralela, la hibridación genómica comparada y los arrays de SNP), y al estudio de muestras seriadas, guardadas en biobancos, de enfermos con mieloma múltiple. Desde el año 2000 se estableció un modelo de mieloma lineal que justificaba el proceso de evolución en fases de esta enfermedad, basado en la afectación universal de las ciclinas. En varios estudios realizados durante este último año se ha establecido que existe una evolución clonal en ramas en algunos casos de mieloma que justificaría la dinámica de respuesta y resistencia a los diferentes tratamientos empleados<sup>(1-5)</sup>. Este modelo evolución clonal, aunque teórico, podría influir en el futuro en la forma de tratar a los enfermos con mieloma. Justificaría los tratamientos con múltiples combinaciones de fármacos y el empleo de tratamientos secuenciales, así como la elección de retratamientos o combinaciones no empleadas en las diferentes recaídas.

### Bibliografía

1. Walker BA, Wardell CP, Johnson DC, Kaiser MF, Begum DB, Dahir NB, et al. Characterization of IGH locus breakpoints in multiple myeloma indicates a subset of translocations appear to occur in pregerminal center B cells. *Blood*. 2013 Feb 22;121(17):3413-9.
2. Keats JJ, Chesi M, Egan JB, Garbitt VM, Palmer SE, Braggio E, et al. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood*. 2012;120(5):1067-76.
3. Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ, Cibulskis K, Sougnez C, Schinzel AC, et al. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature*. 2011;471(7339):467-72.
4. Walker BA, Wardell CP, Melchor L, Hulkki S, Potter NE, Johnson DC, et al. Intraclonal heterogeneity and distinct molecular mechanisms characterize the development of t (4; 14) and t (11; 14) myeloma. *Blood*. 2012;120(5):1077-86.
5. Egan JB, Shi CX, Tembe W, Christoforides A, Kurdoglu A, Sinari S, et al. Whole-genome sequencing of multiple myeloma from diagnosis to plasma cell leukemia reveals genomic initiating events, evolution, and clonal tides. *Blood*. 2012;120(5):1060-6.

## Clonal competition and dominance and its role in the treatment of multiple myeloma

P. LEIF BERGSAGEL

Mayo Clinic, Arizona (USA)

### Introduction

Multiple myeloma (MM) cells are the malignant counterpart of post-germinal center (GC) long-lived PCs, characterized by strong BM dependence, somatic hypermutation (SHM) of immunoglobulin (Ig) genes, and isotype class switch resulting in absence of IgM expression in all but 1% of tumors. However, MM cells differ from healthy PCs because they retain the potential for a low rate of proliferation (1-3% of cycling cells). Virtually every case of MM is preceded by a pre-malignant PC tumor called monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) that, like MM, produces a typical M-spike (almost always non-IgM) by SPEP or free light chain in the urine<sup>(1)</sup>.

### Primary IgH translocations are an early oncogenic event shared by MGUS and MM

Translocations involving the immunoglobulin heavy chain (IgH) locus are present in at least half of MM cases and are thought to result from errors during the physiological process of CSR or SHM. It is presumed that these translocations represent primary – perhaps initiating – oncogenic events as normal B-cells pass through GCs. These translocations result in dysregulated expression of an oncogene that is juxtaposed to the strong Ig enhancers. The prevalence of IgH translocations increase with disease stage: about 50% in MGUS, 55-70% for intramedullary MM, 85% in extramedullary MM, and >90% in MM cell lines.

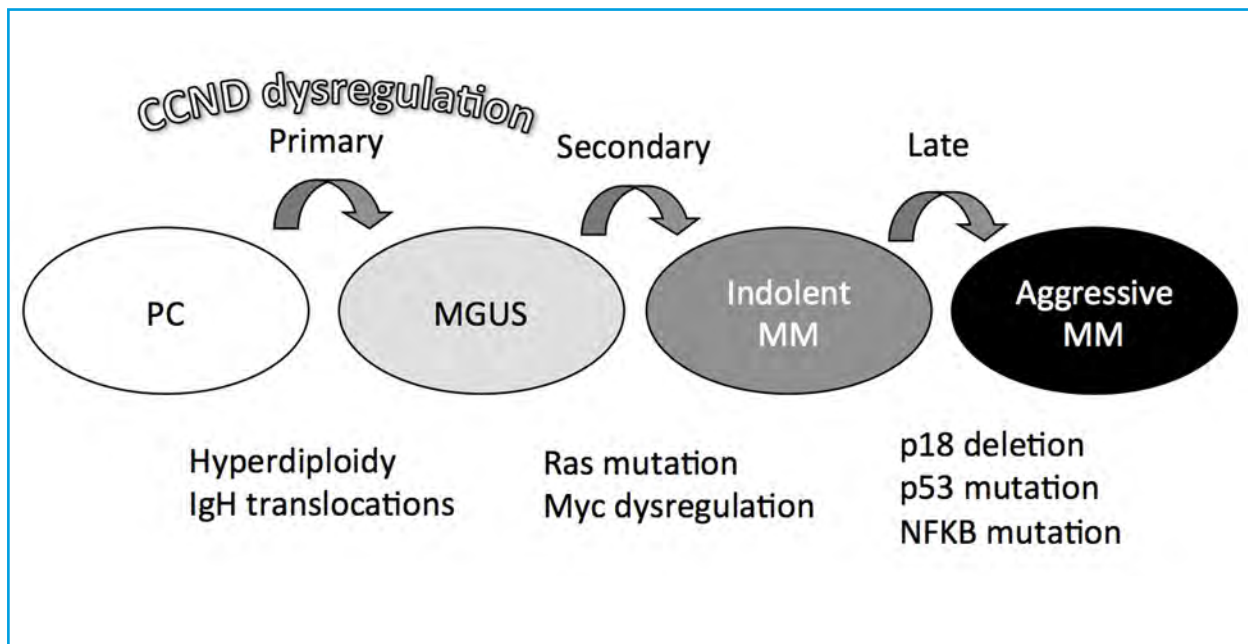
### Primary IgH translocations dysregulate three gene groups: CCND, MAF and FGFR3/MMSET

There are three recurrent primary IgH translocation groups in MM: CYCLIN D (11q13-*CYCLIN D1*; 12p13-*CYCLIN D2*; 6p25-*CYCLIN D3*) MAF (16q23-*MAF*; 20q12-*MAFB*; 8q24.3-*MAFA*;

MMSET/*FGFR3* -4p16- (*MMSET* in all but also *FGFR3* in 80% of these tumors) (Figure 1). It is thought that *CYCLIN D* translocations only dysregulate expression of a *CYCLIN D* gene. By contrast MAF translocations dysregulate expression of a MAF transcription factor that causes increased expression of many genes, including *CYCLIN D2* and adhesion molecules that are thought to enhance the ability of the tumor cell to interact with the BM microenvironment. MMSET is a chromatin-remodeling factor that is over-expressed in all tumors with a t(4;14), whereas about 20% of tumors lack der(14) and *FGFR3* expression. It is a histone methyltransferase for H3K36me2, and when over-expressed results in a global increase in H3K36me2 methylation, and a decrease in H3K27me3 methylation, which most likely is the cause of the many changes in gene expression observed in t(4;14) tumors<sup>(2,3)</sup>. In addition, it recently has been determined that MMSET is important for H4K20 methylation at the sites of double strand DNA breaks<sup>(4)</sup>. Importantly, loss of MMSET expression alters adhesion, suppresses growth, and results in apoptosis of HMCLs, suggesting that it is an attractive therapeutic target<sup>(2)</sup>.

### Multiple trisomies is an alternative pathogenetic pathway

There is a consensus that chromosome content reflects at least two pathways of pathogenesis. Nearly half of MGUS and MM tumors are hyperdiploid (HRD), usually with extra copies of three or more specific chromosomes (3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 21). Strikingly, HRD tumors rarely (~10%) have a primary IgH translocation, whereas Non-hyperdiploid (NHRD) tumors usually (~70%) have an IgH translocation. HRD patients seem to have a better prognosis than NHRD patients. Interestingly, in patients with t(4;14) or t(14;16) or t(14;20) or del17p the presence of one or more trisomies is as-



**Figure 1.** Cyclin Ds dysregulation in MM. MGUS and MM karyotypes can be divided into hyperdiploid and non-hyperdiploid based on chromosomal content. Dysregulation of MYC and activating mutations of KRAS are associated with the progression of MGUS to MM. A variety of mutations that affect the pathways shown are associated further disease progression.

sociated with a substantially better prognosis than absence of trisomies<sup>(5)</sup>.

### Cyclin Ds are ectopically expressed throughout MM progression

Almost all cases of plasma cell neoplasm starting from the MGUS stage and independently on the chromosome content aberrantly express one or more of the CYCLIN D genes and it has been proposed that dysregulation of a CYCLIN D gene provides a unifying, early oncogenic event in MGUS and MM. Although this is not associated with increased proliferation, the expression level of cyclin D1, cyclin D2 or cyclin D3 mRNA in MM and MGUS is distinctly higher than in normal PCs. This results from several mechanisms including a direct cis-dysregulation in MM tumors with a CYCLIN D gene translocation or a trans-dysregulation in tumors with a translocation of MAF, encoding a transcription factor that directly bind to the CYCLIN D2 promoter. Although MMSET/FGFR3 tumors express moderately high levels of CYCLIN D2, the cause of increased CYCLIN D2 expression remains unknown. The majority of HRD tumors express CYCLIN D1 bi-allelically, perhaps because they contain a trisomic chromosome 11, whereas most other tumors express increased levels of CYCLIN D2 by unknown mechanism. Only a few percent of MM tumors do not express any CYCLIN D gene, many of which show bi-allelic deletion of RB1, the cell cycle inhibitor directly

targeted by CYCLIN D, therefore bypassing the need for CYCLIN D gene.

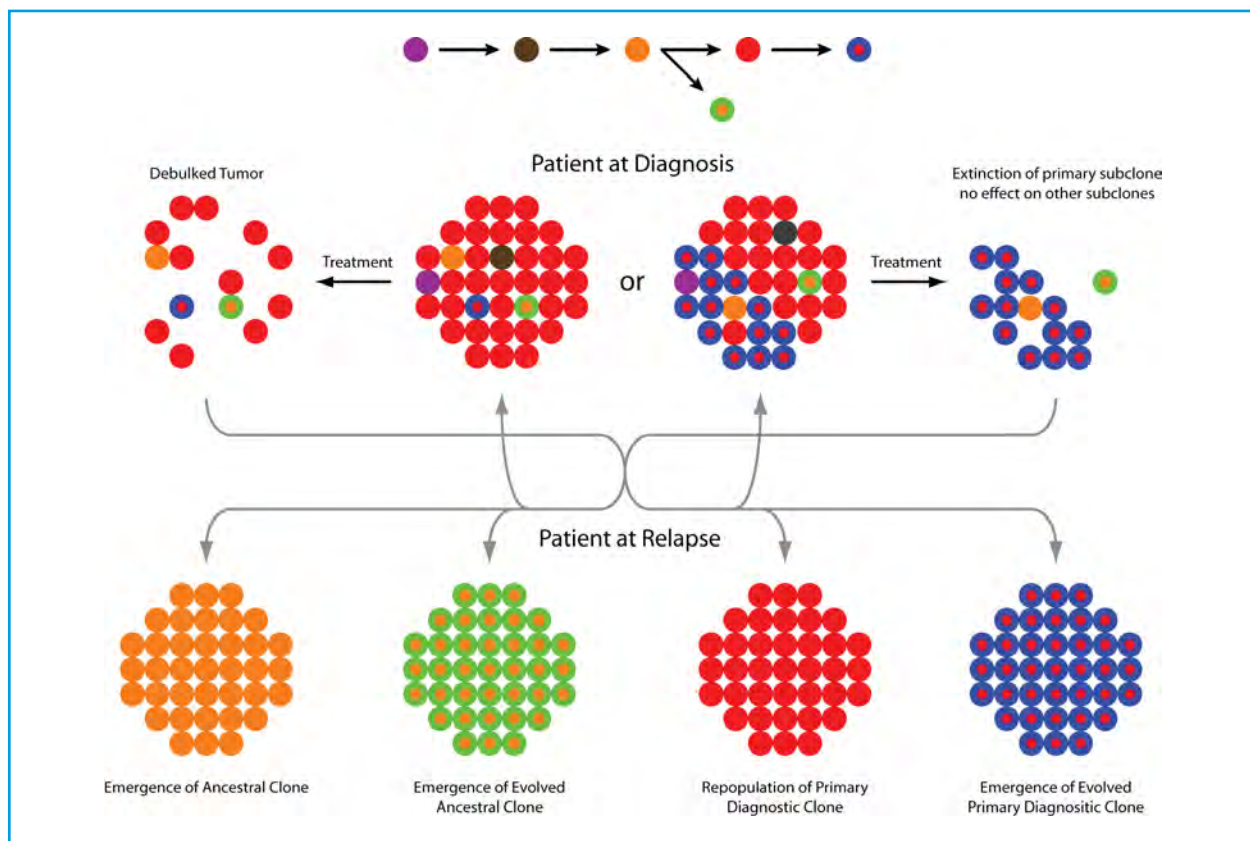
### Secondary oncogenic events drive MGUS and MM progression

#### MYC dysregulation

There is increased expression of c-MYC in most newly diagnosed MM tumors compared to MGUS tumors<sup>(6)</sup>. Recently, it was shown that sporadic activation of a MYC transgene in GC B cells in an MGUS prone mouse strain led to the universal development of MM tumors<sup>(7,8)</sup>. Hence, increased MYC expression may be responsible for progression from MGUS to MM. Complex translocations involving MYC appear to be secondary progression events that often do not involve Ig loci. They are rare or absent in MGUS, but occur in 15% of newly diagnosed tumors, 50% of advanced tumors, and 90% of HMCLs. A recent report suggests that a small molecule inhibitor of BRD4 can inhibit MYC RNA expression in MM, with therapeutic effect<sup>(9)</sup>.

#### Chromosome 13 deletion

Chromosome 13 deletion can be an early event in MGUS (e.g., in MAF, MMSET tumors) or a progression event (e.g., in t(11;14) tumors). A recent genome wide sequencing study identified mutations of DIS3, a gene of unknown function on 13q, in about 10% of MM.



**Figure 2.** Clonal evolution in MM. Substantial clonal heterogeneity is present in MM and correlates with genetic risk status. As shown on the right, treatment that induces a partial response may completely eradicate one clone, while leaving others untouched. Three types of clonal patterns are seen at relapse, each with about equal frequency: the diagnostic clone, unchanged; the diagnostic clone, with additional mutations; and a derivative of an ancestral clone, with loss and gain of mutations compared to the diagnostic clone.

### Activating mutations of RAS and BRAF

The prevalence of activating *NRAS* or *KRAS* mutations is about 15-18% each in newly diagnosed and relapsed MM tumors, but substantially higher in tumors that express *CCND1* compared to tumors that express *CCND2*. For MGUS tumors, the prevalence of *NRAS* mutations is 7%, but *KRAS* mutations have not been described. Recently, *BRAF* mutations were described in 4% of MM tumors<sup>(10)</sup>.

### Activating mutations of NFkappaB pathway

Extrinsic ligands (APRIL and BAFF) produced by BM stromal cells provide critical survival signals to long-lived PCs by stimulating TACI, BCMA, and BAFF receptors to activate the NFkB pathways. Most MGUS and MM tumors highly express NFkB target genes, suggesting a continued role of extrinsic signaling in PC tumors<sup>(11)</sup> and at least in part explaining the constant dependency of MM cells on the BM microenvironment. Activating mutations in positive regulators and inactivating mutations in negative regulators of the NFkB pathway have been identified in at least

20% of untreated MM tumors and ~50% of HMCLs, rendering the cells less dependent on ligand-mediated NFkB activation and most likely contributing to extra-medullary spread of the disease.

### Chromosome 17p loss and abnormalities of TP53

Deletions that include the *TP53* locus occur in ~10% of untreated MM tumors, and the prevalence increases with disease stage. *TP53* mutations were present in 37% of untreated MM tumors with del17p, but not in patients without del17p. Recently, decreased expression of microRNAs miR-199, -192, and -215 in MM was reported to increase MDM2, an inhibitor of *TP53*<sup>(12)</sup>, contributing to loss of p53 activity.

### Gain of chromosome 1q and loss of chromosome 1p

These genomic events frequently occur together in MM, and each of them is associated with a poor prognosis. A relevant gene on 1q is not clear although it may be *MCL1*, while two regions of 1p are associated with a poor prognosis: *CDKN2C* (p18INK4c) at 1p32.3 and *FAM46C* at 1p12.

### Other pathogenic events

Secondary Ig translocations can occur at all stages of disease. Mutations in genes regulating RNA metabolism, protein translation and histone modifying enzymes have also been identified<sup>(10)</sup>.

### High-risk MM is associated to intra-clonal tumor heterogeneity

Recent evidence indicates that tumor heterogeneity is prevalent in MM, as in many other cancers, and that different subclones are present within the tumor population, characterized by distinct genetic mutations that contributed independently to the tumor progression<sup>(13)</sup>. The degree of clonal heterogeneity is presumably related to the degree of genomic instability, and appears to correlate with the presence of high-risk genetics. Three patterns of relapse are seen following successful therapy. A third of the time the dominant clone at diagnosis predominates, unchanged, at relapse. A third of the time the diagnostic clone has acquired additional genetic changes at relapse. And a third of the time an ancestral clone to the one dominant at diagnosis emerges, lacking some of the genetic changes present in the diagnostic clone, and having acquired additional genetic changes. The serial analysis of a patient with t(4;14) MM at multiple timepoints identified two major subclones that alternated in dominance under alternating selective pressure from IMiDs and proteasome inhibitors, a phenomenon called “clonal tides”. It is intriguing that although there is clearly some competition between the two subclones, they both persisted, suggesting that there may also be an interdependence. The findings suggest a competition between subclones for limited resources and raise the possibility that early, suboptimal treatment may eradicate the “good” drug-sensitive clone, making room for the “bad” drug-resistant clone to expand. They support the use of aggressive multi-drug combination approaches for high-risk disease with unstable genomes and greater clonal heterogeneity, and sequential one or two drug approaches for low-risk disease with stable genomes and lacking clonal heterogeneity.

### Clinical implications of the molecular classification and clonal heterogeneity of multiple myeloma

The t(4;14) chromosome translocation is the genetic event in MM with the most important clinical significance. It is a poor prognostic factor for patients treated with alkylating agents, IMiDs, and bortezomib. However, there is a survival advantage to the

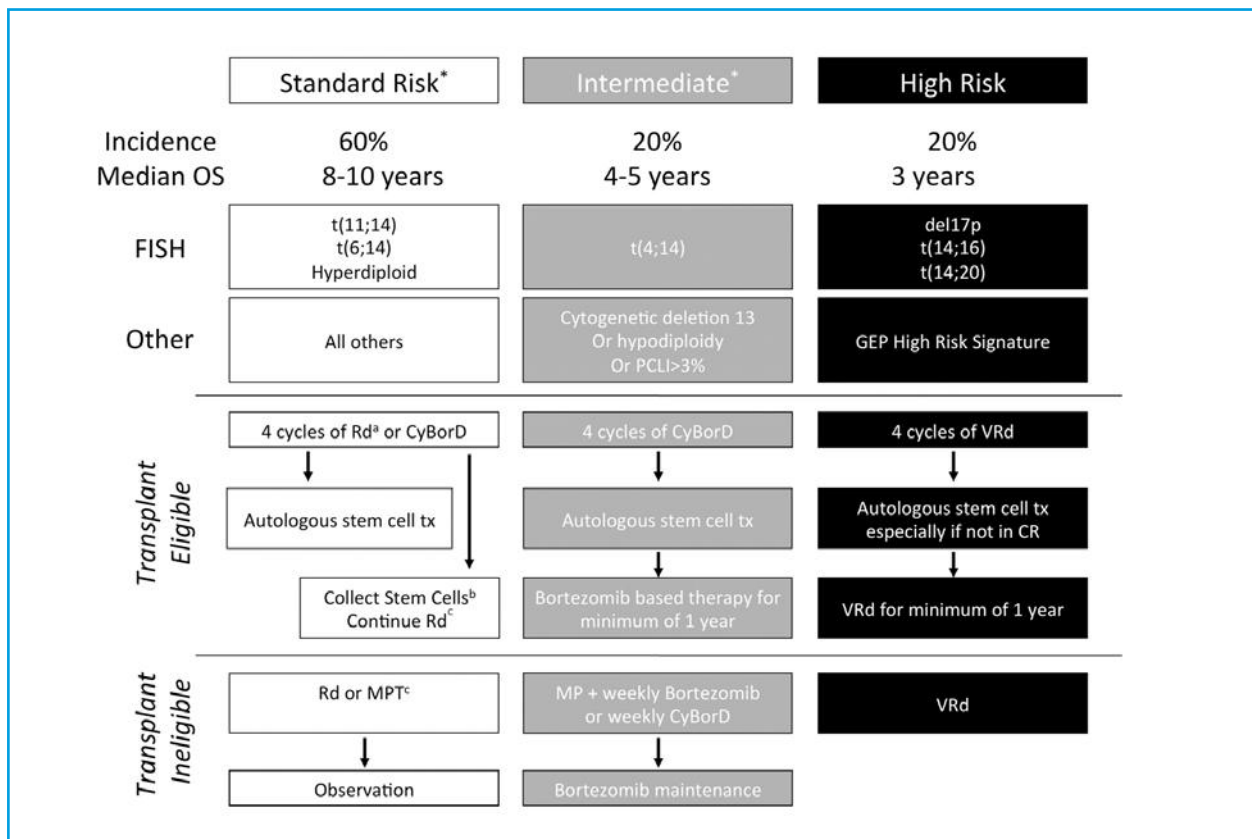
upfront use of bortezomib versus control in these patients, with a suggestion that prolonged use may totally overcome the adverse prognosis<sup>(14)</sup>. The MAF molecular subgroup, t(14;16) and t(14;20) have each individually been associated with a poor prognosis. In addition del17p is universally associated with poor prognosis. Finally patients defined as high-risk by a GEP index of proliferation or other GEP-defined risk scores do poorly. Unlike the t(4;14), for these latter subgroups neither bortezomib, or any other intervention has been shown to offer a survival advantage. Based on all of these considerations the hematologists at the Mayo Clinic have proposed a risk-adapted strategy for the treatment of patients that cannot be enrolled on clinical trials (Figure 3)<sup>(15)</sup>. The standard risk patients can be treated with lenalidomide and low dose dexamethasone, postponing the toxicity and inconvenience associated with bortezomib. In contrast the t(4;14) receive bortezomib as part of induction and maintenance for at least one year. Finally a combination of lenalidomide, bortezomib and dexamethasone with a goal of CR is recommended for the high-risk patients.

### Conclusion

Significant progress has been made in understanding the molecular pathogenesis and biology of MM. Oncogenic pathways can be activated through cell intrinsic or extrinsic mechanisms. Similar to other cancers, MM is characterized by multi-stage accumulation of genetic abnormalities deregulating different pathways. Much of this knowledge is already being utilized for diagnosis, prognosis and risk-stratification of patients. Importantly, from a clinical standpoint, this knowledge has led to development of novel therapeutic strategies, some of which are already in clinical use, and many others showing promise in pre-clinical and early clinical studies.

### References

1. Kuehl WM, Bergsagel PL. Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor. *J Clin Invest.* 2012 Oct 01;122(10):3456-63.
2. Martinez-Garcia E, Popovic R, Min D-J, Sweet SMM, Thomas PM, Zamdborg L, et al. The MMSET histone methyltransferase switches global histone methylation and alters gene expression in t(4;14) multiple myeloma cells. *Blood.* 2011 Feb 06;117(1):211-20.
3. Kuo AJ, Cheung P, Chen K, Zee BM, Kioi M, Lauring J, et al. NSD2 Links Dimethylation of Histone H3 at Lysine 36 to Oncogenic Programming. *Mol Cell.* 2011 Nov 18;44(4):609-20.
4. Pei H, Zhang L, Luo K, Qin Y, Chesi M, Fei F, et al. MMSET regulates histone H4K20 methylation and 53BP1 accumulation at DNA damage sites. *Nature.* 2011 Mar 03;470(7332):124-8.
5. Kumar S, Fonseca R, Ketterling RP, Dispenzieri A, Lacy MQ, Gertz MA, et al. Trisomies in multiple myeloma: impact on



**Figure 3.** mSMART recommendations for a risk-adapted approach to therapy. \* Clinical trials strongly recommended as the first option

\* Note that a subset of patients with these factors will be classified as high-risk by other factors. <sup>a</sup> Bortezomib containing regimens preferred in renal failure or if rapid response needed. <sup>b</sup> If age >65 or > 4 cycles of Rd Consider G-CSF plus cytozan or plerixafor.

<sup>c</sup> Continuing Rd is option for patients responding to Rd and with low toxicities; Dex is usually discontinued after first year.

survival in patients with high-risk cytogenetics. *Blood*. 2012 Mar 1;119(9):2100-5.

- Chng WJ, Huang GF, Chung T-H, Ng SB, Gonzalez-Paz N, Troska-Price T, et al. Clinical and biological implications of MYC activation: a common difference between MGUS and newly diagnosed multiple myeloma. *Leukemia*. 2011 May 05;25(6):1026-35.
- Chesi M, Robbiani DF, Sebag M, Chng WJ, Affer M, Tiedemann R, et al. AID-dependent activation of a MYC transgene induces multiple myeloma in a conditional mouse model of post-germinal center malignancies. *Cancer Cell*. 2008 Mar;13(2):167-80.
- Chesi M, Matthews GM, Garbitt VM, Palmer SE, Shortt J, Lefebure M, et al. Drug response in a genetically engineered mouse model of multiple myeloma is predictive of clinical efficacy. *Blood*. 2012 Jul 12;120(2):376-85.
- Delmore JE, Issa GC, Lemieux ME, Rahl PB, Shi J, Jacobs HM, et al. BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell*. 2011 Sep 16;146(6):904-17.
- Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ, Cibulskis K, Sougnez C, Schinzel AC, et al. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature*. 2011 Apr 15;471(7339):467-72.
- Keats JJ, Fonseca R, Chesi M, Schop R, Baker A, Chng WJ, et al. Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell*. 2007 Aug;12(2):131-44.
- Pichiorri F, Suh S-S, Rocci A, De Luca L, Taccioli C, Santhanam R, et al. Downregulation of p53-inducible microRNAs 192, 194, and 215 impairs the p53/MDM2 autoregulatory loop in multiple myeloma development. *Cancer Cell*. 2010 Oct 19;18(4):367-81.
- Keats JJ, Chesi M, Egan JB, Garbitt VM, Palmer SE, Braggio E, et al. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood*. 2012 Aug 2;120(5):1067-76.
- Bergsagel PL, Mateos MV, Gutierrez NC, Rajkumar SV, San Miguel JF. Improving overall survival and overcoming adverse prognosis in the treatment of cytogenetically high-risk multiple myeloma. *Blood*. 2013 Feb 7;121(6):884-92.
- Mikhael JR, Dingli D, Roy V, Reeder CB, Buadi FK, Hayman SR, et al. Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: Updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) Consensus Guidelines 2013. *Mayo Clin Proc*. 2013;88.

## Optimización del tratamiento en primera línea del mieloma múltiple

M.V. MATEOS, E. OCIO, R. GARCÍA-SANZ, B. PAIVA, N. GUTIÉRREZ, J.F. SAN MIGUEL  
 Servicio de Hematología. Hospital Universitario de Salamanca. IBSAL. IBMCC (USAL-CSIC). Salamanca

### Introducción

La combinación de melfalán y prednisona (MP) se introdujo en el tratamiento del mieloma a finales de los años 60. En los siguientes 30 años el progreso en el tratamiento fue muy escaso, ya que combinaciones más complejas de quimioterapia, tales como VCMP, VBAB, VAD... sólo lograron una mejoría en la respuesta global, sin diferencias en la supervivencia, tal y como lo ha demostrado un importante metaanálisis que incluyó más de 6.000 pacientes. El siguiente paso fue el uso de altas dosis de quimioterapia (melfalán) seguidas de soporte con células *stem* (trasplante autólogo de células *stem* –ASCT), en pacientes jóvenes, lo cual permitió un aumento de la supervivencia libre de progresión y de la supervivencia global. Sin embargo, en los pacientes ancianos el esquema MP siguió siendo el estándar de tratamiento. A partir del año 2000, se ha producido una revolución en el tratamiento de esta enfermedad, gracias a la aparición de nuevos fármacos con mecanismo de acción singular, tales como la talidomida y la lenalidomida (fármacos inmunomoduladores), y los inhibidores de proteasoma (bortezomib). Además, esto parece ser sólo el comienzo de una nueva era, ya que una segunda y tercera generación de fármacos inmunomoduladores e inhibidores de proteasomas, así como anticuerpos monoclonales, inhibidores de histona-deacetilasas, entre otros, están siendo investigados activamente en esta enfermedad.

### Tratamiento de pacientes de nuevo diagnóstico candidatos a trasplante

Actualmente, el tratamiento en este contexto generalmente incluye de tres a seis ciclos de inducción, intensificación con trasplante autólogo y la posibilidad de un tratamiento de consolidación y/o mantenimiento.

### Inducción

El esquema VAD ha sido durante muchos años el régimen más empleado para inducción en pacientes de nuevo diagnóstico candidatos a trasplante, proporcionando respuestas parciales (RP) en torno al 60% y menos del 10% de remisiones completas (RC). Sin embargo, los nuevos esquemas están demostrando clara superioridad frente a VAD. Triples combinaciones basadas en talidomida (T) (TAD, TCD) inducen un 80% de respuestas aunque las RC generalmente son inferiores al 15%; más aún, la combinación TD debe ser considerada como subóptima. Con respecto a la lenalidomida (Len) en combinación con dexametasona (Dex) la mayoría de los pacientes (> 85%) responden pero probablemente necesitan un mínimo de 4-6 ciclos para alcanzar más de un 10% de RC. Con esquemas basados en bortezomib, especialmente tripletas como BzAD, BzCD, o incluso mejor BzTD o BzLenDex, las respuestas son alrededor del 90%, con hasta un 30% de RC. Más aún, varios ensayos aleatorizados han demostrado que estas tripletas basadas en Bz no son sólo superiores a VAD en términos de respuesta sino que también logran supervivencias libre de progresión (SLP) más prolongadas. Las combinaciones basadas en talidomida o bortezomib no afectan la colecta de células *stem*, mientras que en el caso de lenalidomida se recomienda que la colecta se efectúe no más allá de haber administrado 3-4 ciclos de tratamiento.

### Trasplante autólogo (TASPE)

El empleo de altas dosis de quimioterapia (generalmente basadas en el de melfalán 200 mg/m<sup>2</sup>), seguido de trasplante autólogo, TASPE, es considerado actualmente como el tratamiento estándar en pacientes jóvenes con mieloma múltiple. Esto es debido al aumento en la cifra de respuestas y la supervivencia libre de progresión observada en varios ensayos aleatorizados en los que se comparó el trasplante frente

a las dosis estándar de quimioterapia, si bien algunos de estos estudios no mostraron ventaja en la supervivencia global. Dada la alta eficacia de los nuevos fármacos en inducción, la siguiente pregunta que se ha planteado es si el trasplante autólogo sigue teniendo un papel en primera línea o se pudiese reservar para la recaída. Varios ensayos aleatorizados han demostrado que la cifra de remisiones completas se incrementa con el trasplante, por lo que la inducción con nuevos fármacos seguida de trasplante autólogo serían estrategias complementarias más que alternativas terapéuticas. Sin embargo, algunos investigadores cuestionan la necesidad del trasplante realizado en esta fase inicial de la enfermedad, basándose en los excelentes resultados que se consiguen con tratamientos prolongados con nuevos fármacos, por lo que consideran que el trasplante debería reservarse para el momento de la recaída. En este sentido, se están llevando a cabo varios ensayos aleatorizados comparando trasplante precoz frente a trasplante tardío. Hasta que los resultados de estos estudios estén disponibles nosotros apoyamos la realización del trasplante precoz basados en los siguientes argumentos:

1. El trasplante tras inducción logra una alta tasa de remisiones completas, objetivo de todas las neoplasias hematológicas, y los pacientes disfrutan de un intervalo libre de tratamiento muy prolongado, con excelente calidad de vida.

2. Cuando se produce la recaída la enfermedad suele ser muy sensible a los tratamientos de rescate, mientras que todavía no conocemos la eficacia de las altas dosis de quimioterapia en pacientes que hayan sido expuestos durante largos periodos a los nuevos fármacos.

Con respecto al doble trasplante autólogo, su utilización ha disminuido de forma significativa en los últimos años. Por el contrario, están aumentando los segundos trasplantes en pacientes que recaen después de haber tenido una supervivencia libre de progresión de más de 2 o 3 años. En el contexto del doble trasplante debe reseñarse que dos estudios recientes aleatorizados basados en inducción con BzTD o BZAD han demostrado que el trasplante “en tándem” parece ser de utilidad en pacientes con citogenética de alto riesgo.

### **Consolidación y mantenimiento**

El tercer paso en esta secuencia del tratamiento de los pacientes jóvenes es la consolidación y/o el mantenimiento. El empleo de dos o tres ciclos de tratamiento de consolidación (BzTD o BzLenD) tras trasplante autólogo se ha asociado con un incremento en la profundidad de las respuestas, incluyendo respuestas moleculares. Con respecto al mantenimiento, el

interferón +/- corticoesteroides ha demostrado que prolonga en aproximadamente 6 meses la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global, pero debido a la mala tolerancia se ha abandonado en la mayoría de los países. No obstante, en los pacientes que lo toleran podría ser una buena opción ya que no dificultaría el uso posterior de otros fármacos con mecanismo de acción diferente como rescate. La disponibilidad de nuevos agentes, especialmente aquellos en formulación oral como la talidomida o lenalidomida, ha renovado el interés por el concepto de mantenimiento con la finalidad de intentar prolongar la duración de las respuestas después del trasplante. Se han llevado a cabo seis ensayos aleatorizados basados en talidomida o talidomida más dexametasona y, aunque todos ellos mostraron una ventaja en la supervivencia libre de progresión, sólo en tres de ellos ésta se producía en una prolongación en la supervivencia global. Más aún, el beneficio era modesto, aproximadamente de 6 meses, y esto junto a la toxicidad y la posible inducción de recaídas más resistentes representa un grave inconveniente.

La situación es muy diferente con la lenalidomida; dos ensayos aleatorizados han demostrado un incremento muy significativo en la supervivencia libre de progresión, 42 meses frente a 24 meses en la rama de placebo, pero sólo en uno de ellos esto se asociaba con una prolongación en la supervivencia global. La preocupación inicial con respecto al incremento en la incidencia de neoplasias secundarias, asociado al empleo de lenalidomida como mantenimiento, parece estar disminuyendo con seguimientos más prolongados; sin embargo, todavía se requiere una vigilancia estrecha. En conjunto, aunque el tratamiento de mantenimiento con lenalidomida no puede ser todavía recomendado al no estar aprobado, es sin duda una posibilidad de futuro muy atractiva, estando aún por definir la duración de la misma y la conveniencia o no de asociar corticoesteroides.

### **Trasplante alogénico**

El trasplante alogénico continúa siendo la única opción, teóricamente, curativa en los pacientes con mieloma múltiple. Sin embargo, se asocia con una elevada mortalidad relacionada con el procedimiento, de hasta el 15-30%, y morbilidad, principalmente debido a la enfermedad injerto contra huésped. Por todo ello, el empleo de trasplante alogénico debe estar restringido a centros con alta experiencia y en el contexto de ensayos clínicos. Con el fin de disminuir la mortalidad se han investigado diferentes esquemas de acondicionamiento denominados de intensidad reducida, y que se basan en el empleo de fludarabina y melfalán o fludarabina y radioterapia (2Gy). Con estos esquemas la mortalidad disminuye



al 10-20%, pero se asocia con una mayor incidencia de recaídas. Seis ensayos aleatorizados han comparado, en enfermos de nuevo diagnóstico, el uso de doble trasplante autólogo frente a trasplante autólogo seguido de trasplante alogénico de intensidad reducida; en dos de ellos la modalidad que incluye transporte alogénico demostró ser superior en términos de supervivencia libre de progresión y supervivencia global. Entre las posibles causas para explicar las discrepancias de estos resultados estarían las características diferenciales de los pacientes, la profilaxis enfermedad injerto contra huésped utilizada, así como las diferencias en los regímenes de acondicionamiento utilizados. Además, desafortunadamente, una alta proporción de estos enfermos desarrollan recaídas extramedulares sin infiltración de la médula ósea, lo cual indicaría que aunque la enfermedad permanece bajo control en el medioambiente medular sufre diseminación extramedular. Con respecto al uso del trasplante alogénico como terapia de rescate, un prerrequisito es obtener una remisión completa o una muy buena respuesta parcial antes del trasplante, ya que los pacientes con enfermedad activa no se benefician de este procedimiento. Una vez más conviene recordar que esta modalidad de trasplante debe ser realizada por equipos de alta experiencia y en el contexto de ensayos clínicos, además el papel del trasplante alogénico debe ser reanalizado en la era de los nuevos fármacos, ya que éstos pueden formar parte integral del régimen de inducción, acondicionamiento e incluso mantenimiento.

### Tratamiento de pacientes ancianos de nuevo diagnóstico no candidatos a trasplante

El esquema melfalán-prednisona (MP) ha sido el estándar de tratamiento del mieloma durante más de 40 años; sin embargo, los recientes resultados basados en combinaciones de MP bien con talidomida o bortezomib, y probablemente también con lenalidomida, indican que ahora existen nuevos estándares para el tratamiento de los pacientes con mieloma > 65-70 años o con comorbilidades que les excluyen de la posibilidad de un trasplante autólogo.

Seis ensayos aleatorizados han comparado talidomida más MP (MPT) frente a MP, mostrando un aumento significativo tanto en la tasa de respuestas globales (59% vs. 37%) como de RC en la rama de MPT (10% vs. 2,5%), así como una supervivencia libre de progresión (PFS) más larga (incremento de PFS de 5,4 meses). Sin embargo, en sólo tres de estos estudios el tratamiento con MPT se asoció con una prolongación de la supervivencia global. La toxicidad asociada con el empleo de altas dosis de talidomida, usadas en alguno de estos ensayos, quizás pueda contribuir a explicar las discrepancias en la supervivencia entre las

series. El estudio llevado a cabo por el grupo inglés MRC (IX trial) ha mostrado que la combinación de ciclofosfamida + talidomida + dexametasona (CTD) es superior a MP en términos de respuestas globales (82% vs. 49%) pero no en supervivencia global. MP también se ha comparado con talidomida + dexametasona (TD) y, aunque las respuestas fueron mayores en el brazo experimental, la supervivencia fue más corta. Esto es debido, probablemente, a que la rama TD se asoció a una alta cifra de discontinuaciones, debido a la toxicidad, y especialmente a una alta mortalidad en el primer año.

La lenalidomida también se ha combinado con MP. En un importante estudio aleatorizado se ha comparado MP frente a lenalidomida + -7P, usando la lenalidomida bien sólo como parte de la inducción o también como mantenimiento. Los resultados de este ensayo muestran una PFS significativamente más prolongada en la rama de mantenimiento (31 vs. 14 vs. 12 meses, respectivamente) pero sin diferencias significativas en la supervivencia global. Una alternativa a estas combinaciones basadas en MP es el empleo de esquemas sin agentes alquilantes; en este sentido, la combinación de lenalidomida + dexametasona, especialmente empleando dosis bajas de dexametasona, resulta atractiva, dada su excelente tolerancia y una supervivencia a los 2 años del 82% en enfermos > 65 años.

El inhibidor de proteosoma bortezomib fue investigado en combinación con MP en un estudio piloto llevado a cabo por el grupo español; los resultados claramente positivos de este ensayo han sido confirmados en un estudio aleatorizado en el que se ha comparado bortezomib + MP frente a MP. Las tasas de respuestas globales y completas fueron significativamente superiores para la triple combinación experimental (71 vs. 35%) y (30% vs. 4%), respectivamente. Además, este esquema se asoció con un incremento significativo tanto en el tiempo hasta la progresión (24 vs. 16 meses) como en la supervivencia global (56,4 vs. 43,1 meses), lo que se traduce en un incremento de 13 meses en supervivencia global. Con el fin de optimizar el tratamiento con bortezomib, especialmente para reducir la neuropatía periférica, los grupos español (Pethema/GEM) e italiano (GIMEMA) han llevado a cabo dos ensayos aleatorizados en los que bortezomib se administraba en dosis semanal en lugar de bisemanal. Los resultados de estos ensayos han mostrado una reducción muy significativa en la incidencia de neuropatía periférica de grado III/IV (la incidencia bajó del 13-15% al 2-5%) asociada a un descenso en las discontinuaciones debidas a efectos adversos. Además, esta disminución de la toxicidad permitió un tratamiento más prolongado, lo que se tradujo en un incremento en la supervivencia libre de progresión. Por tanto, estos dos estudios, junto al anteriormente mencionado de lena-

nidomida + MP, abren también la posibilidad al empleo de mantenimiento en los pacientes mayores.

Ante este panorama de nuevos esquemas terapéuticos, cabe preguntarse si existe alguna preferencia a la hora de elegir uno de los tres regímenes basados en nuevos fármacos junto a MP. Una posibilidad es individualizar el tratamiento en función de las características del enfermo y las comorbilidades. Así, si el paciente tiene antecedentes o alto riesgo de trombosis venosa, la combinación basada en bortezomib probablemente sería preferible; lo mismo ocurriría en el caso de enfermos con insuficiencia renal. Por el contrario, si el paciente tiene antecedente de neuropatía periférica, la combinación basada en lenalidomida sería la elección; además si el paciente vive a mucha distancia del centro hospitalario, la administración de fármacos inmunomoduladores orales sería preferible. En pacientes mayores de 80 años o "frágiles" nuestra política es emplear dosis reducidas de fármacos: talidomida a 100 mg, lenalidomida a 15-20 mg, bortezomib en dosis semanal. Una posibilidad alternativa en estos pacientes es sustituir el melfalán por ciclofosfamida (50 mg/día o 300 mg/semana), ya que este último fármaco es menos mielotóxico. En pacientes muy ancianos, además, se debe prestar especial atención a las infecciones (requieren tratamiento activo y probablemente profilaxis) y a la función renal (hidratación apropiada), especialmente durante los 3 primeros meses de tratamiento, ya que ambas complicaciones son responsables de una elevada incidencia de muertes precoces en esta población.

En la actualidad la supervivencia de los pacientes con mieloma múltiple ha mejorado de forma muy significativa. La clave ha sido el descubrimiento de nuevos fármacos y su investigación a través de los pertinentes ensayos clínicos. Por ello es importante continuar la investigación en esta misma línea, evitando en todo momento el empleo de esquemas que no estén basados en la evidencia científica y en su aprobación por parte de las agencias reguladoras pertinentes.

## Bibliografía

1. Combination chemotherapy versus melphalan plus prednisone as treatment for multiple myeloma: an overview of 6,633 patients from 27 randomized trials. *Myeloma Trialists' Collaborative Group. J Clin Oncol.* 1998;16(12):3832-42.
2. Child JA, Morgan GJ, Davies FE, Owen RG, Bell SE, Hawkins K, et al. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2003;348(19):1875-83.
3. Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, Sotto JJ, Fuzibet JG, Rossi JE, et al. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. *Intergroupe Français du Myelome. N Engl J Med.* 1996;335(2):91-7.
4. Stewart AK, Richardson PG, San-Miguel JF. How I treat multiple myeloma in younger patients. *Blood.* 2009;114(27):5436-43.
5. Cavo M, Tacchetti P, Patriarca F, Petrucci MT, Pantani L, Galli M, et al. Bortezomib with thalidomide plus dexamethasone compared with thalidomide plus dexamethasone as induction therapy before, and consolidation therapy after, double autologous stem-cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma: a randomised phase 3 study. *Lancet.* 2010;376(9758):2075-85.
6. Rosinol L, Oriol A, Teruel AI, Hernandez D, Lopez-Jimenez J, de la Rubia J, et al. Superiority of bortezomib, thalidomide, and dexamethasone (VTD) as induction pretransplantation therapy in multiple myeloma: a randomized phase 3 PETH-EMA/GEM study. *Blood.* 2012;120(8):1589-96.
7. Blade J, Rosinol L, Sureda A, Ribera JM, az-Mediavilla J, Garcia-Larana J, et al. High-dose therapy intensification compared with continued standard chemotherapy in multiple myeloma patients responding to the initial chemotherapy: long-term results from a prospective randomized trial from the Spanish cooperative group PETHEMA. *Blood.* 2005;106(12):3755-9.
8. Fermand JP, Katsahian S, Divine M, Leblond V, Dreyfus F, Macro M, et al. High-dose therapy and autologous blood stem-cell transplantation compared with conventional treatment in myeloma patients aged 55 to 65 years: long-term results of a randomized control trial from the Group Myelome-Autogreffe. *J Clin Oncol.* 2005;23(36):9227-33.
9. Barlogie B, Kyle RA, Anderson KC, Greipp PR, Lazarus HM, Hurd DD, et al. Standard chemotherapy compared with high-dose chemoradiotherapy for multiple myeloma: final results of phase III US Intergroup Trial S9321. *J Clin Oncol.* 2006;24(6):929-36.
10. Roussel M, Robillard N, Moreau P, Benboubker L, Hulin C, Marit G, et al. Bortezomib, Lenalidomide, and Dexamethasone (VRD) Consolidation and Lenalidomide Maintenance in Frontline Multiple Myeloma Patients: Updated Results of the IFM 2008 Phase II VRD Intensive Program. *ASH Annual Meeting Abstracts.* 2011;118(21):1872-.
11. Cavo M, Sonneveld P, Moreau P, Blade J, Goldschmidt H, Miguel JFS, et al. Impact of Bortezomib Incorporated Into Autotransplantation On Outcomes of Myeloma Patients with High-Risk Cytogenetics: An Integrated Analysis of 1894 Patients Enrolled in Four European Phase 3 Studies. *ASH Annual Meeting Abstracts.* 2012;120(21):749-.
12. Cavo M, Pantani L, Petrucci MT, Patriarca F, Zamagni E, Donnarumma D, et al. Bortezomib-thalidomide-dexamethasone is superior to thalidomide-dexamethasone as consolidation therapy after autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood.* 2012;120(1):9-19.
13. Ludwig H, Durie BG, McCarthy P, Palumbo A, San Miguel J, Barlogie B, et al. IMWG consensus on maintenance therapy in multiple myeloma. *Blood.* 2012;119(13):3003-15.
14. Attal M, Lauwers-Cances V, Marit G, Caillot D, Moreau P, Facon T, et al. Lenalidomide maintenance after stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2012;366(19):1782-91.
15. McCarthy PL, Owzar K, Hofmeister CC, Hurd DD, Harsoun H, Richardson PG, et al. Lenalidomide after stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2012;366(19):1770-81.
16. Passera R, Pollichieni S, Brunello L, Patriarca F, Bonifazi F, Montefusco V, et al. Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation from Unrelated Donors in Multiple Myeloma: Study from the Italian Bone Marrow Donor Registry. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation.* 2013.

17. Gahrton G, Iacobelli S, Bjorkstrand B, Hegenbart U, Gruber A, Greinix H, et al. Autologous/reduced-intensity allogeneic stem cell transplantation versus autologous transplantation in multiple myeloma: long-term results of the EBMT-NMAM2000 study. *Blood*. 2013.
18. Fayers PM, Palumbo A, Hulin C, Waage A, Wijermans P, Bek-sac M, et al. Thalidomide for previously untreated elderly patients with multiple myeloma: meta-analysis of 1685 individual patient data from 6 randomized clinical trials. *Blood*. 2011;118(5):1239-47. Epub 2011/06/15.
19. Morgan GJ, Davies FE, Gregory WM, Russell NH, Bell SE, Szubert AJ, et al. Cyclophosphamide, thalidomide, and dexamethasone (CTD) as initial therapy for patients with multiple myeloma unsuitable for autologous transplantation. *Blood*. 2011;118(5):1231-8.
20. Ludwig H, Hajek R, Tothova E, Drach J, Adam Z, Labar B, et al. Thalidomide-dexamethasone compared with melphalan-prednisolone in elderly patients with multiple myeloma. *Blood*. 2009;113(15):3435-42.
21. Palumbo A, Hajek R, Delforge M, Kropff M, Petrucci MT, Catalano J, et al. Continuous lenalidomide treatment for newly diagnosed multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2012;366(19):1759-69.
22. Rajkumar SV, Jacobus S, Callander NS, Fonseca R, Vesole DH, Williams ME, et al. Lenalidomide plus high-dose dexamethasone versus lenalidomide plus low-dose dexamethasone as initial therapy for newly diagnosed multiple myeloma: an open-label randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2010;11(1):29-37.
23. San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK, Dimopoulos MA, Shpilberg O, Kropff M, et al. Persistent overall survival benefit and no increased risk of second malignancies with bortezomib-melphalan-prednisone versus melphalan-prednisone in patients with previously untreated multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2013;31(4):448-55.
24. Mateos MV, Oriol A, Martinez-Lopez J, Gutierrez N, Teruel AI, de Paz R, et al. Bortezomib, melphalan, and prednisone versus bortezomib, thalidomide, and prednisone as induction therapy followed by maintenance treatment with bortezomib and thalidomide versus bortezomib and prednisone in elderly patients with untreated multiple myeloma: a randomised trial. *Lancet Oncol*. 2010;11(10):934-41.
25. Palumbo A, Bringhen S, Rossi D, Cavalli M, Larocca A, Ria R, et al. Bortezomib-melphalan-prednisone-thalidomide followed by maintenance with bortezomib-thalidomide compared with bortezomib-melphalan-prednisone for initial treatment of multiple myeloma: a randomized controlled trial. *J Clin Oncol*. 2010;28(34):5101-9.

## Optimización del tratamiento de rescate (refractariedad/recaída) en el mieloma múltiple

LAURA ROSIÑOL DACHS

Unitat d' Amiloïdosi i Mieloma (UDAM). Hospital Clínic. Barcelona

### Introducción

El mieloma múltiple (MM) es una enfermedad incurable cuya evolución natural se caracteriza por múltiples recaídas hasta que se llega a una fase final en que el paciente es refractario a todos los tratamientos y fallece por complicaciones relacionadas con la progresión de su enfermedad. Hoy en día disponemos de múltiples fármacos, por lo que debemos “racionalizar” las diferentes opciones de rescate al objeto de seleccionar la opción más adecuada para cada situación del paciente y guardar fármacos para recaídas posteriores.

Además de seleccionar la línea de tratamiento es importante escoger el momento adecuado para iniciar un tratamiento de rescate. Sin embargo, los avances en el conocimiento de la biología del mieloma abren la puerta a un tratamiento individualizado, ajustado al riesgo biológico.

A lo largo de esta ponencia hablaremos sobre cuándo y cómo tratar a un paciente en recaída en el momento actual y analizaremos las implicaciones terapéuticas que puede tener en el futuro la aplicación de los nuevos avances científicos.

### Cuándo iniciar un tratamiento de rescate

Las guías clínicas actuales recomiendan iniciar un tratamiento de rescate cuando un paciente presenta progresión clínica, definida por los criterios CRAB (Tabla 1)<sup>(1)</sup>. Sin embargo, existen situaciones en las que es recomendable iniciar tratamiento cuando el paciente únicamente está en recaída biológica, anticipándose a la aparición de síntomas. En nuestra práctica clínica habitual, esto lo aplicamos a aquellos pacientes que previamente han tenido un comportamiento clínico muy agresivo (por ejemplo, insuficiencia renal, hipercalcemia, plasmocitomas), aquellos en los que se aprecia un rápido incremento del componente monoclonal o en los que se observe una clara disminución progresiva de la cifra de hemoglo-

bina. En este mismo sentido, recientemente se han publicado unas guías de consenso para el tratamiento de las recaídas biológicas en el contexto de los ensayos clínicos<sup>(2)</sup>. La finalidad de estas guías es establecer un criterio uniforme para empezar el tratamiento en los pacientes en recaída biológica, de forma que los resultados de los ensayos clínicos sean comparables. Así, se establece como criterio de inicio de tratamiento cuando en dos determinaciones consecutivas separadas por  $\leq 2$  meses se observa una duplicación del componente monoclonal, un aumento del CM sérico en  $\geq 10$  g/L o del CM urinario en  $\geq 500$  mg/24 horas o bien un incremento de la cadena ligera libre involucrada en  $\geq 20$  mg/dL y un cociente de cadenas ligeras K/L anormal (Tabla 2)<sup>(2)</sup>.

**Tabla 1. Criterios de afectación orgánica en las gammopatías monoclonales**

- Hipercalcemia
- Insuficiencia renal
- Anemia (Hb 2 g/dL por debajo del límite inferior de la normalidad o Hb < 10 g/dL)
- Lesiones óseas (osteólisis u osteoporosis con fracturas por aplastamiento)
- Otros: hiperviscosidad sintomática, amiloidosis, infecciones bacterianas recurrentes

**Tabla 2. Criterios de tratamiento en pacientes en recaída biológica incluidos en ensayos clínicos según el IMWG**

- Cuando se cumple alguno de los siguientes criterios:
- Duplicación del componente M
  - Aumento del componente M sérico  $\geq 10$  g/L
  - Aumento del componente M urinario  $\geq 500$  mg/24 h
  - Aumento de la cadena ligera involucrada  $\geq 20$  mg/dL y ratio anormal
- En dos determinaciones separadas por  $\leq 2$  meses

## Duración del tratamiento de rescate

La duración del tratamiento de rescate puede ser indefinido hasta la progresión o puede limitarse a un número predefinido de ciclos. Ello dependerá fundamentalmente del tipo de recaída, de los fármacos empleados y de las posibles opciones de rescate para futuras recaídas. Aquellos pacientes con recaídas no agresivas, que se traten con fármacos que por su perfil de toxicidad no pueden darse de manera indefinida (por ejemplo, talidomida, bortezomib) y en los que aún dispongamos de opciones de rescate podemos tratarlos con un número de ciclos limitado. Aquellos pacientes con recaídas muy agresivas en los que vamos a utilizar un fármaco con un perfil de toxicidad aceptable a largo plazo (por ejemplo, lenalidomida), y especialmente si hemos agotado todas las opciones de tratamiento posibles, lo que consideraremos más apropiado es un tratamiento hasta la progresión.

## Consideraciones generales

Antes de iniciar un tratamiento de rescate debemos hacernos un planteamiento global del paciente y tratar de responder a una serie de consideraciones generales:

- Componentes de los tratamientos previos
- Profundidad y duración de la respuesta con los tratamientos previos. Plantearse el retratamiento cuando la respuesta se ha mantenido al menos un año tras suspender el tratamiento previo.
- Considerar un segundo trasplante autólogo en pacientes jóvenes, con buen estado general, en recaída quimiosensible y en los que la respuesta al primer procedimiento ha durado al menos 2 años.
- Tipo de recaída. En nuestra práctica clínica habitual, cuando un paciente presenta una recaída muy agresiva (por ejemplo, con plasmocitomas extramedulares, hipercalcemia) favorecemos un rescate basado en bortezomib. Por el contrario, cuando la recaída es más indolente, favorecemos un rescate basado en IMiDs. No obstante, como hemos comentado previamente, los pacientes presentan múltiples recaídas, por lo que todos acabarán recibiendo todos los fármacos a lo largo de su evolución.
- Toxicidades previas. Evitar fármacos neurotóxicos en pacientes que han presentado una neuropatía periférica previa.
- Edad y estado general. Los pacientes de edad avanzada o con mal estado general son tributarios de tratamientos no agresivos o bien de tratamiento paliativo.

## Fármacos disponibles

En los últimos 10 años se han incorporado al arsenal terapéutico los nuevos fármacos bortezomib, talido-

mida y lenalidomida. Próximamente se incorporarán los nuevos fármacos de segunda generación, como carfilzomib y pomalidomida, y se están llevando a cabo numerosos estudios con otras moléculas con diferentes mecanismos de acción, como anticuerpos monoclonales o inhibidores de histona deacetilasa, entre otros. Igualmente, se ha reintroducido la bendamustina, un fármaco clásico que había sido ampliamente utilizado en los antiguos países del Este y que había quedado en desuso.

### Talidomida

La talidomida en monoterapia en pacientes con mieloma múltiple recaído/refractario produce una tasa global de respuestas de entre el 32% y el 64%<sup>(3,4)</sup>. La talidomida no es eficaz en pacientes con plasmocitomas extramedulares<sup>(5)</sup>. Su principal efecto secundario es la neuropatía periférica, que es de predominio sensitivo y es irreversible.

### Bortezomib

El bortezomib se aprobó para el tratamiento de pacientes con mieloma múltiple refractario o en recaída en el año 2003 gracias a los resultados de los estudios SUMMIT<sup>(6)</sup> y APEX<sup>(7)</sup>. En el estudio APEX, el bortezomib fue superior a la dexametasona tanto en tasa global de respuestas (38% vs. 18%), tasa de remisiones completas (6% vs. 1%), tiempo hasta la progresión (6,2 vs. 3,5 meses) y supervivencia global (80% vs. 66% al año). Recientemente se ha publicado un estudio de retratamiento en pacientes que han respondido al tratamiento con bortezomib y que han estado libres de tratamiento un mínimo de 6 meses. La tasa global de respuestas es del 40% (58% si incluimos las respuestas mínimas), con un tiempo hasta la progresión de 8,4 meses<sup>(8)</sup>. La administración subcutánea de bortezomib ha permitido disminuir la incidencia de neuropatía periférica de grado  $\geq 2$  del 41% al 24%, y la neuropatía periférica de grado  $\geq 3$  del 16% al 6%, manteniendo la misma eficacia que cuando se administra por vía endovenosa<sup>(9)</sup>.

### Lenalidomida

En dos estudios aleatorizados<sup>(10,11)</sup> la lenalidomida fue superior a la dexametasona en tasa global de respuestas (60% vs. 20%), remisiones completas (15% vs. 3%), tiempo hasta la progresión (11 vs. 4 meses) y supervivencia global (30 vs. 20 meses). La dosis de lenalidomida debe ajustarse según la función renal y los recuentos hemoperiféricos. Siempre debe darse profilaxis antitrombótica con heparina de bajo peso molecular al menos durante los 4-6 primeros meses, pudiendo continuar después con AAS.

### Carfilzomib

El carfilzomib es el nuevo inhibidor irreversible del proteasoma<sup>(12)</sup>. Se están utilizando diferentes dosis (27-56 mg/m<sup>2</sup>) con una tasa global de respuestas de alrededor del 50%, incluyendo pacientes resistentes a bortezomib. A diferencia del bortezomib, casi no produce neuropatía periférica. Entre las principales toxicidades destaca el síndrome de lisis tumoral con la primera dosis, insuficiencia renal y toxicidad cardíaca.

### Pomalidomida

La combinación pomalidomida/dexametasona ha sido utilizada en estudios de fase II<sup>(13,14)</sup> para pacientes con mieloma recaído/refractario y está en marcha un estudio pivotal aleatorizado de fase III que compara pomalidomida/dexametasona frente a dexametasona, con resultados preliminares favorables a la combinación<sup>(15)</sup>.

### Bendamustina

La bendamustina es una molécula con similitudes estructurales entre los alquilantes y los análogos de las purinas que tiene una resistencia cruzada incompleta con otros alquilantes. La dosis en mieloma múltiple no está bien establecida y oscila entre 60 y 150 mg los días 1-2 cada 28 días. La tasa global de respuestas está entre el 55% y el 88%<sup>(16)</sup>. También se ha administrado en combinación con bortezomib o lenalidomida con resultados prometedores.

## Evolución clonal y optimización del tratamiento de rescate

Cada vez se conoce mejor la patogenia del MM. Sabemos que la gran mayoría de los mielomas evolucionan de una fase previa asintomática de gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI)<sup>(17)</sup>. En esta fase de GMSI la célula plasmática normal ha experimentado una serie de cambios genéticos que la convierten en "mielomatosa". El evento inicial responsable del paso de célula plasmática normal a célula plasmática mielomatosa radica en la disregulación de las ciclinas D<sup>(18)</sup>. Esta disregulación se produce como consecuencia de las traslocaciones primarias del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgH) con otros genes (MMSET/FGFR3, CCDN1, CCDN3, cMAF, MAFB) o bien debido a la hiperdiploidía cromosómica. Posteriormente se producen otros eventos genéticos secundarios responsables de la progresión a mieloma quiescente, mieloma sintomático y finalmente leucemia de células plasmáticas. Entre estos eventos destacan las traslocaciones secundarias de IgH (c-Myc), ganancias cromosómicas (1q), deleciones (17p, Rb1), mutaciones

de la vía de señalización de NF-Kb o de K-ras y N-ras, hipo- o hipermetilación del DNA, entre otros<sup>(19)</sup>. Hasta hace poco se creía que la progresión del MM seguía un modelo lineal según el cual sobre la clona inicial se añadían una serie de alteraciones genéticas que conferían la capacidad de proliferación, diseminación y resistencia a fármacos. Sin embargo, cada vez existe más evidencia de que la progresión en el cáncer en general, y en el mieloma en particular, sigue un modelo darwiniano. Según esta teoría, la clona inicial prolifera y experimenta una variabilidad genética que da lugar a diferentes subclonas, cada una con unas capacidades proliferativas y de resistencia a fármacos diferentes<sup>(20)</sup>. Debido a la presión que ejercen los tratamientos, una clona que al diagnóstico era mayoritaria puede desaparecer al tiempo que emerge una subclona minoritaria responsable de la recaída. Esta subclona tiene ahora la oportunidad de expandirse y adquirir nuevas anomalías.

Existen tres patrones evolutivos, cada uno presente en aproximadamente un tercio de los pacientes<sup>(21,22)</sup>:

- Evolución estable: no hay diferencias entre las clonas al diagnóstico y en la recaída. Este tipo de patrón se ha observado básicamente en los pacientes con citogenética de bajo riesgo.
- Evolución lineal: la clona de la recidiva deriva de una clona mayoritaria al diagnóstico, la cual ha adquirido lesiones adicionales.
- Evolución no lineal o patrón de heterogeneidad clonal. La clona de la recaída deriva de una subclona minoritaria al diagnóstico. Las diferentes subclonas predominan a lo largo del tiempo en función de la selección ejercida por los tratamientos.

Estos dos últimos patrones se observan básicamente en los pacientes con citogenética de alto riesgo, especialmente en los pacientes con la deleción de 17p<sup>(21)</sup>. Por otra parte, este patrón de evolución no lineal se ha visto con mayor frecuencia en pacientes tratados con bortezomib que han alcanzado una remisión completa o una MBRP que en aquellos pacientes tratados con quimioterapia convencional, hecho que sugiere que bortezomib destruye la clona dominante, dando la oportunidad a que surjan clonas minoritarias<sup>(22)</sup>.

Los nuevos conocimientos de la biología nos permitirán en un futuro individualizar el tratamiento en función del riesgo citogenético y las vías moleculares alteradas. Así, además de los tratamientos comunes dirigidos contra los eventos "iniciadores" del mieloma, podremos disponer de tratamientos individualizados dirigidos contra las dianas terapéuticas específicas de cada paciente, responsables de la progresión.

De estos conocimientos se puede especular cómo debería ser el tratamiento de los pacientes ajustado a su riesgo citogenético. Con el tratamiento de inducción se consigue una gran disminución de la masa tumoral. Los pacientes con citogenética de bajo ries-

go, con una escasa variabilidad genética, posiblemente se pueden beneficiar de una estrategia de retratamiento en la recaída, asumiendo que la clona en la recaída será la misma y tendrá la misma sensibilidad a fármacos que la clona del diagnóstico. Por otra parte, con los tratamientos postinducción (consolidación, mantenimiento) se puede modular la expansión de estas clonas de comportamiento indolente favoreciendo una supervivencia global prolongada<sup>(22,23)</sup>. Por el contrario, en los pacientes con citogenética de alto riesgo, el tratamiento de mantenimiento puede favorecer la selección de clonas más resistentes y, por lo tanto, acortar la supervivencia global tras la recaída, tal y como se ha observado en algunos estudios de mantenimiento con talidomida<sup>(22,23)</sup>.

Gracias a estos conocimientos podemos hacer una serie de reflexiones finales:

- a) Una respuesta parcial, en lugar de reflejar una supresión parcial del mieloma, tal vez refleje la supresión de una clona sensible y se mantiene una clona refractaria que se hace dominante.
- b) En general se evita el retratamiento de un paciente con un esquema al que previamente ha sido resistente porque se asume que seguirá siendo resistente. Sin embargo, tratamientos posteriores pueden haber favorecido la expansión de nuevo de la subclona sensible.
- c) El tratamiento precoz en el mieloma quiescente puede tener un efecto paradójico que favorezca la progresión a mieloma sintomático. Si la clona dominante tiene un comportamiento indolente y la erradicamos con el tratamiento, se puede favorecer teóricamente la expansión de una clona más agresiva.

No cabe duda de que el futuro del tratamiento del mieloma constituye un reto apasionante, en el que habrá que integrar los nuevos conocimientos biológicos y los nuevos fármacos dirigidos a dianas específicas para conseguir, primero, la cronicidad y, finalmente la curación de la enfermedad.

## Bibliografía

1. International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol* 2003; 121: 749-757.
2. Rajkumar SV, Harousseau JL, Durie B, Anderson K, Dimopoulos M, Kyle R, et al. Consensus recommendations for the uniform reporting of clinical trials: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 1. *Blood* 2011; 117:4691-4695.
3. Singhal S, Metha J, Desikan R, Ayers D, Roberson P, Eddlemon P, et al. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 1999; 341:1565-1571.
4. J. Bladé, J. Esteve, L. Rosiñol, Perales M, Montoto S, Tuset M, et al. Thalidomide in refractory and relapsing multiple myeloma. *Semin Oncol* 2001;28: 588-592.
5. L. Rosiñol, M.T. Cibeira, J. Bladé, Esteve J, Aymerich M, Rozman M, et al. Escape of extramedullary disease to the thalidomide effect in multiple myeloma. *Haematologica* 2004;89:832-836.
6. Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, Singhal S, Jagannath S, Irwin D, et al. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N Engl J Med* 2003;348:2609-2617.
7. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, Irwin D, Stadtmauer EA, Facon T, et al. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med* 2005; 352:2487-2498.
8. Petrucci M, Giraldo P, Corradini P, Teixeira A, Dimopoulos MA, Blau IW, et al. A prospective, international phase 2 study of bortezomib retreatment in patients with relapsed multiple myeloma. *Br J Haematol* 2013; 160; 649-659.
9. Moreau P, Pylypenko H, Grosiki S, Karamanesht I, Leleu X, Grishunina M, et al. Subcutaneous versus intravenous administration of bortezomib in patients with relapsed multiple myeloma: a randomized, phase 3, non-inferiority study. *The Lancet* 2011; 12:431-440.
10. Dimopoulos M, Spencer A, Attal M, Prince HM, Harouesseau JL, Dmoszynska A, et al. Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma. *New Engl J Med* 2007; 357:2133-2142.
11. Weber D, Chen C, Niesvizky R, Wang M, Belch A, Stadtmauer EA, et al. Lenalidomide and dexamethasone for relapsed multiple myeloma in North America. *New Engl J Med* 2007;357:2133-2142.
12. Kortue KM, Stewart AK. Carfilzomib. *Blood* 2013;121:893-897.
13. Lacy M, Kumar SK, LaPlant B, Laumann K, Gertz MA, Hayman SR, et al. Pomalidomide plus dexamethasone (Pom/dex) in relapsed myeloma: long term follow-up and factors predicting outcome in 345 patients. *Blood* 2012;120, abstract 201.
14. Jagannath S, Hofmeister CC, Siegel DS, Vij R, Lonial S, Anderson KC, et al. Pomalidomide (POM) with low-dose dexamethasone (LoDex) in patients (Pts) with relapsed and refractory multiple myeloma who have received prior therapy with lenalidomide (Len) and bortezomib (Bort): updated phase 2 results and age subgroup analysis. *Blood* 2012;120:abstract 450.
15. Dimopoulos MA, Lacy MQ, Moreau P, Weisel KC, Song KW, Delforge M, et al. Pomalidomide in combination with low-dose dexamethasone demonstrates a significant progression free survival and overall survival advantage in relapsed/refractory MM: a phase 3, multicenter, randomized, open-label study. *Blood* 2012; 120: LBA-6. dimopoulos)
16. Cheson BD. Bendamustine: rebirth of an old drug. *J Clin Oncol* 2009;27:1492-1501.
17. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, Katzmman JA, Caporaso NE, Hayes RB, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood* 2009; 113: 5412-5417.
18. Bergsagel PL, Kuehl WM. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005; 23: 6333-6338.
19. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer* 2012; 12:335-348.
20. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature* 2012; 481:306-313.
21. Keats JJ, Chesi M, Egan JB, Garbitt VM, Palmer SE, Braggio E, et al. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood* 2012; 120: 1067-1076.
22. Magrangeas F, Avet-Loiseau H, Gouraud W, Lodé L, Decaux O, Godmer P, et al. Minor clone provides a reservoir for relapse in multiple myeloma. *Leukemia* 2013; 27: 473-481.
23. Morgan GJ, Gregory WM, Davies FE, Bell SE, Szubert J, Brown JM, et al. The role of maintenance thalidomide therapy in multiple myeloma: MRC Myeloma IX results and meta-analysis. *Blood* 2012;119:7-15.

## Estrategias de tratamiento en los estadios localizados de los linfomas

COORDINADORES: MIGUEL Á. CANALES ALBENDEA. *Servicio de Hematología. Hospital Universitario La Paz. Madrid*  
DOLORES CABALLERO BARRIGÓN. *Servicio de Hematología. Hospital Clínico Universitario de Salamanca*

Los linfomas son una de las neoplasias más ampliamente estudiadas en relación con su pronóstico. En este sentido, el estadio de la enfermedad continúa siendo uno de los principales factores pronóstico, sobre todo en el linfoma de Hodgkin (LH). De hecho, conocer la extensión del linfoma, para separar enfermedad localizada de enfermedad avanzada, era esencial cuando el único elemento terapéutico eficaz era la radioterapia.

Es evidente que el pronóstico del LH ha mejorado en las últimas décadas, como consecuencia de los avances que se han producido en la quimioterapia y radioterapia. En estos pacientes es fundamental tener en cuenta la toxicidad a largo plazo, principalmente en relación con las complicaciones cardiovasculares, la infertilidad y las segundas neoplasias. Ello es particularmente importante en los pacientes con estadios localizados, donde la proporción de curación es muy alta. Por ello se están llevando a cabo múltiples intentos para reducir la intensidad de tratamiento manteniendo la eficacia. En este sentido, el grupo alemán de linfoma de Hodgkin (GHSG) nos ofrece su amplia experiencia en el manejo de pacientes con LH con el desarrollo de esquemas específicos de tratamiento para pacientes con enfermedad localizada, como los ensayos HD10, el HD13 o el HD14, de los cuales presentarán resultados actualizados.

En el linfoma difuso de células B grandes, su presentación de forma localizada ofrece mayores posibilidades de curación, si bien el concepto de enfermedad localizada es heterogéneo, lo que dificulta enormemente la comparación de los resultados entre los diferentes estudios. De este modo, la estrategia terapéutica diseñada para un determinado subgrupo puede no ser adecuada para otros pacientes incluidos dentro de los estadios precoces de la enfermedad y será necesario el empleo de terapias diferentes para optimizar los resultados. Los resultados de diferentes estudios nos indican que la combinación de quimioterapia y radioterapia es la terapia de elección; sin embargo, el debate sobre la necesidad de considerar la radioterapia como consolidación en los estadios localizados de los linfomas agresivos o el número de ciclos a administrar, sobre todo tras la introducción de rituximab, continúa abierto. El Dr. Gisselbrecht nos ofrece una amplia discusión sobre cada uno de estos aspectos.

Por último, pero no menos discutido, tenemos el tratamiento del linfoma folicular (LF) y del linfoma de células del manto (LCM), entidades bien caracterizadas tanto clínica como biológicamente. El tratamiento actual de estas enfermedades se basa en la inmunquimioterapia, pero en los últimos años se han descrito formas clínicas muy particulares, aparentemente de pronóstico mucho mejor que el habitual, que obligan a plantearse si el tratamiento convencional es el más adecuado en estos casos. Así, se han descrito formas *in situ* de LF. El 10-15% de los LCM corresponden a una forma denominada "indolente", también llamada extraganglionar, que se distingue por un curso clínico "más" benigno que permitiría diferir el tratamiento durante mucho tiempo. Por último, el LF localizado, también raro y de excelente pronóstico, constituye asimismo un dilema terapéutico. El Dr. López-Guillermo nos ofrece una revisión sobre los principales aspectos clínicos y terapéuticos de estos subtipos histológicos.

En cada una de las patologías abordadas en este simposio se insiste sobre la necesidad de individualizar el tratamiento, en un intento de reducir la toxicidad manteniendo la eficacia. El mejor conocimiento de la biología de la enfermedad, así como la introducción de nuevas técnicas diagnósticas con implicación pronóstica, como la PET, está contribuyendo a la mejor caracterización de estos pacientes y, en consecuencia, a optimizar el tratamiento.



## Introducción a los estadios precoces de los linfomas

MIGUEL ÁNGEL CANALES ALBENDEA

*Jefe de Sección de Hematología. Profesor Asociado de Medicina. Hospital Universitario La Paz. Universidad Autónoma de Madrid*

Los linfomas son un grupo heterogéneo de neoplasias que tienen en común su origen en la proliferación de células linfoides detenidas en diferentes etapas de su desarrollo madurativo. El diagnóstico correcto de cada una de estas entidades es sólo una de las muchas piezas de información necesarias para planear el cuidado del paciente. De este modo, se incluyen dentro de los linfomas enfermedades muy distintas no sólo desde el punto de vista histopatológico, sino también clínico y evolutivo, de forma que el tratamiento deberá adaptarse al riesgo de cada enfermo en particular. Y para valorar dicho riesgo resulta imprescindible conocer el pronóstico de cada paciente en función de una serie de variables, tanto en el momento del diagnóstico como a lo largo de su evolución. Así, el pronóstico de cada paciente está relacionado con la biología del tipo específico de linfoma y con una serie de características clínicas cuya combinación facilitará una estimación segura del riesgo y hará posible el desarrollo de una estrategia terapéutica individualizada.

En este sentido, los linfomas son unas de la neoplasias más ampliamente estudiadas en relación con su pronóstico. Dentro de ellos el estadio de la enfermedad continúa siendo uno de los principales factores pronóstico, sobre todo en el linfoma de Hodgkin (LH). De hecho, conocer la extensión del linfoma, para separar enfermedad localizada y enfermedad avanzada, era esencial cuando el único elemento terapéutico eficaz era la radioterapia. Los estudios iniciales de René Gilbert en Ginebra, Vera Peters en Toronto y Henry Kaplan en Stanford permitieron analizar el patrón de diseminación del LH y demostrar que diferentes grados de extensión representaban mayor masa tumoral y requerían tratamientos diferentes<sup>(1)</sup>. Así se llega al primer sistema de clasificación por estadios, consensuado en la conferencia de Ann-Arbor en 1971<sup>(2)</sup>, que, aunque imperfecto, sobre todo en los linfomas no hodgkinianos (LNH), refleja la cantidad de masa tumoral y condiciona el pronóstico y la intensidad de tratamiento.

Así, la clasificación de Ann-Arbor, con la posterior modificación de Costwolds, ha dividido tradicionalmente a los linfomas en dos grupos de riesgo de acuerdo a su extensión. Está claro que una misma entidad en estadio I presenta un pronóstico mucho mejor que en estadio IV, pero las diferencias se reducen cuando comparamos estadios próximos (I y II, II y III, III y IV), de modo que el valor pronóstico relativo de la clasificación de Ann-Arbor aumenta considerablemente cuando dividimos a los pacientes en dos grupos. Bajo el epígrafe de enfermedad localizada se han incluido tradicionalmente los estadios I y II, mientras que bajo la denominación de enfermedad avanzada se incluyen los estadios III y IV. Ésta es una división simplista, pero con implicaciones pronósticas y tradicionalmente práctica desde el punto de vista terapéutico, al diferenciar 2 estrategias terapéuticas: la radioterapia en los estadios localizados y la quimioterapia en los estadios avanzados.

La clasificación del LH en estadios era un reflejo, fundamentalmente, de la capacidad de la radioterapia para curar a los pacientes que presentaban una determinada extensión de la enfermedad. El tratamiento con radioterapia exclusiva ofrecía la posibilidad de curación a los pacientes que presentaban enfermedad limitada a un mismo lado del diafragma y a una proporción significativa de los pacientes con enfermedad avanzada. El desarrollo de diferentes esquemas de poliquimioterapia ha sido esencial para el tratamiento de la enfermedad avanzada y ha permitido establecer en qué grupos existe un beneficio de la asociación de radioterapia a la quimioterapia. Además, en los pacientes con enfermedad ganglionar localizada, los diferentes grupos de trabajo han sido capaces de identificar subgrupos de pacientes que requieren tratamiento más intensivo (estadios intermedios) y un subgrupo curable con tratamientos mínimamente intensivos (Tabla 1). Un resumen de los diferentes estudios de terapia combinada en LH se presenta en la Tabla 2.

En los LNH agresivos la heterogeneidad en el grupo de pacientes con enfermedad localizada dificulta enormemente la comparación de los resultados entre los diferentes estudios y, de hecho, la estrategia terapéutica diseñada para un determinado subgrupo puede no ser adecuada para otros pacientes incluidos

dentro de los estadios precoces de la enfermedad. Los estadios I-II de los LNH agresivos pueden dividirse en 3 subgrupos de acuerdo a su supervivencia (Tabla 3) y en cada uno de ellos será necesario el empleo de terapias diferentes para optimizar los resultados<sup>(3)</sup>.

De este modo, aplicando el IPI modificado por estadio, que incluye como factores de riesgo el estadio II, la edad > 60 años, la LDH elevada y la situación funcional (*performance status*) de > 1, es posible identificar estos subgrupos de pacientes. El grupo más favorable, aquellos pacientes sin factores de riesgo (30% de los pacientes en estadios precoces) tienen una supervivencia a los 5 años superior al 90% con esquemas cortos de quimioterapia (3 ciclos) y radioterapia<sup>(4)</sup>. El subgrupo con estadio II y masa voluminosa (*bulky*), a menudo también incluido dentro de la enfermedad localizada, tiene una supervivencia a los 5 años del 50% cuando recibe 3 ciclos CHOP + radioterapia y, por tanto, debe tratarse con esquemas diseñados para los estadios avanzados<sup>(5)</sup>. En este sentido, el estudio MInT demuestra que la presencia de masa voluminosa es un factor pronóstico adverso e identifica un subgrupo de pacientes con enfermedad localizada de pronóstico favorable (IPI = 0, no *bulky*) con una supervivencia a los 6 años del 95%<sup>(6,7)</sup>. No obstante, la adición de radioterapia en los pacientes con masa *bulky* mejora los resultados, si los comparamos con los obtenidos por el grupo francés<sup>(6-8)</sup>. Por último, aquellos pacientes con enfermedad localizada y algún factor de riesgo tienen una supervivencia a los 5 años del 70%. Es en este subgrupo de pacientes con enfermedad localizada donde es necesario identificar el esquema de tratamiento óptimo.

**Tabla 1.** Factores de riesgo y grupos pronósticos (GHSG y EORTC)

	GHSG	EORTC
<b>Factores de riesgo (FR)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Masa mediastínica (ICT &gt; 0,35)</li> <li>Enfermedad extranodal</li> <li>VSG &gt; 30 con síntomas B VSG &gt; 50 sin síntomas B</li> <li>≥ 3 áreas afectas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Masa mediastínica (ICT &gt; 0,35)</li> <li>Edad &gt; 50 años</li> <li>VSG &gt; 30 con síntomas B VSG &gt; 50 sin síntomas B</li> <li>≥ 4 áreas afectas</li> </ul>
<b>Grupo pronóstico</b>		
Enfermedad precoz favorable	I-II sin FR	I-II sin FR
Enfermedad precoz desfavorable (estadio intermedio)	I-IIA con uno o más FR IIB con c/d, sin a/b	I-II con uno o más FR
Avanzado	IIB con a/b III-IV	III-IV

GHSG: German Hodgkin Lymphoma Study Group; EORTC: European Organisation for Research and Treatment of Cancer

**Tabla 2.** Ensayos clínicos de terapia combinada en estadios precoces del linfoma de Hodgkin

Ensayo	n	Tratamientos	Resultados
EORTC H8-F <sup>(13)</sup>	542	RTCE 36-40 Gy 3 MOPP/ABV + RTAA	SLE 68% 10 a SLE 93% 10 a (< 0,001) SG 92% 10 a SG 97% 10 a (0,001)
EORTC H8-U <sup>(13)</sup>	996	4 MOPP/ABV + RTCE 4 MOPP/ABV + RTAA 6 MOPP/ABV + RTAA	SLE 80% 10 a SLE 80% 10 a SLE 82% 10 a (ns) SG 84% 10 a SG 85% 10 a SG 88% 10 a (ns)
INT Milán <sup>(14)</sup>	136	4 ABVD + RTCE 30,6 Gy 4 ABVD + RTAA 36-40 Gy	PLP 93% 12 a PLP 94% 12 a (ns) SG 96% 12 a SG 94% 12 a (ns)
GHSG HD10 <sup>(15)</sup>	1.190	4 ABVD + 30 Gy RTAA 4 ABVD + 20 Gy RTAA 2 ABVD + 30 Gy RTAA 2 ABVD + 20 Gy RTAA	PLFT 87% 8 a PLFT 90% 8 a PLFT 86% 8 a PLFT 86% 8 a (ns) SG 94% 8 a SG 95% 8 a SG 94% 8 a SG 95% 8 a (ns)
GHSG HD11 <sup>(16)</sup>	1.395	4 ABVD + 30 Gy RTAA 4 ABVD + 20 Gy RTAA 4 BEACOPP + 30 Gy RTAA 4 BEACOPP + 20 Gy RTAA	PLFT 85% 5 a PLFT 81% 5 a PLFT 87% 5 a PLFT 87% 5 a (ns) SG 94% 5 a SG 94% 5 a SG 95% 5 a SG 95% 5 a (ns)

EORTC: European Organisation for Research and Treatment of Cancer; GHSG: German Hodgkin Lymphoma Study Group; INT Milano: Istituto Nazionale dei Tumori; RTCE: radioterapia de campo extenso; RTAA: radioterapia de áreas ganglionares afectadas; PLP: probabilidad actuarial de encontrarse libre de progresión; SLE: supervivencia libre de evento; PLFT: probabilidad actuarial de encontrarse libre de fracaso del tratamiento; SG: supervivencia global

**Tabla 3. Resultados en pacientes con LNH y enfermedad localizada, según factores de riesgo. Modificado de Miller et al.<sup>(3)</sup>**

Estadio clínico	IPI modificado	Tratamiento	Supervivencia 5 a
I, IE	0	CHOP (3) + RT	> 90%
I, IE, II, IIE (no bulky)	≥ 1	CHOP (3) + RT	70%
II o IIE bulky	-	CHOP (8)	50%

En cualquier caso, el debate sobre la necesidad de considerar la radioterapia como consolidación en los estadios localizados de los linfomas agresivos continúa. Un estudio retrospectivo reciente del MD Anderson Cancer Center en Houston refleja esta realidad: el 54% de 190 pacientes con estadio I y II reciben radioterapia tras 6-8 ciclos de R-CHOP<sup>(9)</sup>. Los datos de este estudio igualmente confirman que los pacientes con un IPI modificado  $\geq 1$  se benefician de aumentar el número de ciclos de quimioterapia<sup>(9)</sup>.

Por último, pero no menos discutido, el tratamiento de los estadios precoces del linfoma folicular, aunque se considera una situación excepcional, un análisis reciente del registro SEER (Surveillance Epidemiology and End Results) del Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos demuestra que el 26% de los pacientes con linfoma folicular se diagnostican en estadio I. En esta situación el tratamiento recomendado es la radioterapia, pero de acuerdo a los datos del citado registro sólo el 34% de los pacientes recibieron radioterapia<sup>(10)</sup>. El análisis de los pacientes incluidos en el National LymphoCare Study confirma estos datos, de modo que las opciones en estos pacientes oscilan desde la observación hasta diferentes combinaciones de quimioterapia con rituximab, con resultados similares, lo que contribuye a la controversia sobre el mejor tratamiento en estos pacientes<sup>(11,12)</sup>.

## Bibliografía

- Meyer RM, Hoppe RT. Point/counterpoint: early-stage Hodgkin lymphoma and the role of radiation therapy. *Blood*. 2012 Nov 29;120(23):4488–95.
- Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Research*. 1971 Nov;31(11):1860–1.
- Miller TP. The Limits of Limited Stage Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2004 Aug 1;22(15):2982–4.
- Shenkier TN, Voss N, Fairey R, Gascoyne RD, Hoskins P, Klasa R, et al. Brief chemotherapy and involved-region irradiation for limited-stage diffuse large-cell lymphoma: an 18-year experience from the British Columbia Cancer Agency. *J Clin Oncol*. 2002 Jan 1;20(1):197–204.
- Reyes F, Lepage E, Ganem G, Molina TJ, Brice P, Coiffier B, et al. ACVBP versus CHOP plus radiotherapy for localized aggressive lymphoma. *N Engl J Med*. 2005 Mar 24;352(12):1197–205.
- Pfreundschuh M, Trumper L, Osterborg A, Pettengell R, Trnemy M, Imrie K, et al. CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncology*. 2006 May;7(5):379–91.
- Pfreundschuh M, Kuhnt E, Trumper L, Osterborg A, Trnemy M, Shepherd L, et al. CHOP-like chemotherapy with or without rituximab in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: 6-year results of an open-label randomised study of the MabThera International Trial (MInT) Group. *The Lancet Oncology*. 2011 Oct;12(11):1013–22.
- Récher C, Coiffier B, Haioun C, Molina TJ, Fermé C, Casanovas O, et al. Intensified chemotherapy with ACVBP plus rituximab versus standard CHOP plus rituximab for the treatment of diffuse large B-cell lymphoma (LNH03-2B): an open-label randomised phase 3 trial. *Lancet*. 2011 Nov 26;378(9806):1858–67.
- Phan J, Mazloom A, Jeffrey Medeiros L, Zreik TG, Wogan C, Shihadeh F, et al. Benefit of consolidative radiation therapy in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2010 Sep 20;28(27):4170–6.
- Pugh TJ, Ballonoff A, Newman F, Rabinovitch R. Improved survival in patients with early stage low-grade follicular lymphoma treated with radiation: a Surveillance, Epidemiology, and End Results database analysis. *Cancer*. 2010 Aug 15;116(16):3843–51.
- Friedberg JW, Taylor MD, Cerhan JR, Flowers CR, Dillon H, Farber CM, et al. Follicular lymphoma in the United States: first report of the national LymphoCare study. *Journal of Clinical Oncology*. 2009 Mar 10;27(8):1202–8.
- Friedberg JW, Byrtek M, Link BK, Flowers C, Taylor M, Hainsworth J, et al. Effectiveness of First-Line Management Strategies for Stage I Follicular Lymphoma: Analysis of the National LymphoCare Study. *Journal of Clinical Oncology*. 2012 Sep 17;30(27):3368–75.
- Fermé C, Eghbali H, Meerwaldt JH, Rieux C, Bosq J, Berger F, et al. Chemotherapy plus involved-field radiation in early-stage Hodgkin's disease. *N Engl J Med*. 2007 Nov 8;357(19):1916–27.
- Bonadonna G, Bonfante V, Viviani S, Di Russo A, Villani F, Valagussa P. ABVD plus subtotal nodal versus involved-field radiotherapy in early-stage Hodgkin's disease: long-term results. *J Clin Oncol*. 2004 Jul 15;22(14):2835–41.
- Engert A, Plütschow A, Eich HT, Lohri A, Dörken B, Borchmann P, et al. Reduced treatment intensity in patients with early-stage Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 2010 Aug 12;363(7):640–52.
- Eich HT, Diehl V, Gørgen H, Pabst T, Markova J, Debus J, et al. Intensified chemotherapy and dose-reduced involved-field radiotherapy in patients with early unfavorable Hodgkin's lymphoma: final analysis of the German Hodgkin Study Group HD11 trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2010 Sep 20;28(27):4199–206.

## Current strategies for the treatment of localized-stage Hodgkin lymphoma

ANDREAS ENGERT, MD, CHAIRMAN GHSG

*Department of Internal Medicine I. University Hospital of Cologne. Cologne, Germany*

*German Hodgkin Study Group (GHSG). University Hospital of Cologne. Cologne, Germany*

Due to recent improvement in both, radiotherapy and chemotherapy, the prognosis for patients with Hodgkin lymphoma has substantially improved over the last decades. On the other hand, Hodgkin lymphoma patients are at risk for developing late side effects of treatment including secondary malignancies, organ failure and other sequelae such as infertility and fatigue. Thus, particularly in early-stage disease, many groups worldwide have attempted to reduce treatment intensity thereby maintaining efficacy. Examples include the GHSG HD10 study for patients with early favorable disease demonstrating that two cycles of ABVD followed by 20 Gy of involved field radiotherapy (IFRT) are as effective as four cycles of ABVD followed by 30 Gy IFRT. The GHSG follow-up study, HD13, then attempted to delete drugs from the ABVD backbone. More recent trials such as the UK RAPID study or the EORTC HD10 trial investigated the use of PET for a better risk adapted strategy. Although the interim results of these two trials are still preliminary, the outcome of these two studies as reported at ASH 2012 is rather similar albeit the conclusions differed substantially.

For early unfavorable patients with Hodgkin lymphoma, numerous clinical trials attempted to improve the prognosis for these patients by introducing more aggressive chemotherapy such as Stanford V, BEACOPP baseline or BEACOPP escalated. The GHSG HD11 trial showed that BEACOPP baseline did not improve the overall prognosis of these patients so that four cycles of ABVD followed by 30 Gy IFRT should still be regarded standard of care for this group of patients. The GHSG HD14 trial then introduced two cycles of BEACOPP escalated followed by two cycles of ABVD in this setting. With a total of more than 1500 patients included, this regimen (“2+2”) gave a better tumor control when compared with four cycles of ABVD with a difference of 7.2% at five years. However, there was no difference in overall survival between these two regimens. An update of this trial will also be presented.

Future strategies might challenge the role of additional radiotherapy for early-stage Hodgkin lymphoma patients. To this end, the advent of a new highly effective antibody-drug conjugate, brentuximab vedotin, targeting CD30 might allow further reduction in treatment intensity while enhancing tumor-specific effects.

## Tratamiento del linfoma folicular *in situ*, del linfoma del manto indolente y de los estadios localizados del linfoma folicular

ARMANDO LÓPEZ-GUILLERMO, JORDINA ROVIRA  
Servicio de Hematología. Hospital Clínic. Barcelona

### Introducción

Tanto el linfoma folicular (LF) como el linfoma de células del manto (LCM) son entidades bien caracterizadas clínicamente y biológicamente<sup>(1)</sup>. El tratamiento actual de estas enfermedades se basa en la inmunoterapia, si bien depende en parte de las características específicas de los pacientes<sup>(2,3)</sup>. En los últimos años se han descrito formas clínicas muy particulares, aparentemente de pronóstico mucho mejor del habitual, que obligan a plantearse si el tratamiento convencional es el más adecuado en estos casos. Así, se han descrito formas *in situ* de LF y de LCM<sup>(4-10)</sup>, muchas veces hallazgos intercurrentes, que plantean el problema práctico de qué hacer con tales pacientes. Del mismo modo, entre un 10% y un 15% de los LCM corresponderían a una forma denominada “indolente”, también llamada extraganglionar, que se distinguiría por un curso clínico muy benigno que permitiría diferir el tratamiento durante mucho tiempo<sup>(11-14)</sup>. Por último, el LF localizado (estadio I-“A”), también raro y de excelente pronóstico, constituye asimismo un dilema terapéutico<sup>(15)</sup>. La presente revisión pretende resumir los principales datos clínicos y evolutivos de estas formas clínicas poco frecuentes para concluir con unos consejos terapéuticos sobre las mismas.

### Linfoma folicular *in situ*

El concepto de tumor *in situ*, bien establecido en el contexto de los tumores sólidos, significa que las células neoplásicas se localizan únicamente en los lugares habitualmente ocupados por la contrapartida normal de las células tumorales. Esta situación representaría el primer paso en el desarrollo del tumor, y la simple escisión quirúrgica sería suficiente para curar estos tumores. Recientemente, el concepto de neoplasia *in situ* se ha trasladado al ámbito de los linfomas y, de hecho, ya se refleja en la clasificación de la OMS<sup>(1,16)</sup>. De todos modos, el concepto debe adaptarse a un sistema en el que las células normales circulan “naturalmen-

te” por sangre y linfa, además de ser capaces de colonizar diferentes tejidos. Se han descrito formas *in situ* del LF, LCM y más recientemente del linfoma de Hodgkin y otros tipos. Aunque reconocidos como entidades provisionales, la situación de los linfomas *in situ* no está completamente clarificada y, de hecho, han surgido múltiples dudas que no son fáciles de contestar con la escasa información disponible.

Hay que señalar que no es lo mismo linfoma *in situ* que linfoma localizado: así, este último está situado habitualmente fuera del territorio propio de las células normales. Por otro lado, cuando la contrapartida celular normal circula por la sangre o la médula, la presencia de células tumorales en estos territorios puede corresponder a un linfoma *in situ*, pero ciertamente diseminado<sup>(6)</sup>. Otra realidad a destacar es que entre el 10% y el 50% de los linfomas *in situ* coexisten con un linfoma en otras localizaciones del mismo o distinto tipo histológico<sup>(10)</sup>.

Una cuestión importante es si considerar a los linfomas *in situ* como una verdadera neoplasia o si se trata de expansiones linfoides clonales de significado no aclarado. De hecho, es bien conocida la presencia de poblaciones B con la traslocación t(14;18) en personas aparentemente sanas. Probablemente se necesitan otros eventos biológicos para que se produzca la transformación a un verdadero linfoma. La situación sería parecida a la de la linfocitosis B monoclonal respecto a la leucemia linfática crónica, o la de la gammapatía monoclonal de significado incierto respecto al mieloma múltiple. Por este motivo, se ha sugerido el término *follicular lymphoma-like B cell of unknown significance* para estos casos<sup>(16)</sup>.

El diagnóstico del linfoma *in situ* debe hacerse obviamente sobre una biopsia tisular. Con frecuencia el diagnóstico es casual en el contexto de una biopsia realizada para el estudio de una adenopatía o de otra neoplasia. Además de la morfología, es importante contar con un panel básico de anticuerpos, entre ellos BCL2, CD10 (para LF) y ciclina D1 (para LCM). Los criterios fundamentales para el diagnóstico de un linfoma *in situ* se detallan en la [Tabla 1](#)<sup>(16)</sup>.

**Tabla 1.** Características diferenciales entre el linfoma folicular (LF) *in situ* y la afección parcial de un ganglio linfático por un LF (modificado de Campo *et al.*, Blood 2011)<sup>(16)</sup>

LF <i>in situ</i>	Afección parcial por LF
<ul style="list-style-type: none"> <li>Arquitectura general conservada</li> <li>Centroцитos muy positivos para BCL2 y CD10 dentro del centro germinal</li> <li>La tinción de BCL2 en los centroцитos es más intensa que en el linfoma del manto o en células T reactivas</li> <li>Los folículos afectados se hallan dispersos, no confluentes</li> <li>El tamaño de los centros germinales es normal y habitualmente no se hallan reemplazados por células BCL2+</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Arquitectura parcialmente borrada</li> <li>Los folículos afectados habitualmente se hallan delimitados a una zona del ganglio linfático</li> <li>Las células tumorales pueden hallarse presentes en las áreas interfoliculares</li> <li>Los centros germinales se hallan expandidos y completamente reemplazados por las células tumorales</li> </ul>

La prevalencia del LF *in situ* se ha cifrado en un 2-3% de las biopsias consideradas inicialmente como reactivas cuando se utilizan BCL2, CD10 o FISH para la t(14;18)<sup>(7)</sup>. En una serie de 100 biopsias ganglionares consecutivas en las que se estudiaron sistemáticamente estos marcadores, se diagnosticaron dos casos de LF *in situ* y ninguno de LCM<sup>(9)</sup>.

Los datos sobre la presentación clínica del LF *in situ* son escasos y con frecuencia se trata de series cortas o de casos clínicos. En la [Tabla 2](#) se detallan las características clínicas y evolutivas de las principales series de LF *in situ* publicados en la bibliografía<sup>(4-6)</sup>. Como se observa, el manejo de los pacientes es muy heterogéneo. El pronóstico en cuanto a la supervivencia es muy favorable: sólo se describe un paciente fallecido por causas no relacionadas con el linfoma. No existen guías claras de tratamiento de LF *in situ*<sup>(17)</sup>. En todo caso, hay una-

**Tabla 2.** Características clínico-biológicas de 45 pacientes diagnosticados de linfoma folicular (LF) *in situ* de dos series publicadas en la bibliografía<sup>(4-6)</sup>

Características	Todos (N = 45)	Estadio I (N = 36)	Estadios II-IV (N = 9)
Varón/Mujer	19 / 26	16 / 20	3 / 6
Edad mediana (extremos)	52 años (23-76)	69 años (42-82)	65 años (29-84)
Diagnóstico incidental	13 / 13	10 / 10	3 / 3
Localización:			
• Ganglio linfático	43	33	10
• Bazo	2	2	0
• Otras	2	1	1
Reordenamiento BCL2/JH (PCR)	13 / 26	11 / 22	2 / 4
BCL2 <i>break</i> (FISH)	23 / 28	21 / 23	2 / 5
Linfoma compuesto	11	9*	1**
Otras neoplasias	4	4***	0
Tratamiento:			
• No (salvo biopsia)	31	28	3
• Sí	14	8****	6
Progresión del LF	8	2	6
Situación al final del seguimiento:			
• Vivos sin enfermedad	31	29	2
• Vivos con enfermedad (FL)	11	4	7
• Muertos (causa no relacionada)	1	1	0
• Sin información	2	2	0

Dos pacientes de la serie del National Cancer Institute (NCI) sin información del seguimiento no han sido incluidos.

\*Linfoma de la zona marginal esplénica (2 casos), leucemia linfática crónica / linfoma linfocítico (2), linfoma de Hodgkin (2), linfoma de la zona marginal ganglionar (1), linfoma difuso de células grandes (1), linfoma linfoplasmocítico (1)

\*\*Linfoma de Hodgkin

\*\*\*GIST gástrico, mama, glotis y carcinoma de sigma

\*\*\*\*7 pacientes con linfoma compuesto fueron tratados debido al otro linfoma

nidad en la importancia de descartar la presencia de linfoma (LF o de otro subtipo histológico) en otras localizaciones. Respecto al estudio de extensión, la postura más extendida es hacer exactamente las mismas pruebas que se harían en un LF convencional. Tales pruebas deben incluir, por tanto, la anamnesis y exploración física, la biopsia de otras adenopatías o lesiones sospechosas, hemograma y estudio bioquímico del suero, con cifras de LDH y beta-2-microglobulina, citometría de flujo en sangre periférica y TAC torácica, abdominal y pélvica. No se sabe qué papel pueda desempeñar la tomografía por emisión de positrones. La realización o no de una biopsia medular es asimismo objeto de controversia<sup>(17)</sup>.

Ya se ha indicado que no existen normas clínicas basadas en la evidencia para el tratamiento del LF *in situ*, sino meros consejos de experto<sup>(17)</sup>. Si existe un linfoma sistémico además de las lesiones *in situ*, el tratamiento debe ser el propio de tal linfoma. Para las formas puras, no existe ninguna evidencia del beneficio de tratar pacientes con linfoma *in situ* localizados. Así pues, en estos casos se recomienda la abstención terapéutica; el riesgo de progresión, aun no descartable, es bajo y el pronóstico es, en todo caso, muy favorable.

Por lo que hace al seguimiento después del diagnóstico, también hay que ser cauto y no realizar exploraciones innecesarias. Visitas periódicas con exploración física y análisis serían suficientes. En caso de aparecer nuevas adenopatías u otras lesiones, ciertamente es necesario biopsiarlas.

### Linfoma del manto indolente

El LCM se considera desde un punto de vista clínico como un linfoma agresivo, con una supervivencia mediana, a pesar de la mejoría observada durante la última década, que oscila entre los 3 y los 5 años<sup>(3)</sup>. Desde que el LCM se reconoció como una entidad diferenciada, la mayoría de los pacientes, aun los asintomáticos, han sido tratados con poliquimioterapia (más recientemente con inmunquimioterapia), seguida en ocasiones de intensificación mediante algún tipo de trasplante de progenitores hematopoyéticos (auto- o alogénico). Sin embargo, en los últimos años se ha llamado la atención sobre el hecho de que algunos pacientes con LCM podrían no requerir tratamiento durante largos periodos de tiempo<sup>(11-14)</sup>. En general, la forma de presentación clínica sin adenopatías, con esplenomegalia y con frecuente expresión hemoperiférica, se ha asociado a un curso indolente de la enfermedad. Por otro lado, hay también evidencias de que el hecho de diferir el tratamiento no perjudica en absoluto el devenir de los enfermos.

El problema fundamental es el diagnóstico de estas formas “indolentes” o “no ganglionares” del LCM, ya que no existe consenso para ello. Además de la presentación clínica antes descrita, se ha intentado hallar algún marcador biológico que permita distinguir estas formas. En ese sentido, se ha sugerido que la ausencia de expresión de SOX11 podría identificar al LCM indolente<sup>(13)</sup>. Más recientemente, se ha sugerido una firma molecular de 3 genes que identificaría más finamente tal subgrupo<sup>(18)</sup>. En la [Tabla 3](#) se detallan las características clínicas de la serie original<sup>(13)</sup> según la presencia o ausencia de expresión de SOX11. De todos modos, no hay consenso en la expresión de SOX11 como marcador de buen pronóstico y, de hecho, algunos la ponen en duda<sup>(19)</sup>. En algunos de estos pacientes se ha descrito una evolución agresiva final tras un largo periodo indolente, lo que se ha relacionado con la aparición de alteraciones de 17p<sup>(18)</sup>. Finalmente, el manejo clínico de estos pacientes también está sujeto a controversia. La abstención terapéutica puede ser una opción, pero se han sugerido otras aproximaciones terapéuticas no agresivas. En las recientes guías terapéuticas del ESMO se señala que no existe consenso ni para el diagnóstico del LCM indolente ni para su manejo clínico<sup>(20)</sup>.

### Linfoma folicular localizado

Desde hace años el tratamiento del LF se ha guiado por una serie de premisas aceptadas casi dogmáticamente. Una de ellas dice que el LF es una enfermedad incurable y que, por lo tanto, en los pacientes asintomáticos la abstención terapéutica es la mejor opción, ya que el tratamiento inmediato no mejora la supervivencia. La excepción a ello sería la pequeña proporción de pacientes con linfoma localizado (estadio I y algunos estadios II) que podrían curarse con radioterapia local<sup>(15)</sup>. Así, la inmensa mayoría de los pacientes alcanza la respuesta completa y al menos de mitad de ellos podría resultar curado de la enfermedad en el seguimiento a largo plazo. Las guías clínicas actuales están de acuerdo en esta opción terapéutica<sup>(21)</sup>. Sin embargo, recientemente algún estudio ha señalado que la abstención terapéutica puede ser una opción razonable en estos casos, con resultados de supervivencia similares a los obtenidos con radioterapia. En realidad, cuando se analiza cuál es el tratamiento real que se está haciendo en USA a los enfermos con LF en estadios I o II, resulta que una tercera parte hacen abstención terapéutica, otro tercio recibe rituximab o alguna combinación con este fármaco y sólo una cuarta parte es tratada con radioterapia local<sup>(22)</sup>. Serán necesarios estudios prospectivos para determinar el papel de cada tratamiento en estos pacientes, así como el de las pruebas de imagen como el PET/TAC en el manejo de los enfermos.

**Tabla 3.** Características clínicas de pacientes con linfoma de células del manto según la expresión de SOX11 (modificado de Fernández et al., Cancer Res 2010)<sup>(13)</sup>

	SOX11 negativo	SOX11 positivo	p
<b>Datos clínicos</b>			
N	15	96	
Edad mediana (extremos)	57 (42-77)	63 (31-83)	ns
Sexo (M/F)	73/27	74/26	ns
ECOG $\geq$ 2	20	28	ns
Presencia de síntomas B	22	48	ns
Adenopatías (> 1 y > 1 cm $\varnothing$ )	22	99	0,000
Esplenomegalia	92	48	0,000
Estadio $\geq$ II	92	99	ns
MIPI alto riesgo	33	46	ns
<b>Datos biológicos</b>			
Leucocitos mediana (extremos) $\times 10^9/L$	12,1 (7-148)	5,6 (3-94)	ns
Leucocitos > 10 $\times 10^9/L$	57	18	0,011
Linfocitos > 5 $\times 10^9/L$	83	24	0,000
LDH > 450 UI/L	22	29	ns
$\beta_2$ -microglobulina > 2,3 mg/dL	65	55	ns
Médula ósea (+)	83	87	ns
Ki-67 elevado (> 50%)	20	28	ns
<b>Datos evolutivos</b>			
Seguimiento mediano (meses)	52 (1-200)	36 (1-157)	ns
Tasa de respuestas completas	40	54	ns
Tasa de recaída	50	51	ns
Tiempo mediano a la recaída (extremos)	80 (67-183)	24 (3-118)	0,025
Fallecidos	27	71	0,001
Supervivencia libre de evento (5 años)	75	23	0,04
Supervivencia global (5 años)	78	36	0,001

## Bibliografía

- Harris NL, Swerdlow SH, Jaffe ES, et al. Follicular lymphoma. In: Swerdlow S, Campo E, Harris NL, et al, eds. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France, International Agency for Research on Cancer; 2008; 220-6.
- Zinzani PL, Marchetti M, Billio A, et al. SIE, SIES, GITMO revised guidelines for the management of follicular lymphoma. Am J Hematol 2013; 88: 185-92.
- Caballero D, Campo E, López-Guillermo A, et al. Clinical practice guidelines for diagnosis, treatment, and follow-up of patients with mantle cell lymphoma. Recommendations from the GEL/TAMO Spanish Cooperative Group. Ann Hematol 2013; Epub ahead of print.
- Cong P, Raffeld M, Teruya-Feldstein J, et al. In situ localization of follicular lymphoma: description and analysis by laser capture microdissection. Blood 2002; 99: 3376-82.
- Montes-Moreno S, Castro Y, Rodríguez-Pinilla SM, et al. Intrafollicular neoplasia/in situ follicular lymphoma: review of a series of 13 cases. Histopathology 2010; 56: 658-62.
- Jagalian AG, Eberle FC, Pack SD, et al. Follicular lymphoma in situ: clinical implications and comparisons with partial involvement by follicular lymphoma. Blood 2011; 118: 2976-84.
- Henopp T, Quintanilla-Martínez L, Fend F, Adam P. Prevalence of follicular lymphoma in situ in consecutively analysed reactive lymph nodes. Histopathology 2011; 59: 139-42.
- Bonzheim I, Salaverría I, Haake A, et al. A unique case of follicular lymphoma provides insights to the clonal evolution from follicular lymphoma in situ to manifest follicular lymphoma. Blood 2011; 118: 3442-4.
- Carvajal-Cuenca A, Sua LE, Silva NM, et al. In situ mantle cell lymphoma: clinical implications of an incidental finding with indolent clinical behavior. Haematologica 2012; 97: 270-8.
- Carbone A, Gloghini A. Intrafollicular neoplasias/"in situ" lymphoma: a proposal for morphology and immunodiagnostic classification. Am J Hematol 2011; 86: 633-9.
- Orchard J, Garand R, Davis Z, et al. A subset of t(11;14) lymphoma with mantle cell features displays mutated IgVH genes and includes patients with good prognosis, nonnodal disease. Blood 2003; 101: 4975-81.



12. Martin P, Chadburn A, Christos P, et al. Outcome of deferred initial therapy in mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1209-13.
13. Fernández V, Salameró O, Espinet B, et al. Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma. *Cancer Res* 2010; 70: 1408-18.
14. Ondrejka SL, Lai R, Kimar N, et al. Indolent mantle cell leukemia: clinicopathologic variant characterized by isolated lymphocytosis, interstitial bone marrow involvement, kappa light chain restriction, and good prognosis. *Haematologica* 2011; 96: 1121-7.
15. Montoto S. Management of localized-stage follicular lymphoma: changing the paradigm? *J Clin Oncol* 2012; 30: 3328-9.
16. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, et al. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* 2011; 117: 5019-32.
17. Carbone A, Santoro A. How I treat: diagnosing and managing "in situ" lymphoma. *Blood* 2011; 117: 3954-60.
18. Royo C, Navarro A, Clot G, et al. Non-nodal type of mantle cell lymphoma is a specific biological and clinical subgroup of the disease. *Leukemia* 2012 ; 26: 1895-8.
19. Meggendorfer M, Kern W, Haferlach C, et al. SOX11 overexpression is a specific marker for mantle cell lymphoma and correlates with t(11;14) translocation CCND1 expression and an adverse prognosis. *Leukemia* 2013; Epub ahead of print.
20. Dreyling M, Thieblemont C, Gallamini A, et al. ESMO Consensus Conferences. Guidelines on malignant lymphoma, part 2: marginal zone lymphoma, mantle cell lymphoma, and peripheral T-cell lymphoma. *Ann Oncol* 2013; 24: 857-77.
21. Guielmini M, Vitolo U, Kimby E, et al. ESMO Consensus Conferences. Guidelines on malignant lymphoma, part 1: diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), follicular lymphoma (FL), and chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Ann Oncol* 2013; 24: 561-76.
22. Friedberg JW, Byrtek M, Link BK, et al. Effectiveness of first-line management strategies for stage I follicular lymphoma : Analysis of the National LymphoCare study. *J Clin Oncol* 2012 ; 30: 3368-75.

## Treatment of localized diffuse large B cell lymphoma

PROF. CHRISTIAN GISSELBRECHT

*Institut d'Hématologie. Hopital Saint Louis. Paris, France*

Diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) is the most common lymphoid malignancy in adults. Clinical presentation, behavior and prognosis are variable, depending mainly of the nodal or extranodal site when they arise. They present in localized manner in approximately 20% of patients. However, up to 40% of presentations regard an extranodal organ. Some extranodal sites, like brain or testis require special treatment strategies. Cure rate is particularly high in patients with limited disease. DLBCL is a heterogeneous disease, with phenotypic and molecular characterization. Distinct subsets, including germinal centre like (GC) and activated cell like (ABC) DLBCL have been identified as having different genetic markers, activation pathways and clinical outcomes<sup>(1)</sup>.

In localized disease, extranodal presentation is found in up to 60% of the reported series. Different anatomical sites consist of diverse tissues and some of them do not contain primary lymphoid tissues suggesting different mechanisms of lymphomagenesis. Head and neck localization are more often GC subtype<sup>(2)</sup> whereas primary CNS, ABC subtype. Primary mediastinal thymic large cell lymphoma (PMBL) expresses mature cell markers. PMBL has a distinctive gene expression signature that is closer to Hodgkin lymphoma than to DLBCL<sup>(3)</sup>. Border line cases between DLBCL and Burkitt lymphoma comprise rare tumours occurring predominantly in adults with GC B phenotype, high proliferation rate and presence of MYC rearrangement<sup>(4)</sup>. Obviously, such differences will influence treatment decisions.

Treatment options before rituximab era after staging with CT scan were chemotherapy associated with or without radiotherapy. Current treatment options in the rituximab era have to be revisited with PET scan, the addition of rituximab to chemotherapy, the involved field irradiation (IFRT) limited to involved node, the different clinical and biological characterizations of the lymphoma.

There is a whole spectrum of localized disease which can be truly localized stage I (IE) or exten-

sive stage II (IIE): nodal and extranodal, bulky or not (>10 cm). The use of PET scan in the initial staging will improve the accuracy and can upstage patient in 20 to 30% of the apparent localized stage. It will also help radiotherapy for establishing the involved field.

Looking at the clinical presentation in large randomized studies<sup>(5)</sup>, among 424 patients <60 years with stage I disease 42% had extranodal versus 58% nodal primary localization. In 204 stage II patients, 68% had extranodal versus 32% nodal primary localization. The same distribution was found in 576 patients > 60 years with half of the patients with nodal presentation and half with extranodal localization<sup>(6)</sup>. The main organs involved were: head and neck (47-57%), stomach (14-17%) followed by bone, skin (7%). When discussing the place of radiotherapy and late sequellae, one should keep in mind the type of localization and factors affecting outcome.

Before rituximab era, it was clearly established that if radiotherapy alone could be curative for a subset of patients. However, the rate of relapse was superior to 50% mainly at distant site. In fact, the rate of local relapse was 13% at 10 years and argues for a better control with the addition of chemotherapy in combination. The superiority of the association of 3 cycles of CHOP followed by localized radiotherapy was demonstrated in a randomized study against 8 cycles of CHOP (cyclophosphamide, doxorubicin, oncovin, prednisone) alone<sup>(7)</sup> (Table 1). The 5 year progression free survival was 77% vs 66% respectively. Patients enrolled onto this study were heterogeneous with regards to prognostic factors such as age and LDH level. Patients with 2 or 3 adverse prognostic factors had a 5 years PFS at 60% and 34% respectively. With a longer follow up this difference between chemotherapy alone and chemo-radiotherapy was no longer observed.

To determine the role of radiotherapy in patients with international prognostic index, IPI=0 two large randomized studies were performed by the GELA, the first one in patients less than 60 years of age and

**Table 1. Studies evaluating radiotherapy in localized stage DLBCL**

Study type	Trial name	Treatment regimen	Exclusively local relapse rates	PFS rates	New sites distant relapse
Phase III	SWOG8736	CHOP X 3 + IFRT	--	77%	
		CHOP X 8	--	64%	
	ECOG 2484	CHOP X 8 + IFRT*	18%	73%	51%
		CHOP X 8	48%	56%	82%
	LNH93-1	CHOP X 3 + IFRT	23%	74%	80%
		ACVBP + IVAM	41%	82%	66%
	LNH93-4	CHOP X 4 + IFRT**	21%	71%	79%
		CHOP X 4**	47%	64%	53%
	LNH03-1B	ACVBP (N = 17)	2 (12%)	83%	15 (12%)
R-ACVBP (N = 6)		2 (12%)	95%	4 (67%)	
Phase II	SWOG 0014	R-CHOP X 3 + IFTR	17%	88%	
Retrospective	BCCS	CHOP (-like) + IFRT	14%	81%	
	MDACC	R-CHOP ≥ 6 + IFRT	0%	82%	

the other one in elderly patients over the age of 60 years. Previously untreated patients <61 years with localized stage I or II DLBCL lymphoma and no adverse factors were randomized to 3 cycles of CHOP plus involved-field irradiation (329 patients) or chemotherapy alone (328 patients) with dose intensified doxorubicin, cyclophosphamide, vindesine, bleomycin and prednisone (ACVBP) plus sequential consolidation<sup>(5)</sup>. With a median follow up of 7.7 years, event free survival and overall survival rates were significantly higher in the group receiving chemotherapy alone. The 5 year EFS were 82% for chemotherapy alone versus 74% for those receiving chemo-radiotherapy. The 5 year overall survivals were 90% versus 81% respectively. These differences remain significant for stage II or bulky disease > 10 cm, even for these two factors present in multivariate cox analysis. Of great interest was the analysis of the site of relapses. Loco regional relapses were present in 6/18 patients in the ACVBP arm experiencing 12 distant relapses and in 8/40 in the CHOP radiotherapy arm experiencing 32 distant relapses. Nevertheless, there is an increase in toxicity with ACVBP which cannot be used safely in elderly patients. In the second study, patients older than 60 years with localized stage I or II were randomly assigned to 4 cycles of CHOP plus involved field irradiation (299 patients) or chemotherapy alone with 4 cycles of CHOP (277 patients)<sup>(6)</sup>. With a median follow up of 7 years, EFS did not differ between the two treatment groups. The 5 years EFS were 61% for chemotherapy alone and 64% for chemo-radiotherapy. Looking at relapses 79 patients in the CHOP arm experienced relapses including 47% loco regional one, versus 66 patients in

the chemo-radiotherapy arm with only 21% loco-regional. Even if the rate of distant relapses were higher in the chemo-radiotherapy arm (79% vs 53%), these results are not satisfactory and novel approaches are needed. Long term results will depend on the efficacy of chemotherapy.

Since rituximab has improved the survival in advanced disease it is likely that immuno-chemotherapy will improve survival in limited disease. The benefit of rituximab in low risk young patients has also been confirmed in the phase III randomized trial (MINT)<sup>(8)</sup>. Rituximab was combined with CHOP-21 or CHOP like regimens (R-chemo) and compared to the same chemotherapy without rituximab. There was no radiotherapy in non bulky localized stage after 6 cycles. At the last update, there was still a significant difference for the 6 year EFS and OS in favor of the R chemo arm. The MinT trial has also identified two distinct prognostic subgroups with low IPI defined as favorable (i.e. IPI=0, no bulk) or less favorable (i.e. IPI=1 or bulk or both). The 6 year PFS were 89% versus 76% respectively. No radiotherapy was used in the favorable group.

The superiority of chemotherapy with ACVBP without radiotherapy or rituximab in localized stage in young patients was previously demonstrated. Then, untreated patients younger than 66 years with stage I or II and no adverse prognostic factors were randomly assigned, to ACVBP with rituximab (R-ACVBP) or without<sup>(9)</sup>. A total of 223 patients were included. After a median follow up of 43 months the 3 year EFS was 93% in the R-ACVBP group and 82% in the ACVBP arm (P=0.04). Overall survival did not differ between the two groups with a 3 year OS at

98% and 97% respectively. Only 15 and 5 relapses were observed, 2 and 2 relapses in the initial site.

In attempt to improve the EFS in the less favorable group in 380 patients < 60 years with only 1 adverse IPI factor and to evaluate a less toxic regimen, the GELA conducted a randomized study that compared R ACVBP to R CHOP 21 without radiotherapy<sup>(10)</sup>. About half of the population had a localized stage. There was a significant improvement in favor of R ACVBP for both 3 year PFS 81% and OS 92% when compared to R CHOP 21, 67% and 84% respectively. There was an increase in hematological toxicity and mucositis but only one treatment related death was reported in the intensive arm. The superiority of R ACVBP was mostly related to a better efficacy in the ABC subgroup of DLBCL.

At the present time, there is not yet published randomized study evaluating the place of radiotherapy after R CHOP. An encouraging phase II has been reported by the SWOG in mostly DLBCL<sup>(11)</sup>. Patients had limited stage disease and at least 1 adverse IPI risk factor. Four cycles of R CHOP were administered followed by involved field irradiation. With a median follow up of 5.3 years for the 60 patients at 4 years the PFS was 88% and OS 92%. The consistent observation that patients with limited disease rarely relapse within radiated areas suggests that radio-immunoconjugate may effectively eliminate microscopic disease that has persisted after initial chemotherapy and is presently tested in an ongoing study.

The use of IFRT has been associated with improved local control, but a significant impact on long-term outcome has not been demonstrated. The overall survival with immuno-chemotherapy alone or with combination with radiotherapy is close to 90%. Although the inclusion of IFRT may allow for an abbreviated course of chemotherapy to be administered, this benefit must be weighed against the potential for radiation-induced acute and delayed toxicity. With the advent of improved systemic therapy, the routine use of IFRT in all patients with limited-stage DLBCL seems no longer justifiable. A tailored-therapy approach, with choice of treatment guided by patient performance status and chemotherapy tolerance, sites of disease involvement, clinical risk factors, and early treatment response would seem rational. Recently, a phase II study with infusional dose adjusted (DA) EPOCH-R without radiotherapy has been reported in 51 primary mediastinal B cell lymphoma. With a median follow up of 5 years the EFS rate was 93% and OS 97%<sup>(12)</sup>. Currently the controversial role of IFRT is further increase since the better quality of clinical response achieved with rituximab-chemotherapy combination and the use of PET scan evaluation of residual disease. The DSHNHL reported in the RICOVER study<sup>(13)</sup> the results in elderly

DLBCL treated with RCHOP-14 plus IFRT on bulky disease and 164 patients treated in a phase II study with RCHOP 14 but without radiotherapy. There was a significant better 5-year PFS in patients treated with consolidation with radiotherapy, but this difference disappeared in patients with bulky disease who achieved complete remission after R-CHOP.

Several studies are ongoing to reduce the duration or intensity of treatment 6 versus 4 cycles of RCHOP in the favorable group (FLYER trial) or to evaluate in a the less favorable group the place of consolidation with radiotherapy after RCHOP 14 or RCHOP 21 (UNFOLDER trial). Another, approach develops by LYSA in localized stage without adverse prognostic factor is to evaluate the quality of response with PET scan after 2 and 4 cycles. Patients are randomized upfront to the standard arm 6 cycles of RCHOP without radiotherapy and compared to the experimental arm 4 cycles in case of negative PET scan after 2 and 4 cycles. A quite similar PET driven approach is ongoing within British Columbia, with encouraging results.

---

### Take home messages

Treat your patient according to prognostic factors: Bulk, IPI... There is a very high cure rate when O-1 factor with R chemotherapy alone.

Avoiding radiotherapy is possible if complete remission: complete remission is defined with PET scan. However localized radiotherapy reduces slightly the rate of local relapse. We need more data for bulky disease.

Use the best available chemotherapy in young patient. Duration 4 or 6? Randomized studies in progress, with or without RT in bulky disease (GELA, BCCA, DSHNHL).

Salvage treatment in the absence of true complete remission is not settled: for young patients: salvage regimen and autologous transplantation? And/or radiotherapy; for elderly: salvage regimen with radiotherapy.

---

### References

1. Lenz G, Wright G, Dave SS, et al. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med.* 2008;359:2313-2323.
2. de Leval L, Bonnet C, Copie-Bergman C, et al. Diffuse large B-cell lymphoma of Waldeyer's ring has distinct clinicopathologic features: a GELA study. *Ann Oncol.* 2012;23:3143-3151.
3. Rosenwald A, Wright G, Leroy K, et al. Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J Exp Med.* 2003;198:851-862.
4. Kluin PS, H. et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues: B-cell lymphoma. Unclassifiable, with features intermediate between Diffuse Large B-cell Lymphoma and Burkitt Lymphoma. 4th Ed Lyon, France IARC. 2008.

5. Reyes F, Lepage E, Ganem G, et al. ACVBP versus CHOP plus radiotherapy for localized aggressive lymphoma. *N Engl J Med.* 2005;352:1197-1205.
6. Bonnet C, Fillet G, Mounier N, et al. CHOP alone compared with CHOP plus radiotherapy for localized aggressive lymphoma in elderly patients: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol.* 2007;25:787-792.
7. Miller TP, Dahlborg S, Cassady JR, et al. Chemotherapy alone compared with chemotherapy plus radiotherapy for localized intermediate- and high-grade non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 1998;339:21-26.
8. Pfreundschuh M, Trumper L, Osterborg A, et al. CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol.* 2006;7:379-391.
9. Ketterer N, Coiffier B, Thieblemont C, et al. Phase III study of ACVBP versus ACVBP plus rituximab for patients with localized low-risk diffuse large B-cell lymphoma (LNH03-1B). *Ann Oncol.* 2012;24:1032-1037.
10. Recher C, Coiffier B, Haioun C, et al. Intensified chemotherapy with ACVBP plus rituximab versus standard CHOP plus rituximab for the treatment of diffuse large B-cell lymphoma (LNH03-2B): an open-label randomised phase 3 trial. *Lancet.* 2011;378:1858-1867.
11. Persky DO, Unger JM, Spier CM, et al. Phase II study of rituximab plus three cycles of CHOP and involved-field radiotherapy for patients with limited-stage aggressive B-cell lymphoma: Southwest Oncology Group study 0014. *J Clin Oncol.* 2008;26:2258-2263.
12. Dunleavy K, Pittaluga S, Maeda LS, et al. Dose-adjusted EP-OCH-rituximab therapy in primary mediastinal B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2013;368:1408-1416.
13. Pfreundschuh M, Schubert J, Ziepert M, et al. Six versus eight cycles of bi-weekly CHOP-14 with or without rituximab in elderly patients with aggressive CD20+ B-cell lymphomas: a randomised controlled trial (RICOVER-60). *Lancet Oncol.* 2008;9:105-116.

## **Papel actual del análisis genético y molecular en el diagnóstico y tratamiento de las neoplasias hematológicas**

COORDINADORES: MIGUEL ÁNGEL PIRIS PINILLA. *Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander*

SERGIO ROA GÓMEZ. *Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA). Universidad de Navarra. Pamplona*

**L**a introducción de la secuenciación masiva en el estudio de las leucemias y linfomas está suponiendo una auténtica revolución en el diagnóstico y tratamiento de estas enfermedades. Estos datos, combinados con la disponibilidad de nuevas drogas dirigidas contra dianas moleculares selectivas, permiten vislumbrar el desarrollo de una medicina personalizada más efectiva y menos tóxica en un futuro cercano. Sin embargo, la incorporación del estudio mutacional en la práctica clínica rutinaria está aún lejos de ser una realidad. El objetivo de este simposio es presentar los recientes avances sobre los marcadores moleculares que hoy en día permiten prevenir la aparición de la enfermedad, mejorar el diagnóstico, estratificar y seleccionar el tratamiento más adecuado para los pacientes con neoplasias linfoides y mieloides.

## Cytogenetics and molecular biology of acute myeloid leukemia: towards an individualized therapy?

MARÍA D. ODERO

*Department of Genetics and CIMA. University of Navarra. Pamplona, Spain*

### Introduction

Acute myeloid leukemia (AML) comprises a biologically and clinically heterogeneous group of aggressive disorders that occur as a consequence of a wide variety of genetic and epigenetic abnormalities in hematopoietic progenitors. Despite significant advances in the understanding of the biology of AML, overall survival remains poor due chiefly to the high rate of relapse after achieving complete remission, as well as primary failure of induction chemotherapy.<sup>(1)</sup>

Since it is predominantly a disease of older people, the therapeutic strategy offered for AML is determined by assessment of the patient's age and general fitness level. The standard of care for over 3 decades has been the combination of daunorubicin with cytarabine (Ara-C). The majority of younger patients achieve a complete remission (CR) (75%), and 40%-45% will have a chance of cure. This represents a steady improvement over the past 40 years, although much of this can be attributed to improvements in supportive care, much of which has been learned from the transplantation experience<sup>(2)</sup>. A major challenge is the treatment of older patients, defined arbitrarily as over 60 years, who represent the majority of patients with this disease. Approximately 50% of older patients reach CR, but 85% of those entering remission will relapse, and the outcome from relapse in older patients is poor, with relatively few surviving. In addition, there is a substantial number of patients who are not considered suitable for intensive chemotherapy, for whom a palliative approach is usually offered.<sup>(2)</sup>

Continuing research into the pathogenesis and heterogeneity of AML has resulted in the development of several potentially useful therapeutic agents. Notably, acute promyelocytic leukemia (APL) has much better prognosis due to the implementation of sensitive molecular diagnostic tools, and to the introduction of all-trans retinoic acid (ATRA) in combination with anthracycline into

clinical practice. Clinical trials with patients with APL have reported complete remission and long-term disease-free survival rates of approximately 90% and 85%, respectively.<sup>(3)</sup> Other therapies targeting specific molecular defects are being developed, such as small molecule inhibitors of FLT3 kinase in patients harboring the FLT3-ITD mutation, and all-trans retinoic acid in patients with the NPM1 mutation. However, despite some advances in the treatment of AML, the overall outcome is still dismal for most patients.

### Cytogenetic and molecular aberrations with prognostic relevance in AML

Several studies over the past decades have identified a large set of chromosome aberrations, mutations and overexpressed genes with prognostic relevance in AML, improving our understanding of AML pathogenesis and risk stratification. AML patients can be classified into three different prognostic subgroups according to presence or absence of distinct cytogenetic abnormalities. Moreover, in recent years, various molecular genetic markers have been identified, especially in normal karyotype (NK) AML, where screening for mutations in genes such as FLT3, NPM1, and CEBPA has allowed better prognostic prediction (Table 1).<sup>(4,5)</sup> At present, most patients can be categorized into clinicopathological subgroups based on the presence of genetic defects. Our increasing knowledge of AML biology led to the establishment of the 2008 World Health Organization classification, which considers morphologic features and recurrent cytogenetic and molecular abnormalities.<sup>(6)</sup> In addition, an international expert panel from the European LeukemiaNet (ELN) has also recently proposed new guidelines for the management and stratification of therapies based on the strongest prognostic factors identified to date such as cytogenetic or molecular defects.<sup>(7)</sup>

**Table 1.** Relevant molecular markers in intermediate-risk cytogenetic AML (adapted from Patel et al., 2012<sup>(14)</sup>)

Overall risk profile
<b>FAVORABLE</b>
FLT3-ITD negative <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mutant NPM1 and IDH1 or IDH2</li> </ul>
<b>INTERMEDIATE</b>
FLT3-ITD negative <ul style="list-style-type: none"> <li>• Wild-type ASXL1, MLL-PTD, PHF6 and TET2</li> </ul> FLT3-ITD negative or positive <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mutant CEBPA</li> </ul> FLT3-ITD positive <ul style="list-style-type: none"> <li>• Wild-type MLL-PTD, TET2 and DNMT3A and trisomy 8 negative</li> </ul>
<b>UNFAVORABLE</b>
FLT3-ITD positive <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mutant ASXL1, MLL-PTD, PHF6 and TET2</li> <li>• Mutant MLL-PTD, TET2, DNMT3A and trisomy 8 negative, without mutant CEBPA</li> </ul>

However, a large number of AML patients lack any of these abnormalities and there remains significant heterogeneity in clinical outcome within currently classified prognostic groups. These observations suggested that there may be additional biomarkers that can predict outcome in AML. In this regard, recent genome-wide studies have identified an increasing number of recurrent somatic mutations in AML patients, such as mutations in ASXL1, DNMT3A, IDH1, IDH2, PHF6 and TET2.<sup>(4)</sup> Several of these newly identified genetic abnormalities have prognostic importance in AML. Moreover, the identification of mutations at diagnosis has served as a tool for minimal residual disease measurement. Interestingly, a recent study has provided a large-scale insight into the genetics of relapsed AML by performing whole-genome sequencing of 8 patients with relapsed AML.<sup>(8)</sup> In all patients there was a founding clone that was not ablated by chemotherapy and was still persistent at relapse; thus, prospective identification of this clone could be of great clinical utility.

### Molecular markers in normal karyotype acute myeloid leukemia

Mutational and wide-genomic studies have been especially useful to increasingly refine prognosis in patients with intermediate-risk and/or NK-AML, who represent more than 45% of all AML cases. The 5-year survival rate of these patients varies from 24% to 42%, suggesting a genetic diversity within this subgroup. As indicated above, previous studies have shown that mutational analysis of FLT3, NPM1, and CEBPA can be used to risk-stratify these patients<sup>(5)</sup>. However, more extensive mutational

analyses indicate that other genes should be included in the screening, and that mutations analysis of at least ten genes: ASXL1, CEBPA, DNMT3A, FLT3, IDH1, IDH2, MLL, NPM1, PHF6, and TET2, would represent a useful tool, discriminating intermediate-risk AML patients into robust, clinically relevant risk groups (Table 1).<sup>(4)</sup>

About 20% to 25% of AML patients harbor internal tandem duplication (ITD) mutations in the RTK Fms-like tyrosine kinase-3 (FLT3), which lead to constitutive phosphorylation of FLT3 and activation of its downstream signaling cascades, resulting ultimately in aberrant proliferation and survival. FLT3-ITD mutations have been consistently found to be an adverse prognostic marker in NK-AML patients, associated with an increased risk of relapse and inferior overall survival.<sup>(9)</sup> This has led to clinical trials treating FLT3-ITD AML patients with small-molecule FLT3-selective tyrosine kinase inhibitors. To date, however, FLT3 inhibitors used as a single agent or in combination with chemotherapy for FLT3-ITD AML have not demonstrated improved clinical efficacy.<sup>(10)</sup> Because FLT3 can crosstalk with a network of various signaling pathways, identifying and analyzing the interplay of constitutively active FLT3 with aberrant signaling pathways may lead to the identification of novel therapeutic targets for treatment of AML patients harboring constitutively active FLT3.<sup>(11)</sup>

Several studies have shown that risk associated with FLT3-ITD in AML may depend on mutational burden and its interaction with other mutations.<sup>(12,13)</sup> In the subset of patients with FLT3-ITD-negative intermediate-risk AML, there are 3 distinct risk groups that are based on mutational status and have vastly different outcomes. FLT3-ITD-negative, NPM1/



IDH mutant patients have outcomes that are better than patients with *inv(16)* or *t(8:21)*-positive AML, suggesting that this represents a favorable-risk AML subset defined by a specific mutational genotype. In contrast, FLT3-ITD-negative NPM1 mutant patients without concurrent IDH mutations have a much less favorable outcome. Most importantly, the presence of poor-risk mutations, specifically TET2, ASXL1, PHF6, and/or MLL-PTD, is associated with very adverse overall survival for FLT3-ITD wild-type, intermediate-risk patients.<sup>(14)</sup> These data suggest that NPM1 mutational status alone does not define a favorable subset of intermediate-risk AML, and that the presence or absence of additional disease alleles defines relapse risk in FLT3-ITD wild-type, intermediate-risk AML.<sup>(14)</sup> In addition, mutational studies have allowed for improved prognostication in FLT3-ITD-positive patients (Table 1).<sup>(4,14)</sup> These results have important clinical implications, because patients with mutationally defined favorable risk have a better outcome with standard induction and consolidation than even patients with core binding factor-positive AML. In contrast, patients with mutationally defined adverse-risk AML have an outcome similar to patients with adverse karyotypic risk, and standard therapies are not sufficient to offer curative intent to the majority of these patients.<sup>(4,14)</sup>

### Clinical impact of genetic aberrations in acute myeloid leukemia

With the discovery of novel genes associated with AML pathogenesis continuing at a high speed, the challenge is to integrate this knowledge into the current clinical understanding of AML.<sup>(4)</sup> Nevertheless, in the clinical setting, most AML centers use cytogenetic abnormalities and a relatively small set of gene-based tests to assign risk in AML and to determine post-remission therapy. As Patel and Levine indicate, the relative paucity of clinically used biomarkers is due to several factors. First, most biomarker studies focus on a specific genetic lesion and its prognostic relevance without considering the complete set of known mutations in parallel to determine which mutations predict outcome independently in AML. Second, most studies consider each mutant allele as a distinct variable without considering complex genotypes in which the presence/absence of multiple disease alleles has different effects on outcome than individual mutations by themselves. Third, many studies have focused on mutational “hotspots” or have used less sensitive techniques to identify loss-of-function mutations in large tumor suppressors. Finally and most importantly, until recently, most studies of AML were relatively small in size and/or were not derived from clinical trial cohorts in which the

effects of treatment on outcome can be controlled and investigated. Thus, given the increasing number of genetic abnormalities that have been identified in AML patients, it has become important to determine the prognostic relevance of all known recurrent genetic abnormalities in a uniformly treated AML patient cohort.<sup>(4)</sup>

### Conclusions and future perspectives

Recent advances in the research of AML, especially the identification of novel genetic mutations, have enabled us to stratify this heterogeneous disease entity into distinct subtypes beyond the scopes of cytomorphology and cytogenetics. However, to date, most studies have failed to identify robust predictors that modify outcome in patients with favorable or unfavorable cytogenetic risk, suggesting that chromosomal lesions remain the best predictor of outcome for the 40% of AML patients with favorable or unfavorable karyotype<sup>(4)</sup>. Thus, there is a common trend to characterize better AML subtypes as soon as the diagnosis is made. This is exemplified by the subgroup of patients with the monosomal karyotype, who have a dismal outcome with standard treatment, including transplantation.<sup>(15)</sup> However, in the group of intermediate AML the identification of mutations with impact on outcome has clinical and biological importance, and molecular screenings help to refine the treatment strategies. Therefore, it is important to determine specific mutations or combinations of mutations in this subgroup of patients, although the main goal of future mutational studies should be to inform and improve prognostic algorithms in AML. Moreover, validation of these findings in other large, homogeneously treated patient cohorts is of utmost clinical importance.<sup>(4)</sup>

As discussed above, application of whole-genome sequencing to AML has already yielded important discoveries, including the identification of common gene mutations with prognostic impact in AML. In the near future, it is likely that whole genome sequencing will become a routine part of the diagnostic workup of patients with AML.<sup>(16)</sup> Therefore, future clinical trials should aim to identify genetically defined high-risk patients to offer them novel therapies early in their disease course, in an effort to reduce relapse and increase cure.<sup>(4)</sup>

Finally, although hundreds of different genetic lesions have been described in AML, this disease shares common programs of self-renewal and transformation downstream of leukemia-associated oncogenes. These findings argue for the presence of common mechanisms of leukemia cell survival, and suggest that mechanistically common therapeutic

approaches to AML are likely to be possible.<sup>(17)</sup> Further research is thus necessary to identify effective agents and develop new individualized therapeutic strategies for the treatment of this deadly disease.

## References

1. Ravandi F, Cortes J, Faderl S, O'Brien S, Garcia-Manero G, Verstovsek S, et al. Characteristics and outcome of patients with acute myeloid leukemia refractory to 1 cycle of high-dose cytarabine-based induction chemotherapy. *Blood* 2010 Dec 23;116(26):5818-23.
2. Burnett AK. Treatment of acute myeloid leukemia: are we making progress? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012;2012:1-6.
3. Powell BL, Moser B, Stock W, Gallagher RE, Willman CL, Stone RM, et al. Arsenic trioxide improves event-free and overall survival for adults with acute promyelocytic leukemia: North American Leukemia Intergroup Study C9710. *Blood* 2010 Nov 11;116(19):3751-3757.
4. Patel JP, Levine RL. How do novel molecular genetic markers influence treatment decisions in acute myeloid leukemia? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012;2012:28-34.
5. Schlenk RF, Dohner K, Krauter J, Frohling S, Corbacioglu A, Bullinger L, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2008 May 1;358(18):1909-1918.
6. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009 Jul 30;114(5):937-951.
7. Dohner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2010 Jan 21;115(3):453-474.
8. Ding L, Ley TJ, Larson DE, Miller CA, Koboldt DC, Welch JS, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature* 2012 Jan 11;481(7382):506-510.
9. Stirewalt DL, Radich JP. The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer* 2003 Sep;3(9):650-665.
10. Weisberg E, Barrett R, Liu Q, Stone R, Gray N, Griffin JD. FLT3 inhibition and mechanisms of drug resistance in mutant FLT3-positive AML. *Drug Resist Updat* 2009 Jun;12(3):81-89.
11. Park IK, Mishra A, Chandler J, Whitman SP, Marcucci G, Caligiuri MA. Inhibition of the receptor tyrosine kinase Axl impedes activation of the FLT3 internal tandem duplication in human acute myeloid leukemia: implications for Axl as a potential therapeutic target. *Blood* 2013 Mar 14;121(11):2064-2073.
12. Gale RE, Green C, Allen C, Mead AJ, Burnett AK, Hills RK, et al. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2008 Mar 1;111(5):2776-2784.
13. Pratcorona M, Brunet S, Nomdedeu J, Ribera JM, Tormo M, Duarte R, et al. Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden FLT3-ITD mutation and concomitant NPM1 mutation: relevance to post-remission therapy. *Blood* 2013 Apr 4;121(14):2734-2738.
14. Patel JP, Gonen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2012 Mar 22;366(12):1079-1089.
15. Estey E. High cytogenetic or molecular genetic risk acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010;2010:474-480.
16. Welch JS, Link DC. Genomics of AML: clinical applications of next-generation sequencing. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011;2011:30-35.
17. Kvinlaug BT, Chan WI, Bullinger L, Ramaswami M, Sears C, Foster D, et al. Common and overlapping oncogenic pathways contribute to the evolution of acute myeloid leukemias. *Cancer Res* 2011 Jun 15;71(12):4117-4129.

## Integración del diagnóstico y la terapia en las neoplasias linfoides. Aplicación de la secuenciación masiva

MIGUEL ÁNGEL PIRIS PINILLA

*Jefe de Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario Marques de Valdecilla.  
Director Científico de IFIMAV. Santander*

Las neoplasias linfoides han sido objeto de numerosos estudios de secuenciación del genoma/exoma, publicados a lo largo de los últimos años. Como resultado de los mismos, se ha confirmado la definición de entidades actualmente propuesta por la OMS, además de identificarse marcadores precisos útiles para el diagnóstico, el pronóstico y la selección de terapia. Algunos ejemplos de lo mismo son:

- Tricoleucemia (leucemia de células vellosas): mutaciones de B-RAF en el 100% de los casos, útiles para el reconocimiento de la entidad, con marcadores subrogados inmunohistoquímicos (B-RAF-P; ERK-P). Permite la selección de la terapia (vemurafenib)<sup>(1)</sup>.
- Linfoma linfoplasmácítico: mutación L265 en el gen MYD88 en casi el 100% de los casos con producción de IgM. Presente también en MGUS-IgM<sup>(2)</sup>.
- Linfoma de la zona marginal esplénica: mutación de NOTCH2 en el 20-25% de los casos<sup>(3)</sup>.

Además, estudios de NGS (secuenciación masiva) han transformado nuestro concepto sobre la patogénesis de los linfomas, mostrando tres fenómenos esenciales:

- La señalización desde BCR o TCR es diana de mutaciones concurrentes en múltiples tipos de neoplasias linfoides<sup>(4)</sup>.
- Dinámica subclonal: los tumores están constituidos por múltiples subclonas, que evolucionan de forma dinámica, modeladas por el ambiente del tumor y la terapia recibida<sup>(5)</sup>.

- La selección de la terapia basada en datos mutacionales requiere, en los tipos comunes de neoplasias linfoides, secuenciación de decenas o centenares de genes regulando múltiples rutas entrelazadas<sup>(6)</sup>. Se presentarán datos sobre la selección de terapia en neoplasias de células B y células T.

### Bibliografía

1. Tiacci E, Trifonov V, Schiavoni G, Holmes A, Kern W, Martelli MP, et al. BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *The New England journal of medicine* 2011 Jun 16; 364(24): 2305-2315.
2. Treon SP, Xu L, Yang G, Zhou Y, Liu X, Cao Y, et al. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenstrom's macroglobulinemia. *The New England journal of medicine* 2012 Aug 30; 367(9): 826-833.
3. Rossi D, Trifonov V, Fangazio M, Brusca A, Rasi S, Spina V, et al. The coding genome of splenic marginal zone lymphoma: activation of NOTCH2 and other pathways regulating marginal zone development. *The Journal of experimental medicine* 2012 Aug 27; 209(9): 1537-1551.
4. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordonez GR, Villamor N, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2011 Jul 7; 475(7354): 101-105.
5. Landau DA, Carter SL, Stojanov P, McKenna A, Stevenson K, Lawrence MS, et al. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* 2013 Feb 14; 152(4): 714-726.
6. Zhang J, Grubor V, Love CL, Banerjee A, Richards KL, Mieczkowski PA, et al. Genetic heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013 Jan 22; 110(4): 1398-1403.

## Alteraciones genéticas en la leucemia linfática crónica: nuevas dianas y estrategias terapéuticas

MÓNICA LÓPEZ-GUERRA, SÍLVIA XARGAY-TORRENT, DOLORS COLOMER

Unitat d' Hematopatologia. Hospital Clínic. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS). Barcelona

### Introducción

La leucemia linfática crónica (LLC) es la leucemia más común en adultos. En los últimos años, la LLC ha pasado de considerarse un tumor provocado por la acumulación de linfocitos B quiescentes con un bajo índice de proliferación, a un tumor con una pequeña proporción de células en sangre periférica con un fenotipo proliferativo procedentes del microambiente de los ganglios linfáticos. La historia natural de la LLC generalmente implica la progresión hacia un fenotipo más maligno, aunque es muy heterogénea, incluyendo tanto a pacientes con enfermedad estable durante años como a pacientes que progresan rápidamente. Los predictores biológicos de la evolución de la enfermedad son el estado mutacional de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IGHV), la expresión de ZAP-70 y de CD38. Estudios funcionales y moleculares del receptor de células B (BCR) sugieren la hipótesis de que la estimulación del BCR está implicada en la selección y expansión del clon maligno de la LLC<sup>(1)</sup>. Además, los avances recientes en el estudio genético de la LLC mediante la utilización de *next-generation sequencing* (NGS) han caracterizado una serie de alteraciones genéticas que pueden tener importantes implicaciones en la estratificación de los pacientes y en la posibilidad de nuevos tratamientos. Además de las mutaciones ya conocidas en genes de reparación del DNA (*TP53*, *ATM*), las mutaciones recurrentes más frecuentes se hallan en las vías de señalización de Notch (*NOTCH1*), en las vías de respuesta a inflamación (*MYD88*) y activación de NF- $\kappa$ B (*BIRC3*) y en la maquinaria de procesamiento del RNA (*SF3B1*)<sup>(2-4)</sup>. Recientemente se ha descrito que estas mutaciones pueden ser de dos tipos: clonales, que representan eventos tempranos en el proceso de transformación de la célula maligna, o mutaciones subclonales, presentes en una pequeña proporción de células tumorales y que representan eventos tardíos en la historia de la LLC (Figura 1). Se postula que la evolución de la LLC es un proceso complejo dinámico

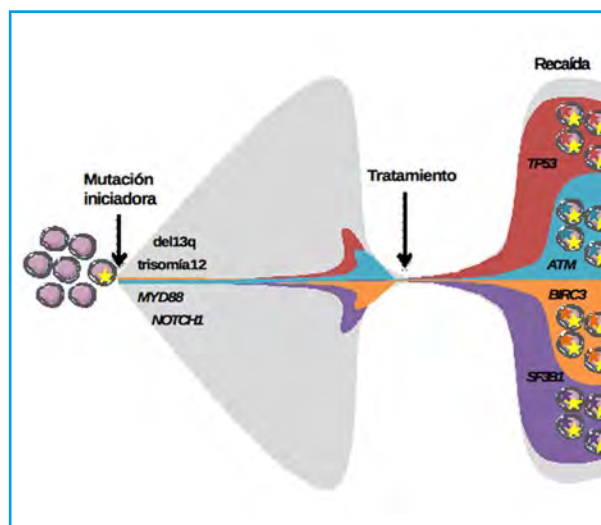


Figura 1. Evolución clonal de las principales alteraciones genéticas en la LLC (modificado de Puente XS &, López-Otín C. Nat Genet. 2013;45(3):229-31.

co en el que los subclones con mutaciones específicas pueden variar durante la evolución y el tratamiento de la enfermedad<sup>(5)</sup>.

### BCR y microambiente

En los linfocitos B, la activación del BCR por contacto con el antígeno induce la fosforilación de residuos de tirosina en varios sustratos intracelulares, como son las tirosina-quinásas de la familia SRC (LYN, FYN, BLK), SYK y CD79A y CD79B. Dichos procesos de fosforilación son de importancia capital en la transducción de señales activadoras al interior de la célula e incluyen la movilización de calcio y la fosforilación de múltiples quinásas. Particularmente, SYK, BTK, PI3K $\delta$  y la fosfolipasa C $\gamma$ 2 juegan un papel fundamental en este proceso. En las células de la LLC, la señalización del BCR controla la supervivencia celular y se correlaciona con marcadores de mal pronóstico (IGHV no mutadas y positividad para ZAP-70 y

CD38) y peor respuesta clínica<sup>(1)</sup>. El papel propuesto del BCR en la patogénesis de la LLC ha abierto un nuevo horizonte en el tratamiento de esta entidad. Así, pequeñas moléculas inhibitoras de algunas quinasas de la vía del BCR han demostrado ser efectivas en la LLC. Entre ellas, el inhibidor de BTK ibrutinib y el inhibidor de PI3Kδ GS-1101 han inducido muy buenas respuestas en pacientes afectados de LLC. Estas respuestas clínicas se caracterizan por una disminución muy importante de las adenopatías, que frecuentemente va acompañada de linfocitosis transitorias, debidas a movilizaciones de las células tumorales de los nichos proliferantes a la sangre periférica<sup>(6)</sup>. En la medula ósea y en los tejidos linfoides, los linfocitos de la LLC interactúan con células accesorias, las células estromales, que constituyen el microambiente tumoral<sup>(7)</sup>. Este microambiente proporciona las señales de crecimiento y supervivencia al clon B maligno y puede ser uno de los principales responsables del fallo al tratamiento. *In vitro*, las células estromales protegen a las células de la LLC de la apoptosis espontánea e inducida por fármacos de manera dependiente de contacto, pero también debido a la secreción de una serie de citoquinas. Además del papel que juega en la respuesta inmune, la activación del BCR también modula la respuesta de las células B a estas citoquinas, muchas de ellas implicadas en la adhesión celular y la quimiotaxis, como por ejemplo CXCL12. Estudios *in vitro* demuestran que el inhibidor de BTK ibrutinib y el inhibidor de PI3Kδ GS-1101 inhiben la activación del BCR y la protección del microambiente tumoral en células de LLC, así como la señalización de citoquinas. Nuestro grupo ha demostrado que el inhibidor multiquinasa sorafenib<sup>(8)</sup> y el inhibidor de PI3K NVP-BKM120<sup>(9)</sup> también son capaces de vencer el efecto protector ejercido por la estimulación de BCR y por el microambiente, e inhiben tanto la migración como la secreción de citoquinas de las células de la LLC, cada uno de ellos inhibiendo unas proteínas específicas del BCR.

### Señalización de Notch

La vía de Notch regula diferentes procesos implicados en el desarrollo y la señalización celulares. Los ligandos de Notch (*Jagged* y *Delta-like*) interactúan con los receptores de Notch, induciendo su proteólisis mediante gamma-secretasas y la translocación de su dominio intracelular al núcleo, dando lugar a la transcripción de diversos genes. Las mutaciones de *NOTCH1* se hallan aproximadamente en el 12% de las LLCs<sup>(2,10)</sup>. Estas mutaciones generan un codón de stop prematuro, dando lugar a una proteína Notch1 truncada, que pierde su dominio PEST en el extremo C terminal. Este dominio es crítico para su degradación por el proteasoma, por lo que la proteína muta-

da se acumula sin degradarse. Además de las mutaciones de *NOTCH1*, se han encontrado mutaciones de *FBXW7*, un regulador negativo de Notch1<sup>(4)</sup>. Por otra parte, Notch1 y sus ligandos están constitutivamente expresados en la LLC e implicados en la resistencia a la apoptosis y en la supervivencia de las células tumorales<sup>(11)</sup>. Los pacientes de LLC con mutaciones de *NOTCH1* se asocian a estadios más avanzados al diagnóstico, a los factores biológicos adversos como son IGVH no mutadas y expresión alta de ZAP-70 y CD38, así como a una menor supervivencia global y una peor respuesta a la terapia<sup>(10,12)</sup>. Debido al papel que pueda jugar la señalización de Notch en la patogénesis de la LLC, se está evaluando la eficacia de inhibidores de esta vía, que se están utilizando en ensayos clínicos en la leucemia linfoblástica T aguda (LAL-T), donde más del 50% de los casos presentan mutaciones de *NOTCH1*<sup>(13)</sup>. Ya que la gamma-secretasa es necesaria para el procesamiento y la activación de Notch, se han desarrollado pequeñas moléculas inhibitoras de gamma-secretasas (GSIs), siendo MK-0752 y PF-03084014 los inhibidores en fases más avanzadas. Este tipo de compuestos inducen una parada de crecimiento y apoptosis en células tumorales. Además, se han descrito sinergias entre los GSI y otros fármacos como la dexametasona en la LAL-T<sup>(14)</sup>. Uno de los problemas de los GSI en la clínica es su toxicidad, debido a que no son inhibidores específicos de Notch1, por lo que, como una nueva alternativa terapéutica, se han desarrollado anticuerpos específicos contra Notch1<sup>(15)</sup>.

### Vías de respuesta a inflamación y activación de NF-κB

Se ha identificado una mutación recurrente del gen *MYD88* (L265P) en el 3% de los casos con LLC, que ocurre preferentemente en individuos jóvenes en estadios avanzados de la enfermedad y con IGHV mutadas<sup>(2)</sup>. La mutación de *MYD88* se ha descrito en otros linfomas, preferentemente en el linfoma difuso de célula grande<sup>(16)</sup>. *MYD88* es una proteína adaptadora que participa en la señalización de los receptores *toll-like* (TLR) durante la respuesta inmune. Nuestro grupo ha demostrado que la mutación de *MYD88* aumenta su interacción con las quinasas IRAK, dando lugar a la activación de la vía de NF-κB y a la secreción de citoquinas (IL1RA, IL-6, CCL2, CCL3 y CCL4)<sup>(2)</sup>. El aumento en la producción de estas citoquinas se ha implicado en el reclutamiento de macrófagos y linfocitos T por parte de las células de la LLC, creando un microambiente favorable para su supervivencia. El complejo de señalización regulado por *MYD88* representa una diana de interés. Así, se han desarrollado inhibidores de IRAK1/4 que pueden utilizarse solos o en combinación con fármacos inhibi-

dores de la vía de BCR o NF- $\kappa$ B. Cabe destacar que se han detectado también de forma aislada casos de LLC con mutaciones en genes que participan en la vía de los TLR<sup>(6)</sup>, señalando la relevancia de la respuesta inflamatoria en la patogénesis de la LLC. Además, se ha descrito que la proteína BTK se une a diferentes miembros de los TLR, así como a MYD88 y IRAK1<sup>(17)</sup>, sugiriendo que esta quinasa estaría participando en la respuesta inmune y que los inhibidores de BTK podrían ser de utilidad para bloquear estas interacciones.

Al igual que en otras neoplasias linfoides B maduras, en la LLC también se han descrito mutaciones de *BIRC3*, que están asociadas a un peor pronóstico. *BIRC3* es una proteína que coopera con TRAF2 y TRAF3, para regular negativamente a MAP3K14, un activador de la vía no-canónica de NF- $\kappa$ B. Todas las mutaciones descritas de *BIRC3* eliminan el dominio RING del extremo C-terminal, que es esencial para la degradación por proteasoma de MAP3K14 por *BIRC3*, por lo que los casos con mutación de *BIRC3* presentan una activación constitutiva de NF- $\kappa$ B<sup>(18)</sup>. Esto abre la posibilidad terapéutica de utilizar inhibidores específicos de NF- $\kappa$ B en la LLC<sup>(19)</sup>.

### Maquinaria de procesamiento del RNA

El gen *SF3B1* es un componente crítico del complejo que promueve la escisión precisa de los intrones a partir del pre-mRNA<sup>(20)</sup>. Este gen se halla mutado en el 5-18% de las LLC<sup>(3,4)</sup> y en síndromes mielodisplásicos<sup>(21)</sup>, pero no en otras neoplasias de célula B madura. Las mutaciones de *SF3B1* se asocian a una peor supervivencia, a una enfermedad más agresiva<sup>(3,4)</sup> y a resistencia a fludarabina<sup>(22)</sup>. Por el momento no se conoce el papel de *SF3B1* en la patogénesis de la LLC, pero se postula que las mutaciones de este gen podrían estar asociadas a inestabilidad genómica y a modificaciones epigenéticas<sup>(23)</sup>. Además, se han detectado mutaciones en otros genes relacionados también con la maquinaria de procesamiento y transporte del RNA, lo que sugiere que tratamientos dirigidos contra estas vías podrían ser de gran interés<sup>(24)</sup>. Se está analizando el efecto de compuestos que afectan la maquinaria del procesamiento del RNA para el tratamiento de estas entidades<sup>(25)</sup>.

### Conclusiones

La LLC presenta una gran diversidad genética y molecular. Los distintos genes mutados identifican subgrupos relativamente pequeños de pacientes con características diferentes en su enfermedad. De hecho, las mutaciones que más se repiten se dan en sólo el 15% de los pacientes. A partir de toda la información generada es necesario conocer los mecanismos

bioquímicos alterados por dichos cambios, y poder diseñar tratamientos más específicos para esta enfermedad.

### Bibliografía

- Gaidano G, Foa R, la-Favera R. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *J.Clin.Invest* 2012;122:3432-3438.
- Puente XS, Pinyol M, Quesada V et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2011;475:101-105.
- Quesada V, Conde L, Villamor N et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor *SF3B1* gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat.Genet.* 2012;44:47-52.
- Wang L, Lawrence MS, Wan Y et al. *SF3B1* and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N.Engl.J.Med.* 2011;365:2497-2506.
- Landau DA, Carter SL, Stojanov P et al. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* 2013;152:714-726.
- Wiestner A. Emerging role of kinase-targeted strategies in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012;120:4684-4691.
- Burger JA, Ghia P, Rosenwald A, Caligaris-Cappio F. The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood* 2009;114:3367-3375.
- Lopez-Guerra M, Xargay-Torrent S, Perez-Galan P et al. Sorafenib targets BCR kinases and blocks migratory and microenvironmental survival signals in CLL cells. *Leukemia* 2012;26:1429-1432.
- Rosich L, Saborit-Villarroya I, López-Guerra M, et al. The phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor NVP-BKM120 overcomes resistance signals derived from microenvironment by regulating the Akt/FoxO3a/Bim axis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica*. 2013 Jul 12. [Epub ahead of print]
- Villamor N, Conde L, Martinez-Trillos A et al. NOTCH1 mutations identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with high risk of transformation and poor outcome. *Leukemia* 2013;27:1100-1106.
- Rosati E, Sabatini R, Rampino G et al. Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. *Blood* 2009;113:856-865.
- Rossi D, Rasi S, Fabbri G et al. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012;119:521-529.
- Weng AP, Ferrando AA, Lee W et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 2004;306:269-271.
- Samon JB, Castillo-Martin M, Hadler M et al. Preclinical analysis of the gamma-secretase inhibitor PF-03084014 in combination with glucocorticoids in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Mol.Cancer Ther.* 2012;11:1565-1575.
- Wu Y, Cain-Hom C, Choy L et al. Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors. *Nature* 2010;464:1052-1057.
- Ngo VN, Young RM, Schmitz R et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* 2011;470:115-119.
- Mohamed AJ, Yu L, Backesjo CM et al. Bruton's tyrosine kinase (Btk): function, regulation, and transformation with special emphasis on the PH domain. *Immunol.Rev.* 2009;228:58-73.
- Rossi D, Fangazio M, Rasi S et al. Disruption of *BIRC3* associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012;119:2854-2862.

19. Lopez-Guerra M, Colomer D. NF-kappaB as a therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Expert.Opin.Ther. Targets.* 2010;14:275-288.
20. Bonnal S, Vigevani L, Valcarcel J. The spliceosome as a target of novel antitumour drugs. *Nat.Rev.Drug Discov.* 2012;11:847-859.
21. Papaemmanuil E, Cazzola M, Boultonwood J et al. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N.Engl.J.Med.* 2011;365:1384-1395.
22. Rossi D, Brusca A, Spina V et al. Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood* 2011;118:6904-6908.
23. Wan Y, Wu CJ. SF3B1 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013; 121:4627-4634.
24. Ramsay AJ, Rodriguez D, Villamor N et al. Frequent somatic mutations in components of the RNA processing machinery in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2013;27:1600-1603.
25. Webb TR, Joyner AS, Potter PM. The development and application of small molecule modulators of SF3b as therapeutic agents for cancer. *Drug Discov.Today* 2013;18:43-49.

## La hematología en tiempos de crisis

COORDINADORES: LUIS PALOMERA BERNAL. *Servicio de Hematología. Hospital Clínico Lozano Blesa. Zaragoza*  
ANTONIO FERNÁNDEZ JURADO. *Servicio de Hematología. Hospital Juan Ramón Jiménez. Huelva*

En una época de grave crisis económica con gran inestabilidad financiera, el crecimiento del gasto sanitario durante las tres últimas décadas ha sido superior a la del producto interior bruto. Esta situación está condicionando una crisis del modelo sanitario que hace que exista una percepción por parte de los ciudadanos, de las instituciones y de los políticos de que el sistema sanitario precisa de una profunda reforma. En este entorno, tanto los profesionales como las sociedades científicas se están viendo obligados a participar e implicarse en la sostenibilidad del sistema sanitario. Fruto de este compromiso es el origen de este simposio en el que se pretenden analizar nuevas formas de gestión y de innovación.

Para garantizar la sostenibilidad del sistema sanitario y preservar la calidad y equidad del mismo son necesarias nuevas propuestas. Unas de las mejores herramientas es el cambio del centro de gravedad de la gestión trasladando el peso de la misma de los equipos directivos a los profesionales sanitarios. Así, los clínicos, centrándose en las necesidades y los problemas de los pacientes, gestionarán los recursos disponibles buscando una asistencia de calidad y más eficiente. En este sentido, la comunidad autónoma de Andalucía es pionera en el desarrollo de Unidades de Gestión Clínica en estas nuevas formas de gestión. De la experiencia de la Unidad del Hospital Regional Universitario Carlos Haya de Málaga versará la exposición de la Dra. Ana I. Heiniger. Asimismo el Dr. Ramón Salinas, del Banc de Sang i Teixits del Hospital Mutua de Terrasa, analizará nuevos modelos de gestión en Hematología y Hemoterapia que se readapten a la situación de crisis económica actual.

Debido a que los modelos de gestión actuales son rígidos y poco competitivos, es necesario un cambio en la forma de gestionar tanto los centros hospitalarios como de investigación, introduciendo una visión empresarial e innovadora. Para abordar estas interesantes propuestas contamos con el Dr. Lluís Blanch, director de Investigación e Innovación de la Corporación Sanitaria y Universitaria Parc Taulí de Sabadell (Barcelona), que, contando con la experiencia de un centro pionero en esta materia, abordará el interesante y actual tema del hospital innovador.

Se incluye en este simposio una ponencia, por parte del Dr. Adrián Alegre, presidente de la Comisión Nacional, sobre la futura formación de los MIR en el sistema de Troncalidad. El contenido de esta ponencia será objeto de debate en la reunión conjunta con la EHA que tendrá lugar en este Congreso.

Esperamos que este simposio permita a los profesionales en Hematología y Hemoterapia tener un mayor conocimiento acerca de la gestión clínica y sus nuevos modelos, que pueda conducir hacia una forma de trabajar más innovadora. Obligatoriamente, nos ha de exigir el máximo compromiso con la misma, como mejor herramienta de defensa de los intereses e integralidad de nuestra especialidad y, al mismo tiempo, con nuestro tradicional ejercicio del rigor clínico, mantener los necesarios criterios de eficiencia que han de caracterizar la práctica cotidiana de los hematólogos.



## El servicio de hematología como unidad de gestión clínica

ANA ISABEL HEINIGER MAZO

*Unidad de Gestión Clínica de Hematología y Hemoterapia. Hospital Regional Universitario Carlos Haya. Málaga*

### Introducción

Desde hace más de una década, los sistemas sanitarios del mundo occidental están preocupados por el crecimiento del gasto sanitario y se están planteando reformas orientadas hacia la búsqueda de una organización sanitaria más flexible, eficiente y que sea sostenible financieramente. En los últimos meses, con la agudización de la crisis económica, ha habido un descenso brusco de la financiación de los sistemas sanitarios, llevándonos a una situación que nos obliga a priorizar y gestionar la escasez, tratando de mantener la calidad y el nivel de prestaciones a los ciudadanos, pero esto difícilmente se conseguirá si no se implica en ello a los profesionales sanitarios.

En este contexto, no hay un horizonte claramente definido para la especialidad de Hematología y Hemoterapia. Probablemente los problemas de competencias con las llamadas especialidades frontera se incrementarán y tendremos que seguir luchando por sobrevivir integrados en las tres vertientes de la especialidad, ya que la unión de las tres facetas, clínica, laboratorio y hemoterapia, constituye la razón de ser de nuestra especialidad. Los servicios de hematología deberían disponer de identidad propia e independencia organizativa, pero los límites en sus competencias, como ocurre con otras especialidades médicas, son difíciles de definir y algunas actividades están siendo realizadas en ciertos entornos por otros especialistas. La integración/desintegración de la especialidad de Hematología y Hemoterapia ya ha sido tema de debate de numerosas reuniones de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia con varias publicaciones al respecto<sup>(1-4)</sup> y algunos comunicados de nuestra sociedad<sup>(5)</sup> culminando con la magnífica edición del *Libro Blanco de la Hematología y Hemoterapia*, donde prestigiosos compañeros describen la situación actual de la especialidad a lo largo y ancho del país y su proyección de futuro.

### Modelos sanitarios en las distintas comunidades autónomas

Nuestro Sistema Nacional de Salud terminó el proceso descentralizador de la asistencia sanitaria a las comunidades autónomas (CC. AA.) en el año 2003 y éstas han ido implantando diferentes modelos sanitarios, de lo que resulta un mapa sanitario heterogéneo con peculiaridades diferentes en materia sanitaria. Son las CC. AA. las que deciden el presupuesto que destinan a Sanidad de entre el total que reciben para el conjunto de las transferencias recibidas, lo que, sumado a un desarrollo legislativo distinto y a la presencia de diferentes tendencias políticas en sus gobiernos, ha producido una gran disparidad de políticas sanitarias entre ellas. En el año 1997, la Ley 15/1997<sup>(7)</sup> habilitó nuevas formas de gestión, abriendo la posibilidad de que los servicios sanitarios sean prestados por personas jurídicas privadas y que existan distintos modelos de provisión de servicios, surgiendo así los conciertos con entidades privadas, las fundaciones públicas sanitarias, los consorcios, las empresas públicas, concesiones como el Hospital de Alzira o los nuevos hospitales de Madrid.

En algunas CC. AA. la opción elegida ha sido potenciar el modelo de Unidades de Gestión Clínica, basándose en su capacidad de aumentar la eficiencia por la implicación de los profesionales sanitarios en la gestión de los recursos utilizados en su propia práctica clínica; en otras, la administración sanitaria ha propuesto la transferencia de una parte sustancial de la gestión sanitaria (prestación de servicios) a empresas privadas, generando una gran oleada de rechazo entre la población y el colectivo sanitario<sup>(8)</sup>. En la Comunidad Valenciana echó a andar en 1999 el Hospital de la Ribera y son ya cinco en total los hospitales valencianos gestionados por empresas privadas (que cubren al 20% de la población) una fórmula extendida posteriormente a la Comunidad de Madrid y otras regiones. En Cataluña, el servicio público de salud contrata con dis-

tintas entidades proveedoras de salud, que pueden ser desde empresas privadas, mutuas, fundaciones o incluso grupos de médicos, como ocurre en algunos centros de salud. En el País Vasco han diseñado un modelo centrado en el paciente crónico, considerando que un buen control de estos pacientes puede ahorrar dinero, visitas a urgencias y mejorar la eficiencia del sistema. Andalucía, Galicia, Asturias, entre otras, han apostado por las Unidades de Gestión Clínica; Castilla y León regulará en breve el desarrollo de las Unidades de Gestión Clínica en sus hospitales. Actualmente Galicia y Andalucía están avanzando en una nueva estructura de gestión integrada, creando las Áreas de Gestión Sanitaria, que son responsables de la gestión unitaria de los dispositivos asistenciales tanto de la atención primaria como de la atención hospitalaria, y las Unidades de Gestión Clínica Intercentros, donde se integran varios servicios de la misma especialidad o de diferentes especialidades relacionadas entre sí. A fecha de abril de 2013 en Andalucía hay 993 Unidades de Gestión Clínica, 418 en atención primaria y 575 en hospitales; de ellas 158 son intercentros, y el objetivo para el final de esta legislatura es que los hospitales de las capitales de provincia tengan integradas la mayoría de sus unidades.

En España disponemos de un Sistema Nacional de Salud ampliamente reconocido. A la práctica universalidad de su cobertura se unen unos resultados excelentes en los principales indicadores de salud, y los propios usuarios del sistema expresan unos elevados grados de satisfacción con sus prestaciones. Resulta difícil conocer en qué grado las diversas modalidades de gestión se han traducido en diferencias en el funcionamiento de los servicios sanitarios y más aún su repercusión en las prestaciones sanitarias y en los niveles de salud de la población.

### La gestión clínica ventajas e inconvenientes

La Gestión Clínica constituye un proceso de rediseño organizativo que incorpora a los profesionales sanitarios en la gestión de los recursos utilizados en su propia práctica clínica. La Gestión Clínica permite descentralizar progresivamente las decisiones sobre la gestión de los recursos utilizados en la práctica clínica y dotar a las unidades asistenciales de la capacidad e instrumentos para planificar y gestionar sus actividades en un marco de recursos limitado. Podríamos considerar la gestión clínica como un posible marco de encuentro entre gestores y clínicos. En los últimos tiempos y poco a poco se ha producido una aproximación entre clínicos y gestores, las Administraciones Sanitarias han comprendido que sin la complicidad de los profesionales es difícil gestionar eficientemen-

te los servicios sanitarios, y gran parte de los colectivos profesionales se han acercado en estos años a la gestión, siendo conscientes de que no es suficiente con ser un buen médico sino que sus posibilidades de desarrollo profesional están en buena medida vinculadas a su capacidad de complementar clínica y gestión<sup>(9)</sup>.

Para su desarrollo, la Gestión Clínica necesita la creación de Unidades de Gestión Clínica o Áreas de Gestión Clínica en las que se agrupan un conjunto de profesionales de diversos estamentos y categorías, para trabajar con arreglo a los principios de autonomía, responsabilidad y participación en la toma de decisiones, bajo la dirección de un director/coordinador, para el cumplimiento de unos objetivos incluidos en el Acuerdo de Gestión Clínica, estableciéndose incentivos orientados al logro de la excelencia en calidad y eficiencia. La Gestión Clínica puede abarcar a uno o varios servicios del hospital, a Atención Primaria o a toda el Área Sanitaria y pueden ser Intercentros y también Interniveles.

Frente a lo ocurrido con otras fórmulas de gestión sanitarias, como la colaboración público-privada, la Gestión Clínica no ha sufrido un rechazo frontal a su implantación. La principal ventaja de la Gestión Clínica frente a las otras modalidades de asistencia sanitaria (fundaciones, empresas públicas, institutos, etc.) es la posibilidad de implantación interna, no siendo imprescindible un cambio normativo. En Andalucía, hace un par de años, el Servicio Andaluz de Salud sacó un borrador de una normativa que regulaba el funcionamiento de las Unidades de Gestión Clínica, pero el rechazo sindical fue tan grande que el decreto no llegó a ver la luz. El Gobierno de la Nación, en el último Consejo de Ministros de abril 2013, ha anunciado la definición de un nuevo marco legal para el modelo de Gestión Clínica, de aplicación en todos los centros del Sistema Nacional de Salud. El Gobierno no ha detallado su contenido pero parece que estará en línea con el acuerdo firmado entre el Ministerio de Sanidad y 36 sociedades científicas, entre las que está la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia, para identificar procedimientos ineficaces o innecesarios y contribuir a la sostenibilidad del Sistema Sanitario Público.

En general, el modelo de gestión clínica incrementa la motivación entre el personal, mejora las relaciones con los usuarios y aumenta la eficiencia. La necesidad de tener que trabajar con un Contrato Programa, de saber los costes de los procesos que se realizan, así como la actividad del conjunto de la unidad clínica, aporta una información de gran valor. El hecho de conocer esta información estimula a los grupos así constituidos a proponer líneas de actuación y objetivos de mejora.

El aumento de la eficiencia obtenido mediante la implantación de la Gestión Clínica está limitado por una insuficiente autonomía de gestión. En Madrid, la Federación de Asociaciones Científico-Médicas Españolas (FACME) ha propuesto al Ministerio de Sanidad y a la Comunidad Autónoma una alternativa a la privatización, mediante la creación de Unidades Asistenciales de Gestión Empresarial, teniendo como núcleo fundamental el desarrollo de la autonomía de gestión clínica pero con una personalidad jurídica propia que permita la transferencia de responsabilidad y riesgos, con el objetivo de aumentar la eficiencia de la gestión clínica. FACME considera que las Unidades Asistenciales de Gestión Empresarial pueden ser como mínimo tan eficaces y eficientes como los hospitales privatizados, que garantizan la calidad, preservan los principios generales que inspiran el funcionamiento del Sistema Nacional de Salud y son menos traumáticas de implantar<sup>(10)</sup>.

Un inconveniente de las Unidades de Gestión Clínica puede ser la desestructuración organizacional de los servicios clásicos. En el caso de los servicios de hematología y hemoterapia, cuya organización no es uniforme en todos los hospitales, y en algunos casos está siendo condicionada por las direcciones de los centros o por la influencia o poder de otros servicios, nos podemos encontrar con algunas situaciones conflictivas, que describo a continuación:

- La tendencia centralizadora de los laboratorios y la organización funcional en una sola Unidad de Gestión Clínica está poniendo en peligro la vertiente analítica de la Hematología (hemogramas y coagulación básica).
- Los Centros Regionales de Transfusión Sanguínea han ido haciéndose cargo progresivamente de la actividad transfusional de algunos hospitales, dejando a éstos como meros depósitos de sangre.
- La propuesta del Ministerio de Sanidad de incrementar la atención pediátrica a los 18 años puede favorecer el desarrollo de especialidades pediátricas que quieran atender las patologías que venimos tratando hematólogos dedicados a la hematología infantil.
- La expansión de la especialidad de oncología y su apatencia por los linfomas es otro frente a tener en cuenta.

En Andalucía, donde llevamos más de una década con la Gestión Clínica, existen 16 Unidades de Gestión Clínica de Hematología, 5 en los 5 hospitales regionales, 8 en los 9 hospitales de especialidades, en uno de ellos está integrada en el laboratorio (Unidad de laboratorio) y en otros dos, están fusionadas con el laboratorio (Unidad de Laboratorio y Hematología) o con Anatomía Patológica (Unidad de Hematología y Anatomía Patológica). De los 15 hos-

pitales comarcales, sólo en los dos de la provincia de Cádiz existen con personalidad propia, en uno de los casos como Unidad Intercentros fusionada con la unidad del hospital de referencia, los 13 Servicios de Hematología restantes están integrados en la Unidad de Laboratorio, dependiendo habitualmente de analistas. A pesar de ello, la figura del hematólogo en los hospitales comarcales sigue siendo fundamental en los Servicios de Transfusión, en el apoyo al laboratorio, y sobre todo en las consultas externas de Patología Hematológica (LLC, SMD, anemias, coagulopatías, filtrado diagnóstico de hemopatías malignas, etc.) y como consultores de otras especialidades.

## Conclusiones

El Servicio Nacional de Salud en España se encuentra en una encrucijada. En los últimos 50 años pocas veces han sido tan fuertes las presiones para limitar el gasto público. Será necesario seguir impulsando la transformación de nuestro sistema sanitario público con el fin de asegurar su adaptación a los retos del futuro, siendo los más significativos la demografía, la cronicidad y la sostenibilidad económica del mismo.

La polémica sobre la conveniencia de la colaboración público-privada o el camino de la Gestión Clínica están en el debate sanitario actual; sin embargo, tal vez no sea tan importante quién gestione los hospitales sino que seamos capaces de dar respuestas a las necesidades reales de la población. Frente al sistema de privatizaciones, el camino de la Gestión Clínica, con una visión territorial y en colaboración con otros hospitales, no sólo centrado en pacientes agudos sino adaptado a los distintos perfiles de pacientes e integrado en una red de cuidados coordinada, nos puede llevar a hacer los cambios necesarios para conseguir un modelo de salud más eficiente y con mejores resultados de calidad.

La gestión clínica puede suponer un riesgo o una oportunidad para la integración de la especialidad. Si seguimos las directrices del Plan Estratégico de la Hematología y Hemoterapia<sup>(11)</sup>, potenciando la influencia de la especialidad en la sociedad y en la Administración Pública, mejorando la interlocución sobre las especialidades frontera, demostrando nuestro alto contenido científico y de investigación, nuestro elevado nivel de protocolización y nuestra capacidad de cooperación y coordinación con otros servicios y niveles asistenciales, conseguiremos convencer a las Administraciones Públicas de los valores destacados de nuestra especialidad. Unir nuestras fuerzas fusionando servicios de Hematología y Hemoterapia, a nivel local o provincial, para ser más eficientes, sin perder calidad y con un coste menor, puede transformar el riesgo de desestructuración en una oportunidad de integración de la especialidad de mano de la Gestión Clínica.

## Bibliografía

1. J. Díaz Mediavilla. Comisión Nacional de Hematología y Hemoterapia ¿Especialidad integrada o dispersa? *Haematológica* 1997; 82(Supl1): 303-307.
2. M. Giralt. Los grandes problemas de la Hematología: el Laboratorio de Hematología. *Haematológica* 1997; 82 (Supl1): 314-319.
3. Vicente V, De Arriba F, Amigo ML y Heras I. ¿Siguen siendo útil el modelo de servicio de hematología y hemoterapia clásico e integral? Organización actual y futuro previsible. *Haematologica* 2008; 93 (Supl1): 232-236.
4. Sánchez Godoy P. Funcionamiento integrado de la clínica con el laboratorio. *Hematológica* 2009; 94 (Supl1): 403-409.
5. Declaración oficial de la AEHH sobre la especialidad en relación con otras especialidades frontera. [www.aehh.org](http://www.aehh.org). Diciembre 2008.
6. Sevilla F. La Ley General de Sanidad: el impulso necesario. *Rev. Adm. Sanit.* 2007; 5 (3): 407-25.
7. Sevilla F. La organización de los servicios sanitarios en las Comunidades Autónomas. *Rev. Adm. Sanit.* 2006; 4(1):13-6.
8. Á. López | C. G. Lucio | M. Valerio ¿Qué comunidad autónoma tiene el mejor modelo sanitario? *El Mundo*. Madrid 08/02/2013.
9. José Luis Temes Montes. Gestión clínica. Ventajas e inconvenientes. *Arbor* CLXX; 670 (Octubre 2001): 363-370.
10. Unidades Asistenciales de Gestión. Una alternativa para mejorar la calidad y la eficiencia de la asistencia sanitaria. *Boletín digital FACME* marzo 2013.
11. Javier Batlle Fonrodona. Resumen del Plan estratégico. Libro Blanco de la Hematología y Hemoterapia en España: 205-218. Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia. ISBN-13: 978-84-7714-376-5.

## Nuevos modelos de gestión en hematología y hemoterapia: readaptarse a la actual situación de crisis económica

RAMON SALINAS I ARGENTE<sup>1,2</sup>, MARIA DEL MAR PUJOL BALAGUER<sup>1,3</sup>,  
MARICEL SUBIRÁ CASELLAS<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Banc de Sang i Teixits. Catalunya Central

<sup>2</sup> Hospital Universitari Mutua Terrassa (Barcelona)

<sup>3</sup> Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona

<sup>4</sup> Hospital Universitari Sagrat Cor. Barcelona

### Introducción

La actual situación que estamos viviendo en España pone de manifiesto que no se está viviendo una simple crisis, sino que se está viviendo un verdadero cambio de época. La Fundación Encuentro (Salamanca) en su informe España 2012 analiza en profundidad algunas de las claves de este cambio. El impacto de internet en el sistema económico, la degradación del lenguaje público y del debate de ideas, la crisis de la emprenduría, la desigualdad de oportunidades educativas y la continuidad o no de la misma como canal de movilidad social, las TIC y su acelerado desarrollo, las infraestructuras desarrollan un capítulo específico “El impacto de la crisis en sanidad: recortes estructurales asimétricos con altos costes diferidos”, que utilizo en la introducción de este documento.

Valorar el impacto de la crisis económica en sanidad va más allá de analizar la política sanitaria. Requiere un análisis más complejo, que tenga en cuenta:

- *El impacto en la salud*, asociado a la fragilidad previa de la estructura y el bienestar social (así como a la magnitud de la crisis).
- *La estructura social* (o distribución del empleo, la educación y la riqueza), más frágil ante el embate de la crisis cuanto menos igualitaria sea.
- *El bienestar y la redistribución* (fiscalidad, Estado de bienestar, Sistema Nacional de Salud –SNS–), claves para apuntalar la estructura social y la salud.
- *Las respuestas políticas a la crisis*, y en concreto su efectividad o capacidad para prevenir (a bajo coste) secuelas diferidas en la igualdad, el bienestar y la salud.

Los efectos de la crisis en sanidad, educación y bienestar (pensiones, rentas mínimas, servicios sociales) son complejos y persistentes. Se producen *a través de una doble vía*, en varias fases y afectan tanto a los usuarios de los servicios como a sus descendientes y a su red social. De modo inmediato, la crisis impacta en la estructura social (por ejemplo, aumento del des-

empleo y la pobreza), lo que genera problemas de salud (enfermedad y discapacidad) en los afectados, y un aumento automático del gasto social y sanitario (por la *vía de la demanda*). De modo diferido, el deterioro en la salud inicial, si no se trata adecuadamente, genera paro y pobreza crónica en los afectados, lo que debilita aún más su salud y deprime a largo plazo la tasa de empleo agregada. El impacto social final de la crisis depende de en qué medida las respuestas del Gobierno (por la *vía de la oferta* de atención sanitaria y de las políticas de salud y bienestar) afronten de un modo responsable el aumento de la necesidad, de manera que se minimicen los costes sanitarios diferidos, la mortalidad prematura y las posibles secuelas permanentes en la salud y el empleo.

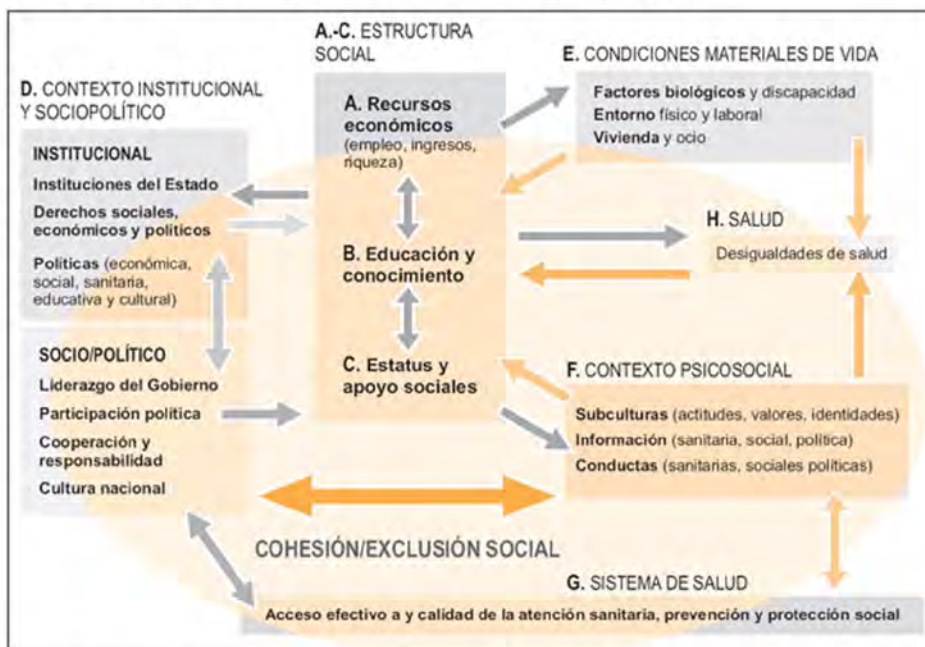
El impacto de la coyuntura económica en sanidad depende de cuatro factores:

- Estructura social (distribución del empleo, la educación y la riqueza).
- Redistribución y bienestar público (fiscalidad, Estado de bienestar, SNS).
- Respuestas políticas y sociales a la crisis.
- Impacto en la salud de la población (que depende de los tres anteriores).

Estos factores cambian a ritmos diferentes; el grado en que responden a la intervención pública también varía. Hay escasos estudios que analicen los cuatro efectos. El modelo más completo (centrado en lo *estructural*) es el de los determinantes sociales de la salud (DSS). Los más adaptados a nuestros objetivos son los *modelos dinámicos*, que evalúan el impacto en el tiempo ([Cuadro 1](#)).

En el [Cuadro 2](#) se muestra el despliegue dinámico del proceso causal que vincula crisis y salud. Existe evidencia sólida de que los problemas de salud mental como la ansiedad y la depresión detectan el impacto inmediato y amplifican el impacto diferido de la crisis en la salud (a través del aumento de la severidad y de los costes de las enfermedades crónicas más comunes). Son, por ello, un factor mediador clave del impacto de la crisis no sólo en salud física y la dis-

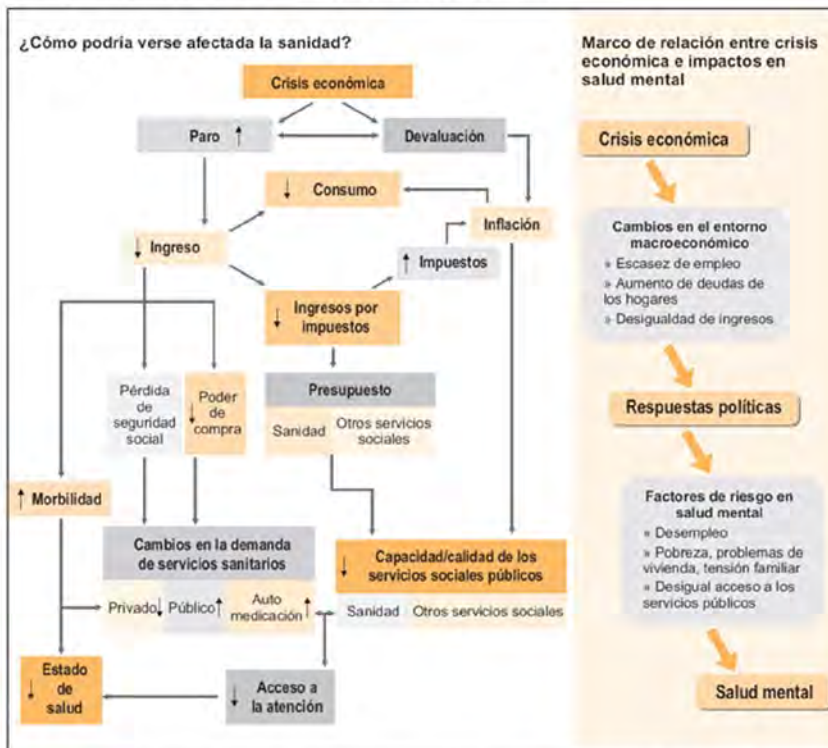
Cuadro 1 – Marco conceptual de los determinantes sociales de la salud (DSS)



Fuente: Ministerio de Sanidad y Política Social (2010); *Hacia la equidad en salud: Monitorización de los determinantes sociales de la salud y reducción de las desigualdades en salud. Informe independiente de expertos comisionado por la Presidencia Española de la UE.*

Cuadro 1. Marco conceptual de los determinantes sociales de la salud (DSS).

Cuadro 2 – Modelos de impacto dinámico en sanidad y salud mental



Fuente: Wright, S. (2009); *Impact of the economic crisis on the health care sector and its investment*. Rotterdam: European Centre for Health Assets and Architecture (izquierda); y OMS (2011); *Impact of economic crises on mental health* (derecha)<sup>6</sup>.

Cuadro 2. Modelos de impacto dinámico en sanidad y salud mental.

capacidad sino también en la sanidad. Tan relevantes, que al final de la exposición detallaremos el “Modelo de gestión y organización de Kaiser permanente”, que posiblemente marcará la tendencia en nuestro modelo sanitario en los próximos años.

Los modelos dinámicos subrayan que los factores que median entre crisis y salud varían a ritmos diferentes:

- La *estructura social* (como la mortalidad y la esperanza de vida) cambia más lentamente y refleja en mayor medida inercias históricas.
- El *Estado de bienestar* (y el SNS) es fruto de políticas redistributivas previas que cambian a ritmo lento (y, en menor medida, de las respuestas a la crisis).
- Las *respuestas políticas y sociales*, que pueden transformarse a un ritmo relativamente rápido, y que según su orientación pueden amplificar o paliar los posibles efectos permanentes de la crisis.

En resumen, la medición adecuada del impacto de la crisis en sanidad requiere:

- Estudiar las interacciones entre economía, política, sociedad y salud.
- Desagregar por colectivos y áreas vulnerables.
- Combinar factores estructurales con modelos dinámicos.
- Identificar impactos inmediatos, diferidos y permanentes.
- Incluir indicadores objetivos y subjetivos.

### La respuesta política en sanidad: España y la UE

La primera medida de recorte en sanidad es el cierre de un 25% de los centros de atención primaria en Cataluña. En 2011 el Gobierno baja un 5% los salarios y suspende sustituciones y contratación de interinos, lo que reduce el gasto en 1.500 millones. En 2012, el Gobierno anuncia recortes del 20% para 2012-2014. En 2012 son del 14% en sanidad y del 40% o más en campos complementarios clave, como infancia, dependencia y servicios sociales. En marzo, la reforma laboral recorta el poder sindical y los derechos de seguridad y salud laboral y abarata y facilita los despidos. El Real Decreto-ley 16/2012 de *medidas urgentes para garantizar la sostenibilidad del Sistema Nacional de Salud*, de 20 de abril, introduce recortes estructurales. El 3 de agosto se aprueba el Real Decreto 1192/2012 que regula la condición de asegurado. El 7 de agosto se envía a las comunidades autónomas una orden que regularía la asistencia de los grupos excluidos. Las respuestas autonómicas dependen del partido político en el gobierno. En comunidades autónomas gobernadas por partidos de centro-derecha, los recortes son en servicios de bajo coste, sensibles y más efectivos para contrarrestar su impacto en salud, como salud mental, enfermería,

atención primaria, promoción de la salud, salud laboral y prevención de enfermedades infecciosas, crónicas y conductas de riesgo. Las cinco comunidades autónomas no gobernadas por el Partido Popular (Andalucía, Asturias, Cataluña, Canarias y País Vasco) presentan demandas jurídicas contra la legislación central de recortes; dos más, Galicia y Comunidad Valenciana, declaran que atenderán a los inmigrantes pobres. Andalucía y País Vasco revierten además las medidas más controvertidas mediante normativa autonómica, a lo que el Gobierno central responde presentando un recurso contra estas medidas ante el Tribunal Constitucional. Los datos muestran que en 2008-2011 se dispara la preocupación por la economía y el paro: menos del 4% consideran la sanidad un problema en 2008, en septiembre de 2011 son ya un 6%. En mayo de 2012, la sanidad es ya el cuarto problema de la lista, y en junio está ya en tercer lugar; en julio, un 10% de la población la considera el principal problema del país (Cuadro 3).

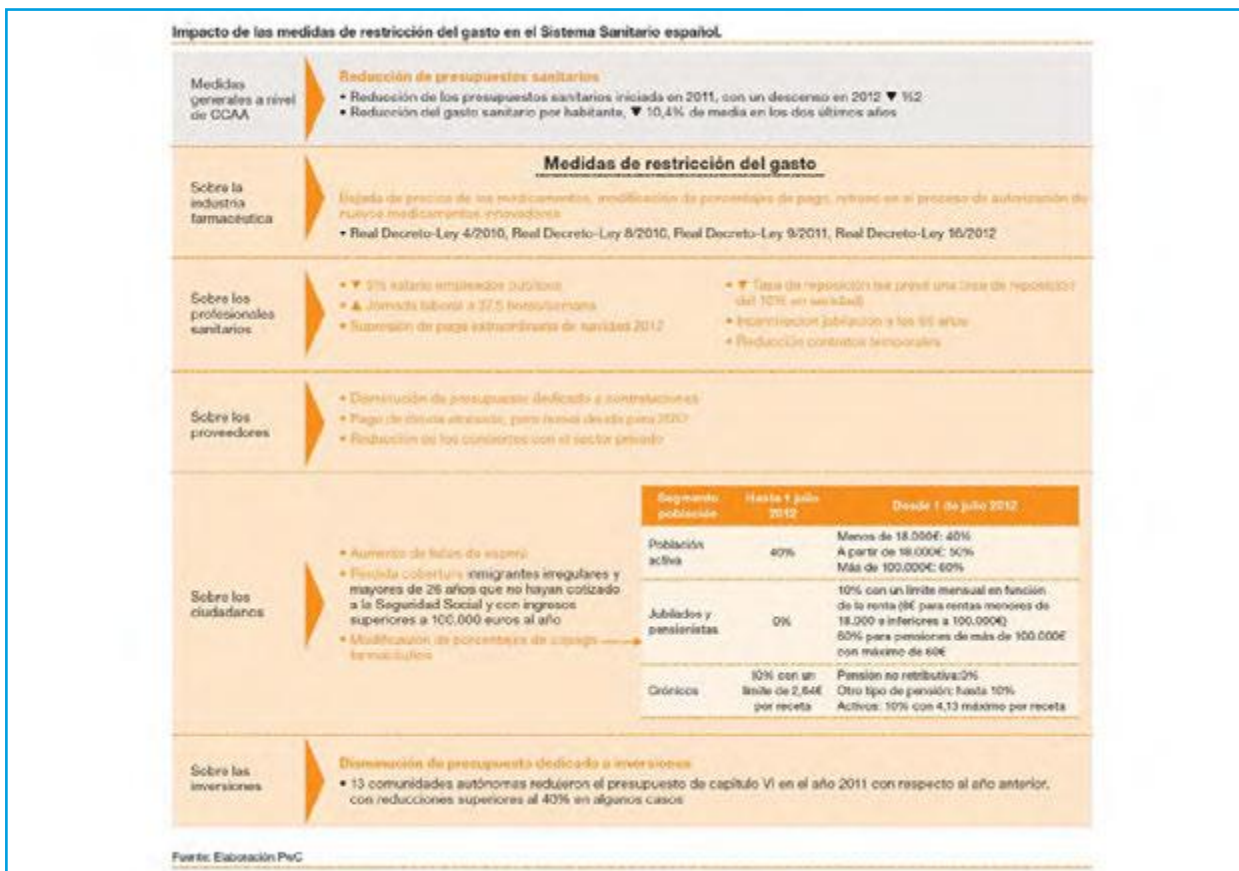
Las principales debilidades del SNS español son:

- Las desigualdades territoriales, que tienen como consecuencia una mayor mortalidad prematura en determinadas áreas.
- El déficit de personal y gasto en atención comunitaria, que se paga en incremento del uso de las urgencias y de los medicamentos.
- La infrapresupuestación crónica, que se traduce en aumentos del déficit, del aseguramiento privado y de las listas de espera. Los *enfermos crónicos severos* aumentan en España tras la crisis; presentan comorbilidades. La comorbilidad entre diabetes y depresión (dos patologías cuya tendencia ascendente se acelera con la crisis) es la que más gastos genera en España y, según el King's Fund, puede multiplicar por 8 los costes.

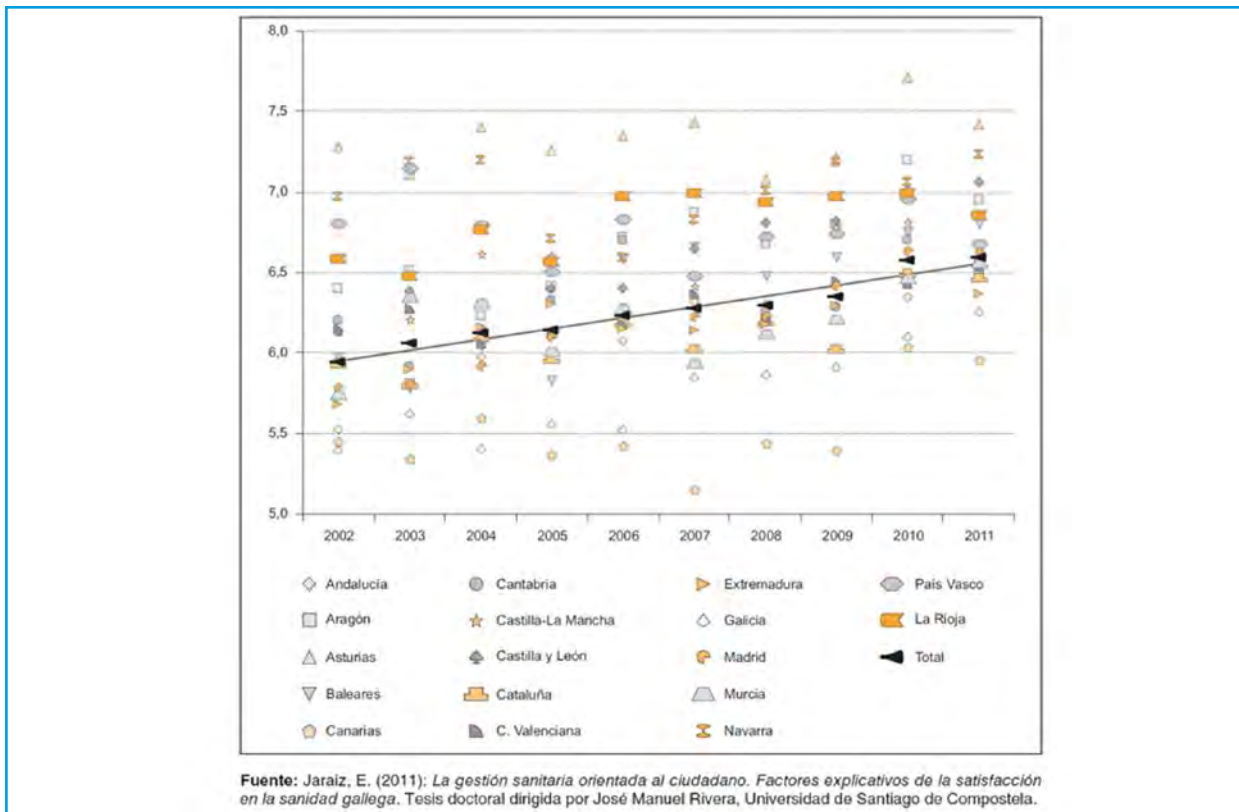
La *discapacidad* es la secuela más temida de la enfermedad crónica. Más de dos tercios de la discapacidad en los países avanzados se debe a condiciones crónicas no tratadas adecuadamente. Las enfermedades crónicas que causan más discapacidad son el infarto cerebral (un 60% de los enfermos quedan discapacitados); la depresión mayor, el Parkinson y otros trastornos motores (40%); la migraña, los dolores lumbares y el trastorno bipolar (30%); y la osteoporosis y la esclerosis múltiple (20%). A ellas hay que añadir los traumatismos craneoencefálicos y el sida, especialmente en niños.

Otros problemas persistentes son la baja satisfacción con la información sanitaria no clínica, con las listas de espera en atención especializada, con la cobertura de los servicios sociales y con la **coordinación de la atención entre niveles y sectores**.

En los Cuadros 4 y 5 se muestra el grado de satisfacción con la sanidad por comunidades autónomas y el gasto sanitario público total por partidas en porcentaje.

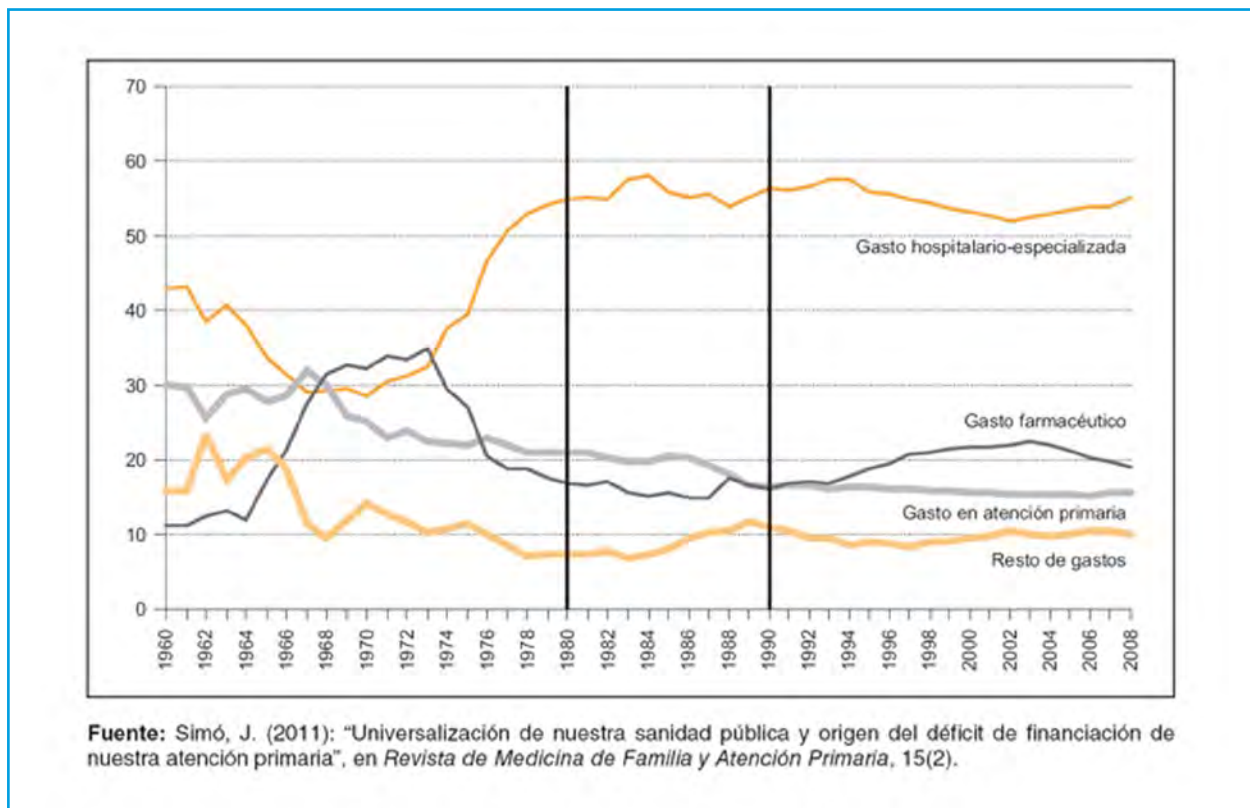


Cuadro 3. Impacto de las medidas aplicadas en el Sistema Sanitario Español. Fuente Pricewaterhouse Coopers, S.L.



Cuadro 4. Evolución de la satisfacción con la sanidad por comunidades autónomas (2002-2011).





Cuadro 5. Evolución del gasto sanitario por partidas, en porcentaje del gasto sanitario público total (1960-2008).

### Impacto de la crisis económica en la salud

Podemos identificar cinco puntos problemáticos claves y cinco posibles acciones de mejora de bajo coste y alto impacto en salud.

- Según el indicador de mortalidad y tomando como referencia la evolución del periodo 1990-20011, se puede afirmar que en España los 4 primeros años de la crisis dejan un saldo de muertes evitables y años de vida potenciales perdidos entre la población menor de 65 años. Este saldo es menor que en otros países similares en cuanto a magnitud de la crisis y desigualdad previa (como EE. UU. o Irlanda), pero superior a países (como Suecia, Canadá o Australia) con altos niveles de inversión en bienestar público, que amortiguan su impacto social y en salud. Aumentan, además, correlativamente la actividad y las esperas en atención a la cronicidad, salud mental y enfermedades del corazón.
- Es importante estimar impactos diferidos, dado que pobreza y mala salud tienen efectos multiplicadores acumulativos que se transmiten de una generación a otra.
- La situación de inmigrantes y niños también generará importantes costes diferidos: pueden aumentar en la próxima década los muertos por tuberculosis y sida, la mortalidad infantil, bajo peso al nacer y la desnutrición y la violencia en la infancia.

### Acciones de mejora

Para evitar secuelas permanentes y costes diferidos, se pueden potenciar cinco áreas de intervención pública de bajo coste y alta efectividad para garantizar un SNS universal sostenible:

- *Inversión en atención comunitaria* (atención primaria, salud mental, cronicidad, discapacidad) integrada de calidad.
- *Promoción e incentivos al acceso de inmigrantes a la atención primaria y salud mental.*
- *Refuerzo de la salud pública*, en especial de proyectos, unidades y acciones anticrisis económica.
- *Inversión en formación de sanitarios y compensación por formación de sanitarios extracomunitarios públicos a los países de origen.*
- *Inversión en un modelo nórdico de bienestar.*

### Medidas destinadas a permitir la sostenibilidad del sistema sanitario

El porcentaje del PIB destinado a sufragar el gasto sanitario ha crecido año tras año, abriendo el debate sobre la sostenibilidad financiera a medio y largo plazo de los sistemas de salud.

Las principales causas de este crecimiento son:

1. La introducción de nuevas tecnologías sanitarias.
2. El incremento de la inflación sanitaria por enci-

ma de la inflación general, que se explica por los mayores costes:

- de las nuevas tecnologías (medicamentos, dispositivos, prótesis, etc.)
  - de los profesionales sanitarios, debido a su creciente escasez.
3. La mayor utilización de los servicios de salud por parte de la población, provocada por los cambios:
- del patrón de morbilidad: envejecimiento y enfermedades crónicas;
  - de los hábitos de vida menos saludables y la menor tolerancia a las enfermedades;
  - por la modificación del concepto de “calidad de vida” y *consumerismo* médico.
4. Las ineficiencias sistémicas en el modelo de atención sanitaria como:
- la escasa integración entre los niveles asistenciales;

- la variabilidad clínica;
- los costes crecientes de administración y coordinación.

En España, la reciente crisis económica ha provocado una fuerte caída de la recaudación fiscal, generando un déficit del 11,4% del PIB (cerca de 100.000 millones de €) en 2009. En este contexto, el Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud (CISNS), en su reunión del 18 de marzo de 2010 aprobó un conjunto de medidas para promover la sostenibilidad del sistema.

Antares Consulting, desde el análisis de las propuestas, analiza y propone 10 medidas estructurales para garantizar la sostenibilidad del SNS a largo plazo. Lo que pretenden es contribuir al debate sobre la sostenibilidad del SNS. Las medidas que sugieren actúan sobre las causas que provocan el crecimiento del gasto sanitario por encima del crecimiento de la riqueza nacional año tras año (Cuadro 7). La aplicación de estas medidas permitirá al sistema un ahorro de 63.768 millones de € (Cuadro 8).

De estas medidas, algunas están claramente vinculadas con los servicios de hematología y hemoterapia. Entendiendo como servicio de hematología y hemoterapia todas las áreas que componen el mismo: banco de sangre, laboratorio básico, trombosis, hematología clínica, diagnóstico biológico complejo, etc.

Por su repercusión en nuestra especialidad, analizaremos con algo de detalle las propuestas 4, 5, 7 y 8.

Ambito	Medida
<b>Calidad, equidad y cohesión</b>	1. Plena universalidad
	2. Garantizar tiempo máximo de acceso a las prestaciones
	3. Calendario Vacunal único
	4. Uso extensivo de la eHealth y las nuevas tecnologías
	5. Historia Clínica Digital común
<b>Eficiencia y gasto sanitario a corto plazo</b>	6. Políticas comunes de gasto farmacéutico
	7. Procedimiento de compras agregadas
	8. Estrategias educativas, informativas y organizativas para moderar la presión asistencial
	9. Criterios comunes para las retribuciones
<b>Medidas a medio plazo a estudiar en 2010</b>	10. Incremento finalista de recursos al SNS
	11. Fondo de Cohesión Sanitaria
	12. Mecanismos de compensación del gasto soportado en contingencias laborales
	13. Revisar tarifas por atención a los accidentes de tráfico
	14. Mecanismos de reembolso derivados de la atención a pacientes de la UE Estrategias de salud conjuntas entre CCAA
	15. Aumentar participación de los profesionales en la gestión
	16. Estudio sobre necesidades de profesionales de cuidados de enfermería
	17. Sistema común de planificación de recursos humanos
	18. Sistema de información común de indicadores de resultados en salud
	19. Registro de profesionales
	20. Mapa de especialidades médicas en base a un modelo troncal
	21. Estrategia común para la atención de pacientes crónicos
	22. Promover estilos de vida saludables
	23. Reforzar papel Evaluación Tecnologías Sanitarias

**Cuadro 6.** Acciones y medidas para promover la calidad, equidad, cohesión y sostenibilidad del Sistema Nacional de Salud (SNS). Fuente: Consejo Interterritorial del SNS. 18 de marzo de 2010.

Causa de incremento del gasto sanitario	Medidas propuestas
Difusión de nuevas tecnologías	1. Reforzar el papel de la evaluación de tecnologías sanitarias.
Incremento inflación sanitaria	2. Mejorar el rendimiento y productividad de los recursos humanos. 3. Incrementar el copago en farmacia.
Incremento utilización servicios sanitarios	4. Desarrollar el modelo de atención a pacientes con enfermedades crónicas. 5. Desarrollar el espacio sociosanitario alternativo a la hospitalización. 6. Invertir decididamente en prevención y promoción de la salud.
Ineficiencias del sistema de atención	7. Generalizar los servicios compartidos entre proveedores asistenciales. 8. Reordenar la medicina de tercer nivel y la oferta hospitalaria. 9. Impulsar las estrategias de seguridad del paciente. 10. Potenciar iniciativas que aceleren el retorno de la inversión de las TIC en salud.

**Cuadro 7.** Medidas estructurales para garantizar la sostenibilidad del Sistema Nacional de Salud. Fuente: Antares Consulting.

Causa de incremento del gasto sanitario	Medidas propuestas	Impacto (M€)	Calendario
Difusión de nuevas tecnologías	1. Reforzar el papel de la evaluación de tecnologías sanitarias.	438	Largo plazo
Incremento inflación sanitaria	2. Mejorar el rendimiento y la productividad de los recursos humanos.	3.102	Medio plazo
	3. Incrementar el copago en farmacia.	513	Corto Plazo
Incremento utilización servicios sanitarios	4. Desarrollar el modelo de atención a pacientes con enfermedades crónicas.	988	Medio plazo
	5. Desarrollar el espacio sociosanitario alternativo a la hospitalización.	1.076	Medio plazo
	6. Invertir decididamente en prevención y en mejora de la salud.		Largo plazo
Ineficiencias del sistema de atención	7. Generalizar los servicios compartidos entre proveedores asistenciales.	1.708	Medio plazo
	8. Reordenar la medicina terciaria y la oferta hospitalaria.	1.038	Medio plazo
	9. Mejorar la seguridad del paciente y reducir la variabilidad de la práctica clínica.	1.010	Largo plazo
	10. Potenciar iniciativas que aceleren el retorno de la inversión de las TIC en salud.		Medio plazo
<b>Total Impacto medidas</b>		<b>9.872</b>	
<b>Total Gasto Sanitario Público</b>		<b>63.768</b>	
<b>% sobre gasto sanitario</b>		<b>15%</b>	

**Cuadro 8.** Impacto económico estimado de las medidas de ahorro propuestas por Antares Consulting.

#### **Propuesta 4: Desarrollar el modelo de atención a pacientes crónicos**

Numerosos informes aconsejan el cambio del modelo asistencial actual, basado en la atención a la enfermedad aguda, a un modelo de atención basado en la atención a la enfermedad crónica, ya que ésta supone hasta el 75% del gasto sanitario y el 6,77% del PIB del país. Existen varios modelos teóricos de atención a la enfermedad crónica y varias experiencias prácticas implantadas en diversos países. Conviene resaltar que prácticamente todos ellos incorporan el principio de la segmentación de la población según el grado de su patología y aplican diferentes modos de atención a cada grupo. Estos modelos emplean de forma intensiva la prevención (primaria, secundaria y terciaria), el autocuidado por parte del paciente, los hospitales de procesos subagudos frente a los hospitales de agudos, la asistencia ambulatoria, la atención en el domicilio del usuario y la telemedicina como nuevas formas de prestar servicios a los pacientes, introduciendo un trabajo multidisciplinar y nuevos roles profesionales, como la gestión de casos.

La mejora de la atención al paciente crónico reduce:

- La hiperfrecuentación de la atención ambulatoria, principalmente en la atención primaria.

- Las visitas a los servicios de urgencias.
- La utilización de los servicios de hospitalización de procesos agudos.

El ejemplo paradigmático sería la aseguradora americana Kaiser Permanente. Kaiser Permanente integra la función de aseguramiento (*health plan*) y diversas estructuras de provisión, incluyendo sus 30 hospitales y *The Permanent Medical Group* (PMG), que emplea a los 11.000 profesionales médicos que trabajan en Kaiser, junto con otros 135.000 trabajadores.

La población asegurada ronda los 8 millones y medio de personas en Estados diferentes y en el distrito de Columbia. El 70% del colectivo de asegurados se ubica en California.

La financiación estimada para 2004 era de 25.000 millones de dólares, que proceden en un 64% de sus miembros, 28% de fondos públicos (principalmente vía Medicare), un 4% de copagos y el resto de fuentes diversas.

Kaiser Permanente opera en un entorno altamente competitivo con presiones simultáneas de contención de costes y de mejora de la calidad de la atención. La respuesta estratégica de Kaiser es un enfoque de mejora de la salud poblacional, tratando de minimizar la utilización y prestando servicios en el nivel de atención más coste-efectivo. Como consecuencia de este enfoque, las barreras tradicionales entre niveles se difuminan y surge un modelo de atención integrada con soluciones innovadoras, donde se potencia al máximo la capacidad resolutoria en el nivel de Atención Primaria y comunitaria y se presta especial atención a la minimización de las hospitalizaciones, que son vistas como un "fallo del sistema", en palabras del director ejecutivo de PMG.

Para los directivos de Kaiser los rasgos que definen el éxito de su modelo son:

1. Enfoque de salud poblacional.
2. Liderazgo clínico.
3. Práctica profesional en equipos que colaboran de forma integrada.
4. Profesionales médicos contratados por una misma organización (PMG) y que trabajan en exclusividad.
5. Compromiso con la gestión del conocimiento, con la difusión de las mejores prácticas y con el aprendizaje organizativo.
6. Énfasis en la prevención, detección precoz y educación sanitaria.
7. Gestión activa y coordinada de las enfermedades crónicas.
8. Importancia de la investigación clínica.
9. Atención sanitaria basada en la evidencia.
10. Énfasis en la calidad clínica.

**Propuesta 5: Desarrollar un espacio sociosanitario alternativo a la hospitalización de agudos**

Las ventajas de la atención integrada pueden ser:

- Evitar duplicidades en los recursos empleados
- Menor sobreexplotación de recursos
- Aumentar la calidad de la prestación social y sanitaria
- Mejorar la calidad de vida de las personas y los resultados en salud
- Mejorar la satisfacción de las personas
- Reducir costes

Crear el espacio sociosanitario supone:

- Construir órganos conjuntos para elaborar y gestionar
- Las políticas sociosanitarias; administrar una financiación única y suficiente del nuevo espacio
- Gestionar los recursos actuales de manera diferente, de forma integrada, basándose en la gestión de casos y equipos multidisciplinares
- Utilizar las TIC como una herramienta para facilitar y para hacer más eficientes los costes

**Propuesta 7: Generalizar los servicios compartidos entre proveedores, especialmente los de soporte clínico**

En otros sectores, la implantación de modelos de servicios compartidos mediante la alianza de distintas organizaciones ha contribuido a reducir costes, incrementar la eficiencia y optimizar la calidad desde hace años. Estos modelos permiten racionalizar el rendimiento y mejorar los resultados en diferentes aspectos:

- Reduciendo de forma neta los costes directos
- Minimizando la duplicación de actividades y la burocracia
- Desarrollando economías de escala
- Optimizando la gestión de recursos y procesos
- Fortaleciendo la calidad y la eficiencia de forma objetiva

En los hospitales podemos diferenciar tres grandes categorías de servicios y recursos:

- De asistencia directa: hospitalización, urgencias, bloque quirúrgico, cuidados intensivos, etc.
- De soporte a la asistencia clínica: laboratorios clínicos, diagnóstico por la imagen, farmacia, etc.
- Generales: logística, mantenimiento, seguridad, vigilancia, lavandería, cocina, etc.

El principio básico de estos modelos es establecer un solo proveedor del “servicio” para una red de “centros-clientes”, desarrollando de forma centralizada las diferentes actividades relacionadas con la cadena de valor de dicho servicio, en vez de tener múltiples unidades operativas. Estos procesos compartidos parecen dirigirse, tanto administrativa como físicamente, desde las di-

ferentes unidades operativas hacia una organización integrada, de gestión y funcionamiento separados.

Un posible punto clave para los hospitales públicos pueden ser las fórmulas de concesión administrativa, como mecanismo que les permitan desarrollar estos servicios sin incrementar la deuda pública y estabilizar en un coste fijo la ratio por cápita de gasto, transfiriendo los riesgos económicos y de disponibilidad a los concesionarios bajo riesgo de penalización por fallos. Para los hospitales concertados, en cambio, este punto podría ser la creación de una alianza estratégica entre proveedores.

**Propuesta 8: Reordenar la medicina de tercer nivel y la oferta hospitalaria**

La medicina de tercer nivel concentra una parte importante de los recursos del SNS, no sólo en términos económicos (presupuesto), sino también a nivel de competencias profesionales (médicos, enfermeras) y tecnología. Aunque no existe una definición clara, ésta afecta:

- A los tratamientos de alta complejidad médica
- A los trasplantes
- A los equipamientos de alta tecnología
- A las unidades especializadas en enfermedades raras o poco prevalentes
- A las unidades de críticos muy especializadas (neonatos, quemados, etc.)

La regulación de dichas actividades (mayor o menor descentralización dentro de la oferta hospitalaria del SNS) supone un reto importante, pues tiene repercusiones:

- Económicas: una mayor dispersión de recursos de tercer nivel en hospitales universitarios y hospitales generales grandes supone un mayor presupuesto
- De accesibilidad: una mayor concentración puede suponer un riesgo de accesibilidad

La reordenación obliga a proponer una serie de medidas concretas:

- Definir niveles mínimos de actividad para determinadas patologías y equipamientos
- Reordenar la oferta de hospitales universitarios, separando el concepto de hospital terciario y hospital docente
- Realizar un mapa de hospitales por autonomía, que tienda a ajustar el tamaño de los centros (eficiencia) y la proporción de camas de agudos y sociosanitarios (necesidades)
- Definir y acreditar unidades de referencia, y su alcance en términos de población (comunidad, supracomunidad, nacional), y ajustar los recursos a dichos requerimientos (equipamientos, guardias, tecnología, etc.)

## ¿Y de la hematología y hemoterapia qué?

El dibujo de la atención hematológica en nuestro país, muy bien estudiado en el recientemente publicado por la SEHH *Libro Blanco de la Hematología*, se puede resumir en los siguientes tipos de centro:

- Grandes hospitales universitarios, con servicio de hematología y hemoterapia, en algunos de ellos, los menos, el servicio de hematología y hemoterapia está integrado y, aunque los miembros del servicio trabajen en áreas de conocimiento específico, existe un concepto identitario único. En otros hospitales universitarios el laboratorio se encuentra integrado en un *core lab* que desvincula el laboratorio del resto del servicio; en otros el área clínica se ha desvinculado del resto del servicio unificándose con áreas de oncología clínica; y en otros se ha desvinculado el servicio de transfusión. Las áreas de trombosis se pueden encontrar vinculadas a los laboratorios o al servicio de transfusión.
- Hospitales provinciales. En estos hospitales el servicio de hematología y hemoterapia suele estar integrado, formando un todo con una estructura unificada y sin fisuras.
- Hospitales comarcales. En el modelo clásico del antiguo INSALUD han podido mantener la estructura de los hospitales provinciales, entendiendo el servicio de hematología y hemoterapia como un todo indivisible. En otros, en cambio, el área de laboratorio depende jerárquicamente, y en ocasiones funcionalmente, de un jefe de servicio no especialista en hematología y hemoterapia.
- Nuevos hospitales. En los nuevos hospitales, ya sean de gestión pública o privada, predomina la disgregación de las distintas áreas, el laboratorio de hematología se integra en un *core lab*, que puede estar *in house* o en otro lugar distante y que suele disponer de un médico hematólogo responsable, pero que no es el del hospital. La gestión de la hemoterapia depende siempre, por ley, del médico hematólogo del hospital pero los técnicos o diplomados de Enfermería responsables son dependencia jerárquica del jefe de laboratorio o del área de enfermería. El área clínica, que suele incluir la trombosis y hemostasia, se encuentra vinculada a la medicina y/u oncología. En estos centros no suele existir la figura del jefe de servicio de hematología y hemoterapia, pero puede existir una jefatura de sección vinculada al laboratorio de análisis clínicos o al servicio de medicina interna que hace de interlocutor con la dirección médica en los aspectos que afectan a la hematología y hemoterapia.

En un entorno como el actual es difícil prever cuáles serán las tendencias organizativas en Sanidad.

Queda claro, tanto desde el punto de vista jurídico como administrativo y organizativo, que los hospitales públicos españoles han dado de sí más de lo que podía esperarse, pero su transformación resulta necesaria para que sean organizaciones eficientes y eficaces, lo que les permita abordar con garantías los nuevos retos.

Cualquier reforma de los hospitales públicos españoles debe ir encaminada a dotarles de una capacidad de gestión de la que ahora carecen y que debería sustentarse en los siguientes ejes:

- Gobernabilidad
- Autonomía de gestión
- Alianzas y creación de redes
- Integración entre niveles asistenciales
- Creación de procesos transversales
- Externalización de servicios

Las dos primeras dependen de cambios jurídicos que progresivamente se irán imponiendo y poco o nada se puede hacer desde el punto de vista de la hematología y hemoterapia.

En conclusión, el papel de los médicos hematólogos ha de ser relevante para poder crear:

- **Alianzas:** creación de redes. Las alianzas estratégicas permiten afrontar los rápidos y frecuentes cambios tecnológicos, compartir conocimiento o reducir el riesgo financiero. Las alianzas que fracasan suelen hacerlo en la mayoría de las ocasiones porque no han definido claramente los objetivos o no han tenido la capacidad de gestionar la relación entre las organizaciones implicadas. El desarrollo de una alianza puede concretarse, por ejemplo, en la creación de una red de centros, para lo que se tendrían que cumplir tres condiciones previas:
  - La decisión estratégica de impulsar o utilizar la alianza como una forma para desarrollar el hospital
  - La autonomía y capacidad de gestión contrastada de las instituciones implicadas
  - El compromiso y el acuerdo explícito entre las partes
- **Integración entre niveles asistenciales.** La falta de integración entre la primaria y la especializada es la gran asignatura pendiente de nuestro sistema. Diversos factores favorecen una mayor integración entre los distintos niveles asistenciales: la presión ejercida por los propios usuarios de los servicios asistenciales, el acceso generalizado a nuevas tecnologías de información que facilita la comunicación entre los niveles de atención y posibilita nuevas formas de relación entre ellos, las innovaciones diagnósticas y terapéuticas, que difuminan las fronteras tradicionales entre atención primaria y hospitalaria. No debe extrañar que las experiencias de éxito en integración de servicios

se den mayoritariamente en organizaciones con personalidad jurídica propia. Son procesos que han sido impulsados desde los hospitales, que asumen la gestión de áreas básicas de salud en su ámbito geográfico de influencia. Este proceso de integración de servicios impulsado desde los hospitales cabe interpretarlo también como la consecuencia del desarrollo de una mentalidad estratégica, derivada de su capacidad de gestión para abordar sus problemas organizativos, económicos y de cartera de servicios. Por tanto, la integración asistencial puede considerarse como una forma de respuesta estratégica de los hospitales involucrados para garantizarse un flujo regular de pacientes y, por consiguiente, económico en un entorno de incertidumbre.

- **Procesos transversales.** La estructura básica tradicional de los hospitales basada en los servicios clínicos no es suficiente por sí misma para garantizar la atención adecuada a las nuevas demandas. Los servicios clínicos se fundamentan en la ordenación del conocimiento médico, compartimentado en el ámbito de las especialidades. No obstante, la preponderancia de las patologías crónicas y la pluripatología de unos pacientes progresivamente de más edad requieren de la intervención simultánea de más de un especialista. En hematología y hemoterapia el ejemplo paradigmático serían las unidades de enfermedad tromboembólica.
- **Externalización de servicios.** La capacidad de gestión de los hospitales debe permitir que algunos de los servicios los preste una organización ajena al mismo. Esta externalización de servicios pretende aprovecharse del mayor grado de experiencia de la organización contratada, Las preguntas son: ¿Un servicio de hematología y hemoterapia tal como lo entendemos puede dar servicios a otra institución? ¿Estamos preparados para ser profesionales que ofrezcan servicios a otras instituciones?
- **Trabajar en mHealth,** definida como la prestación de servicios sanitarios o de información relativa a la salud a distancia a través de dispositivos móviles.

La *mHealth* será importante para:

- Los **pacientes:** mayor acceso a su médico/provisor, mejor control de su salud...
- Los **médicos y provisosores:** mejora de la calidad asistencial, mejora de la eficiencia, mejor manejo de los pacientes con enfermedades crónicas...
- Las **aseguradoras:** reducción de costes de la asistencia, promoción de hábitos de vida saludables, diferenciación del producto respecto a la competencia...

- La **industria farmacéutica:** oferta de estrategias de adherencia al tratamiento, mejora de las relaciones con los pacientes...
- Los **proveedores de tecnologías sanitarias:** un negocio de gran volumen y rápido crecimiento
- **Utilizar la medicina personalizada,** definida como aquellos productos y servicios que permiten aplicar, de manera directa o indirecta, los conocimientos derivados de los avances en genómica y proteómica, permitiendo el diseño de estrategias “a medida” en términos de prevención y tratamiento.

## Bibliografía

- Catálogo Nacional de Hospitales 2011. Actualización diciembre 2012. Ministerio de Sanidad Política Social e Igualdad.
- Sistema Nacional de Salud. España 2010. Ministerio de Sanidad Política Social e Igualdad.
- Modelo de desarrollo de centros hospitalarios: tendencias y propuestas. Óscar Moracho del Río. Laboratorio de alternativas. Fundación alternativas 2008. ISBN: 978-84-92424-38-2.
- Nuevas fórmulas de gestión en el ámbito sanitario. José Jesús Martín Martín. [www.fgcasal.org/aes/docs/Jose\\_Martin.pdf](http://www.fgcasal.org/aes/docs/Jose_Martin.pdf)
- Otra gestión sanitaria es posible. Observatorio de políticas de salud. Fundación primero de mayo. Abril 2011. ISBN 978-84-87527-17-3.
- Peiro M. Sanidad, el nuevo concepto de hospital y la red de centros: nuevos retos sanitarios para una economía deficitaria. Haematologica edición española 2008; 93: 224-228.
- Vázquez Navarrete ML, Vargas Lorenzo I, Farre Calpe J, et al. Organizaciones sanitarias integradas: una Guía para el análisis. Rev Esp Salud Pública 2005; 79: 663-643.
- Francesc Cots. La sostenibilidad del sistema hospitalario en Catalunya: el balance de una década. Gac San 2004; 18: 64-67.
- Coordinadores A Pereira, JA Garcia Erce. Presente y futuro de la hemoterapia hospitalaria. Haematologia 2011; 96: 75-88. El modelo español: servicio de transfusión/centro de transfusión. N Carpio. Peculiaridades del modelo catalán. RP Pla. El modelo de integración en el servicio de hematología. V Vicente, J Rivera, A Cascales; F Ferrer, ML Lozano.
- García-Altés A, Dalmau-Bueno A, Colls C. Análisis del desempeño de los servicios sanitarios de Cataluña: evaluación de los primeros resultados del proyecto demostrativo. Gac Sanit 2009; 23(5): 465-472.
- Gonzalo San Segundo. Chequeo a los hospitales públicos con gestión privada. MEDICAL ECONOMICS | Edición Española | 13 de abril de 2007: 18-31. [www.medecoes.com](http://www.medecoes.com)
- Marcos Vera Hernández. Evaluación de políticas públicas: University College London Institute for Fiscal Studies. <http://homepages.ucl.ac.uk/~uctpamv>
- Sergi Jiménez-Martínez, Amalia Viola. El sistema sanitario español: síntomas de una reforma anunciada. El médico, 1135: 12-16, sept 2012.
- José María Martín Patino, Agustín Blanco, Antonio Chueca, Giovanna Bombarderi, Teresa Herreros, Beatriz Manzaneros. Informe España 2012. Una interpretación de su realidad social. CECS. Fundación encuentro. ISBN: 978-84-89019-39-3.
- Joan Josep Artells, Salvador Peiro, Ricard Meneu, Joan Carles Serrat. Visión de la crisis de la sanidad en España: análisis prospectivo Delphi. Fundación salud innovación y sociedad. [www.fundis.org](http://www.fundis.org)
- Liderazgo positivo: hacia una cultura de comportamientos de alto rendimiento. Francisco Puertas. Tal Ben Shajar. HARward Deusto Busines Review. Marzo 2012. Referencia 3926.

Vicente Gil, Joan Barrubés, Joan Carles Álvarez, Eduard Portela.  
Sostenibilidad financiera del sistema sanitario. 10 medidas  
estructurales para afrontar el crecimiento del gasto. Antares  
Consulting, SA. [www.atares-consulting.com](http://www.atares-consulting.com)  
Roberto Nuño Solini. Buenas prácticas de gestión sanitaria: el ca-  
so de Kaiser permanente. *Rev Adm Sanit* 2007; 5 (2): 283-92.

Ignacio Riesgo, Manuel Carrasco, Marta Salinas, Celeste Iong.  
Diez temas candentes de la Sanidad Española para 2013. Pa-  
ra que la crisis económica no se transforme en una crisis de  
salud pública. PriceWaterhose Coopers. [www.pwc.es](http://www.pwc.es)  
Carmen Delia Davila Quintana, Beatriz González López-Valcárcel.  
Crisis económica y salud. *Gac Sanit* 2009; 23 (4): 261-265.

## El hospital innovador

LLUIS BLANCH TORRA

*Investigación e Innovación. Corporación Sanitaria y Universitaria Parc Taulí. Sabadell (Barcelona)*

A menudo vemos en los medios noticias relacionadas con descubrimientos científicos que llevarán, a medio o largo plazo, a mejoras en el tratamiento de las enfermedades en forma de nuevos procedimientos o avances tecnológicos en el diagnóstico y cuidado del paciente. Y es lógico pensar que la sociedad en algún momento podrá beneficiarse de ellos, ya que nadie está libre de caer enfermo durante su existencia.

La investigación es consustancial a la atención a los pacientes. El acto de diagnosticar y tratar una enfermedad va en paralelo a su estudio, a la formación y docencia que van asociadas y también al cuestionamiento sobre los mecanismos que la provocan o por qué afecta a unas y no a otras personas o cómo podemos incidir en su pronóstico. Por tanto, la labor de los profesionales de la salud conlleva no sólo curar o aliviar la enfermedad, sino también mejorar, descubrir y enseñar. La investigación, tanto para los pacientes como para los profesionales, instituciones y sociedad, se traduce en una mejor asistencia, mayor motivación, satisfacción y, en definitiva, retorno a la propia sociedad. Sin embargo, también debe significar riqueza y retorno tangible, tanto en el futuro inmediato (profesionales e instituciones) como a medio plazo (captación de talento, descubrimientos, patentes y desarrollo empresarial propio). Y es por todo ello por lo que es necesario introducir el concepto de innovación en el ámbito de la salud y no tener miedo a su aplicación.

Tradicionalmente la investigación se ha hecho en dos entornos: universidad e industria. La universidad desarrolla una investigación basada en el conocimiento en beneficio del propio conocimiento, donde la revelación abierta y la libertad académica son habituales. La industria gestiona el conocimiento para obtener beneficios y, por tanto, se mueve en un entorno de confidencialidad y revelación pública limitadas. En este esquema tradicional, instituciones como los hospitales o centros de salud, que tienen un capital humano altamente cualificado y un poder económico muy grande –a pesar de ser públicos– están poco

representados. Por lo tanto, hablamos de un cambio de paradigma: hospitales como garantes del conocimiento y de la mejora de la salud de nuestra sociedad pero, a la vez, con visión empresarial para proteger los proyectos de investigación que tengan un carácter innovador. No estamos hablando de no revelar o ralentizar el proceso de llegada de un avance que puede mejorar la salud, sino de proteger antes de revelar y, por tanto, garantizar que el retorno económico permanezca y repercuta en toda la sociedad.

Investigación e innovación comparten los principios básicos de cualquier proyecto de investigación: a partir de unos conocimientos se plantea una hipótesis, luego se describen los objetivos para demostrar, o no, si esta hipótesis se cumple y, finalmente, se diseña el estudio con todas las garantías científicas y éticas. Un proyecto de innovación en el campo de la salud debe cumplir todos estos principios, pero si además es susceptible de producir un resultado que puede interesar en el mercado, se ha de proteger la propiedad intelectual del investigador y la institución, así como los derechos futuros de su explotación. Una vez protegido, será el momento de revelarlo científicamente en congresos, publicaciones, etc., ya que nosotros, como investigadores, tenemos el deber de diseminarlo a la sociedad científica. Los resultados de la investigación pueden ser susceptibles de ser protegidos, o no, a partir de su grado de novedad y, por tanto, de su capacidad de interés para el mercado. Los profesionales de la salud valoramos mucho esta transversalidad de la investigación. Si revelamos sin proteger algo transferible al mercado, tendremos un buen papel y un merecido retorno en forma de prestigio científico, que no es nada despreciable. Sin embargo, si protegemos el resultado de nuestra investigación, su desarrollo es satisfactorio y éste llega al mercado, aseguramos igualmente el reconocimiento científico y añadimos retorno económico que, como sociedad, necesitamos para ser competitivos y alcanzar un buen desarrollo económico. Por lo tanto, tenemos por delante un camino a recorrer: introducir los conceptos de investigación e innovación



de forma asociada y no como hechos independientes o, incluso, organizativamente independientes dentro de las instituciones.

Los centros de salud y los hospitales se convierten en excelentes territorios para la innovación. Innovar no sólo es desarrollar una nueva tecnología o una molécula, es también innovar en servicios, en organización y en cuestiones de carácter social y cultural. En todos estos ámbitos trabajan profesionales que en su día a día deben tomar decisiones sobre aspectos muy diversos ya que tratan con los enfermos, se enfrentan directamente a los problemas cotidianos y tienen ideas para encontrar soluciones. Sin embargo, pocas veces se les pregunta cuáles son estas ideas nuevas para hacer mejor lo que hacen o bien qué problemas tienen, a fin de encontrar una solución. La innovación es poco jerárquica y se implementa de abajo a arriba, muy diferente a como están organizados nuestros hospitales y universidades. Nuestras instituciones ya tienen profesionales que participan y son líderes en proyectos de investigación e innovación, pero lo que tenemos que conseguir es introducir la cultura de la innovación a todos los niveles de una organización. En otras palabras, de tener hospitales donde grupos aislados hacen innovación, debemos alcanzar hospitales innovadores en todos los aspectos, donde esta cultura sea transversal a toda la organización.

El país está bien posicionado en los diferentes *rankings* de producción científica y, más concretamente, en publicaciones relacionadas con ciencias de la salud. Este hecho nos da prestigio y reconoce el esfuerzo de muchos profesionales a lo largo de las últimas décadas. Gracias a este esfuerzo tenemos uno de los mejores modelos de atención sanitaria del mundo. Pero cuando examinamos comparativamente nuestras universidades frente a las mejores del mundo, estamos lejos. Es obvio que un factor claro de mejora es la colaboración entre el conocimiento, la Universidad, la Administración y la empresa, y que ésta es fundamental para llevar a cabo innovación. Y todo esto funciona cuando el modelo es abierto, colaborativo, liberal y rigurosamente evaluado, en definitiva, lejos de nuestra realidad actual. Medios científicos de mucho prestigio, como la Confederación de Sociedades Científicas de España (COSCE) o internacionales,

como la revista *Nature*, han criticado duramente el decremento sufrido en la inversión en innovación y desarrollo que se ha producido a partir del año 2008. Y este decremento se ha producido cuando peor es nuestra posición en los *rankings* mundiales de patentes concedidas y de exportaciones de productos de alta tecnología. Sin cambiar el modelo, con pocos recursos y sin apoyo a la emprendeduría, esto no puede hacer más que seguir empeorando.

Por lo tanto, ¿qué hay que hacer en este contexto? En primer lugar, considerar los hospitales como agentes de desarrollo económico con capacidad de retorno y con un efecto multiplicador con resultado final de aumento de ingresos. Los hospitales tienen una capacidad muy buena de generar portafolios de proyectos de éxito y de colaboración con empresas de muchos sectores, no sólo el sector salud, y desarrollar conjuntamente empresas (*spin off, start up*), licenciar explotación de conocimiento o bien acuerdos de codesarrollo.

---

## Conclusión

En conclusión, debemos buscar rendimiento económico en lo que hasta ahora nos daba rendimiento social y progreso científico. En un entorno inestable como el actual, necesitaremos retorno económico para seguir avanzando científicamente. Y todo esto se puede hacer, ya que tenemos buenos profesionales; debemos trabajar para recuperar el espíritu emprendedor, pero se necesita un poco de todo lo siguiente: la implicación convencida y decidida de la Administración, pactos universidad / hospital con empresas que promuevan innovación y progreso, la colaboración del sector empresarial con modelos público-privados muy bien definidos –considerando siempre la internacionalización– y una cultura de evaluación mucho más rigurosa que la actual.

Un reputado científico catalán tiene la siguiente frase de Charles Darwin en una hoja de papel colgado en la pared de su despacho: "Quienes sobrevivirán no serán los más fuertes, ni los más inteligentes, sino aquellos con capacidad de reaccionar al cambio. No estamos ante nada nuevo, pero aún tenemos mucho por aprender."

## La troncalidad en la formación MIR de Hematología: retos y oportunidades. Informe de la Comisión Nacional

ADRIÁN ALEGRE

*Jefe del Servicio de Hematología. Hospital Universitario de La Princesa. Madrid  
Presidente de la Comisión Nacional de Hematología y Hemoterapia*

### Introducción: el sistema MIR. La formación en Hematología y Hemoterapia

El sistema de formación especializada MIR viene regulado desde el año 1979, fecha en la que se constituyó el primer Consejo Nacional de Especialidades Médicas. Este hecho supuso un cambio profundo en la formación de especialistas médicos en España, pues se trataba de una regulación formal y una ordenación de la actividad formativa. El examen único nacional MIR para la elección de especialidad y la vinculación laboral de los posgraduados a un centro acreditado docente en el que el aprendizaje se basaba en la adquisición de conocimientos teóricos y habilidades prácticas han sido la base de este sistema. Los resultados obtenidos con los programas MIR son evidentes. Desde sus inicios la formación MIR fue un sistema muy aceptado y con gran reconocimiento a escala internacional. En nuestra opinión, es una de las principales claves de la calidad profesional de los especialistas médicos españoles y del Sistema Nacional de Salud. La situación profesional de los MIR viene regulada por el Real Decreto 1146/2006, de 6 de octubre, por el que se regula la relación laboral especial de residencia para la formación de especialistas en Ciencias de la Salud. La especialidad de Hematología y Hemoterapia viene así definida en el Real Decreto 183/2008, de 8 de febrero, por el que se determinan y clasifican las Especialidades en Ciencias de la Salud y se desarrollan determinados aspectos del sistema de formación sanitaria especializada. Es una especialidad a la que sólo se puede acceder desde la licenciatura de Medicina y Cirugía. Los contenidos formativos, las acreditaciones de centros, homologación y la asesoría sobre la convocatoria de plazas están supervisados por la Comisión Nacional de la Especialidad.

Desde el año 2003 el Consejo de Especialidades Médicas pasó a denominarse Consejo Nacional de Especialidades en Ciencias de la Salud (CNECS). En este Consejo se integran las Comisiones Nacionales de la Especialidad, entre las que se encuentra la

Comisión Nacional de Hematología y Hemoterapia (CNHH). La principal función de esta Comisión es la elaboración y aprobación del Programa Formativo de la especialidad así como la aprobación de los centros docentes acreditados. El programa vigente en la actualidad es el que fue oficialmente publicado en el BOE de 21 de octubre de 2006 y que fue elaborado por la CNHH. En esa fecha ya se solicitó por parte de la CNHH el incremento de la duración del programa a 5 años para dar cabida al aumento de conocimientos, técnicas y complejidad de nuestra especialidad. Tras más de tres décadas de formación MIR la administración consideró revisar el sistema MIR introduciendo el concepto de troncalidad de forma similar a otros países. Presentaremos en esta ponencia de forma general la situación de este nuevo modelo y las implicaciones, retos y oportunidades que puede suponer para nuestra especialidad incluyendo las alegaciones al último borrador publicado de la normativa de troncalidad. Resumiremos también la evolución de las plazas MIR de Hematología y Hemoterapia en estos 35 años y presentaremos un resumen de los Programas Formativos de la especialidad.

### Troncalidad en la formación médica. Retos y oportunidades

Desde la publicación en el año 2003 de la Ley 44/2003 de 21 de noviembre de Ordenación de las Profesiones Sanitarias (LOPS), se viene trabajando en un nuevo modelo de formación MIR basado en la Agrupación de las Especialidades Sanitarias en Áreas Troncales. Esta ley establece, en su artículo 19, Punto 1, lo siguiente: "Las Especialidades en Ciencias de la Salud se agruparán, atendiendo a criterios de troncalidad. Las especialidades de un mismo tronco tendrán un periodo de formación común de una duración mínima de dos años", y en su punto 3 indica: "El Gobierno, al establecer los títulos de Especialista en Ciencias de la Salud, determinará el título o títulos necesarios para acceder a cada una de las espe-

cialidades, así como el tronco en el que, en su caso, se integren".

Para trabajar en este objetivo se creó un Grupo de Troncalidad en el Ministerio de Sanidad. Como muestra de la enorme dificultad que conlleva el cambiar un sistema tan arraigado como es el sistema MIR actual baste decir que han transcurrido más de 10 años y la normativa final del nuevo modelo de troncalidad aún no está desarrollada ni el sistema está implantado.

Con fecha 5 de julio de 2013 se ha publicado el borrador del Real Decreto de Troncalidad, que incluye el desarrollo casi final de esta norma. El contenido completo está accesible en la página web de la SEHH ([www.sehh.com](http://www.sehh.com)). Este borrador incluye varias modificaciones respecto al anterior, como es la limitación de la reespecialización, la posible variabilidad de la duración del periodo troncal, la posible modificación del ejercicio previo para obtener un ACE (Área de Capacitación Específica), entre otros cambios. La fecha prevista de publicación de este Real Decreto es el primer semestre de 2014, no estando definida la convocatoria MIR con este sistema, pendiente de la adaptación y acreditación de las unidades docentes.

Respecto a nuestra especialidad, por motivos que se definieron en un documento de consenso elaborado por parte de las tres sociedades científicas Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH), Sociedad Española de Transfusión Sanguínea (SETS) y Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia (SETH) junto con la CNHH, se decidió nuestra inclusión en el Tronco Médico, preservando su parte procedimental de laboratorio con sus competencias específicas y exigiendo la ampliación del programa a 5 años. Este documento de consenso está ubicado en la web de la SEHH y en el recientemente publicado *Libro Blanco de la Hematología en España*, por lo que no entraremos en más detalles. Resumiremos varios aspectos del modelo de troncalidad.

Este sistema pretende ofrecer nuevas oportunidades a un sistema que puede considerarse algo rígido y que impide las transferencias entre diversas especialidades con contenidos afines. Entre estas oportunidades destacarían las siguientes:

- Diversificar la formación, ampliarla y favorecer el aprendizaje de la resolución de los problemas desde diferentes perspectivas.
- Mejorar la continuidad de la atención y la coordinación externa e interna en los diferentes ámbitos sanitarios.
- Mejorar las perspectivas del desarrollo profesional.
- Favorecer la coalición y el trabajo en equipo evitando el conflicto de competencias.
- Proporcionar una formación más orientada a la atención integral del paciente que a la enfermedad.
- Favorecer la formación multidisciplinar.

- Favorecer la adaptación del especialista a diferentes entornos asistenciales y sociales y al conocimiento científico-técnico.
  - Permitir la flexibilización del sistema formativo.
- Por tanto, los objetivos principales del nuevo modelo de troncalidad podrían resumirse en los siguientes:
- Fortalecer el aprendizaje de la resolución de los problemas clínicos desde diferentes perspectivas y desde distintos niveles asistenciales.
  - Mejorar la competencia final de los especialistas, favoreciendo el proceso de formación especializada de forma equilibrada entre los conocimientos específicos y los comunes.
  - Favorecer la continuidad asistencial en el itinerario del paciente y la coordinación externa e interna en los diferentes equipos sanitarios.
  - Favorecer la elasticidad de la oferta profesional.
  - Favorecer el desarrollo profesional.
  - Favorecer una organización asistencial acorde con las nuevas técnicas y procedimientos asistenciales.

Este nuevo modelo no está exento de críticas y ha suscitado un gran debate en los últimos años siendo muchos los escépticos que entienden que un sistema que ha sido eficaz durante muchos años se puede revisar, modificar y adaptar pero opinan que un cambio radical del modelo MIR actual ha de hacerse con gran consenso entre todos los agentes implicados, con una definición clara y con medios suficientes. Los principales obstáculos para desarrollar el nuevo modelo de troncalidad se podrían resumir en los siguientes:

- Dificultades logísticas
- Evaluación del coste presupuestario que conllevaría el nuevo sistema
- Carencia de evaluaciones globales del sistema actual y del sistema a implantar
- Complejidad organizativa en las unidades docentes acreditadas
- Complejidad de los procesos de acreditación
- Compartimentos estancos de la formación
- Necesidad de prolongación de la duración de los programas por el incremento de competencias y/o progreso científico-tecnológico
- Resistencia al cambio
- Mapas competenciales heterogéneos

Por otra parte, no todas las especialidades son susceptibles de ser agrupadas en troncos, y la delimitación clásica de especialidades médicas, quirúrgicas y procedimentales no es un criterio suficiente de agrupación, debiendo confeccionarse siempre con una orientación medicalizada.

A pesar de estas dificultades, el Grupo de Troncalidad del Ministerio de Sanidad ha seguido desarrollando el proyecto y se han presentado dos borradores de normativa, que están publicados en la web de la SEHH.

En las especialidades troncales existiría un examen MIR nacional único pero el MIR no elegiría plaza tras

**Tabla 1. Especialidades que integran el sistema formativo troncal**

Tronco médico (TCM)	Tronco quirúrgico (TCQ)	Tronco de Laboratorio y Diagnóstico Clínico (TCLDC)	Tronco de Imagen Clínica (TCIC)	Tronco de Psiquiatría (TP)
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Alergología</li> <li>· Anestesiología y Reanimación</li> <li>· Aparato Digestivo</li> <li>· Cardiología</li> <li>· Endocrinología y Nutrición</li> <li>· Farmacología Clínica</li> <li>· Geriátrica</li> <li>· Hematología y Hemoterapia</li> <li>· Medicina del Trabajo</li> <li>· Medicina Familiar y Comunitaria</li> <li>· Medicina Física y Rehabilitación</li> <li>· Medicina Intensiva</li> <li>· Medicina Interna</li> <li>· Medicina Preventiva y Salud Pública</li> <li>· Nefrología</li> <li>· Neumología</li> <li>· Neurofisiología Clínica</li> <li>· Neurología</li> <li>· Oncología Médica</li> <li>· Oncología Radioterápica</li> <li>· Reumatología</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Angiología y Cirugía Vascular</li> <li>· Cirugía Cardiovascular</li> <li>· Cirugía General y del Aparato Digestivo</li> <li>· Cirugía Oral y Maxilofacial</li> <li>· Cirugía Ortopédica y Traumatología</li> <li>· Cirugía Pediátrica</li> <li>· Cirugía Plástica, Estética y Reparadora</li> <li>· Cirugía Torácica</li> <li>· Neurocirugía</li> <li>· Urología</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Análisis Clínicos y Bioquímica Clínica</li> <li>· Genética Clínica</li> <li>· Inmunología</li> <li>· Microbiología y Parasitología</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Medicina Nuclear</li> <li>· Radiodiagnóstico</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Psiquiatría</li> <li>· Psiquiatría del Niño y del Adolescente</li> </ul>

*Nota: Especialidades que no se adscriben en principio al sistema formativo troncal: Anatomía Patológica, Dermatología, Obstetricia y Ginecología, Oftalmología, Otorrinolaringología, Pediatría, Radiofarmacia y Radiofísica*

*Fuente: Borrador del Real Decreto de Troncalidad. 05-07-2013*

dicho examen sino que elegiría tronco, existiendo un periodo de 2 años con formación troncal transversal de contenidos comunes. Se crearían las Unidades Docentes Troncales (UDT), que desarrollarían y controlarían cumplimiento de los contenidos formativos troncales. Tras estos 2 años, tras superar una evaluación intermedia troncal, se elegiría una especialidad sólo dentro del tronco elegido en el mismo centro u otro centro. Esta elección estaría basada en el número del examen nacional MIR precedente. Las especialidades que integran los diferentes troncos se resumen en la [Tabla 1](#). Un resumen del modelo de elección de especialidad en el sistema de troncalidad se refleja en la [Figura 1](#).

Presentamos a continuación las alegaciones de la CNHH al último borrador publicado.

### **Alegaciones de la Comisión Nacional de Hematología al último Decreto de Troncalidad**

Con fecha 19 de diciembre de 2012 se remitió a la Comisión Nacional de Hematología y Hemoterapia el Proyecto de Real Decreto (fechado a 11 de diciembre de 2012) sobre el nuevo modelo de Troncalidad en la Formación de Especialistas Médicos, publicado por parte de la Secretaría del Consejo Nacional de Es-

pecialidades, Subdirección General de Ordenación Profesional del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Con dicha fecha se comunicó a la Comisión que se iniciaba el trámite de audiencia para presentar las alegaciones correspondientes ante dicha Secretaría finalizando el plazo el 20 de enero de 2013. Se trataba de la segunda versión de un Real Decreto en esta materia. Para la primera versión, publicada en julio de 2011, ya se presentaron unas alegaciones mediante registro oficial con fecha 16 de septiembre de 2011 por parte esta Comisión.

Al suponer un cambio sustancial en la formación de los futuros especialistas de Hematología y Hemoterapia, la Comisión Nacional de la Especialidad revisó este nuevo documento con detalle y mantuvo la comunicación con los presidentes de la SEHH, la SETH y la SETS, así como con los responsables de los Servicios de varios centros acreditados, sus tutores y otros agentes con amplia experiencia en la formación MIR de la especialidad. El texto del proyecto fue revisado a fondo para evaluar su potencial impacto en el futuro de la especialidad tanto en sus aspectos formativos como profesionales.

Se encontraron algunos aspectos que pueden suponer una pérdida en el nivel mínimo exigido para la

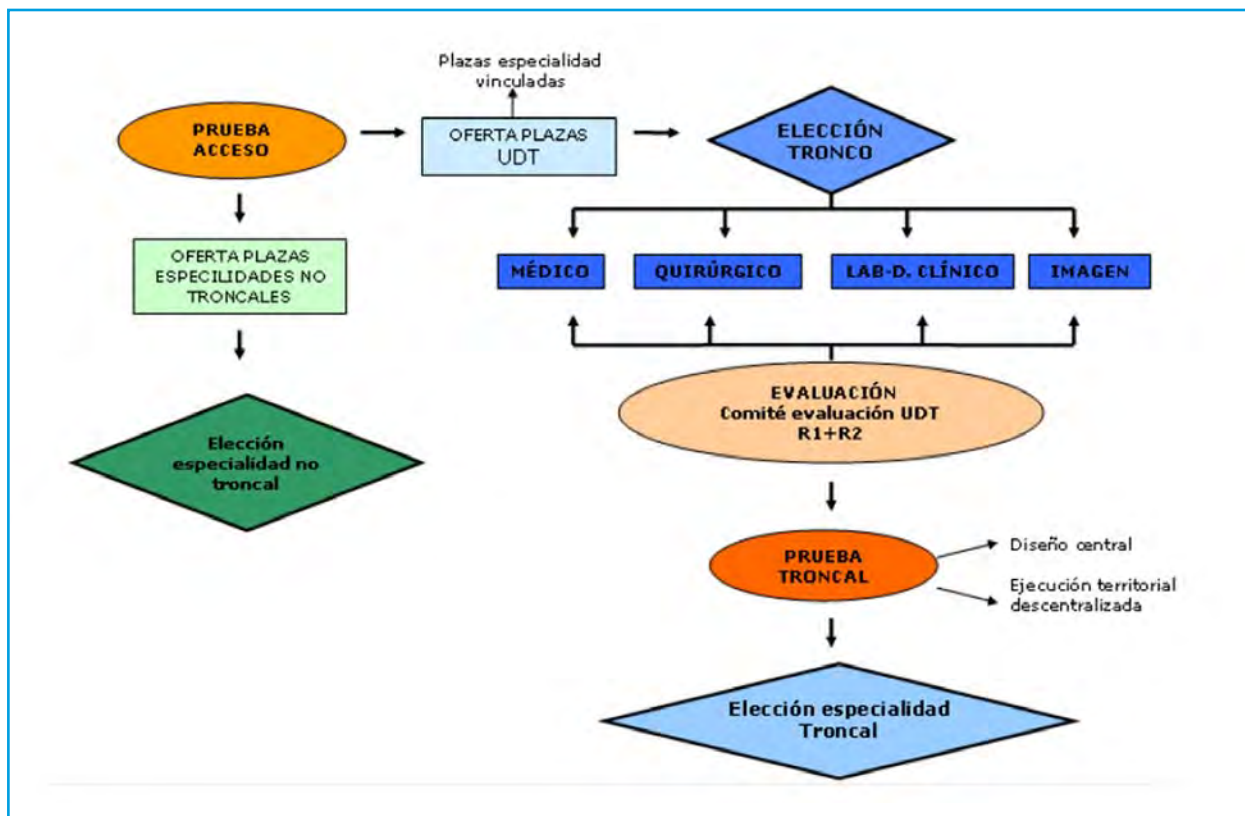


Figura 1. Esquema preliminar de Sistema Troncal de Elección de Especialidad Médica. UDT: Unidad Docente Troncal.

formación de los futuros especialistas de Hematología y Hemoterapia. Por este motivo, se presentó por parte de la Comisión Nacional en los plazos previstos un escrito con las alegaciones que se resumen a continuación.

### Consideraciones generales

1. La Especialidad de Hematología y Hemoterapia tiene una gran vertiente clínica como rama de la Medicina Interna, pero además tiene una serie de competencias específicas y exclusivas procedimentales que incluyen también el laboratorio de Hematología y de Hemostasia y Trombosis, junto con la Medicina Transfusional. Por este motivo es muy importante delimitar con precisión en el programa formativo de nuestra especialidad las competencias en las que pueda existir confusión o injerencia con el resto de especialidades y/o troncos, especialmente con el Tronco de Laboratorio y Diagnóstico Clínico.
2. Dadas las características de la especialidad de Hematología y Hemoterapia, con un nacimiento, desarrollo y razón de ser vinculados de forma inseparable desde hace más de 60 años al área de Diagnóstico y a la Clínica en todo el mundo, la Comisión Nacional expresó en su momento sus reservas respecto a la idoneidad de su troncali-

zación radical en un área concreta. Sin embargo, considerando la importancia de adquirir una adecuada formación clínica, finalmente se aceptó su integración en el Tronco Médico, puesto que su actividad predominante es la asistencial médica con el paciente como eje principal. Esta elección en ningún momento significó dejar en un segundo plano o relegar la parte de laboratorio, que constituye un elemento también cardinal y diferenciador de la especialidad de Hematología-Hemoterapia.

3. Tal como hemos señalado, las competencias propias y exclusivas postroncales del periodo específico de formación especializada de la Hematología y Hemoterapia se pueden resumir en las siguientes áreas:

- Área de Hematología Clínica
- Área de Citomorfología, Diagnóstico Biológico de Hemopatías y Eritropatología (Laboratorio de Diagnóstico y Clínica)
- Área de Hemostasia y Trombosis ( Laboratorio de Diagnóstico y Clínica)
- Área de Hemoterapia-Banco de Sangre, Medicina Transfusional e Inmunohematología
- Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos y Terapia Celular

Los futuros especialistas en Hematología y Hemoterapia deben recibir, de forma imprescindible, una

formación adecuada y completa en todos los contenidos en Servicios de Hematología y Hemoterapia acreditados.

### Resumen de las principales alegaciones formuladas

1. Debido al contenido actual de la Hematología y Hemoterapia y dada la complejidad y extensión de las competencias específicas a adquirir por los futuros especialistas, es imprescindible, tras cumplir el periodo de formación troncal de dos años, la ampliación a tres años como mínimo del periodo formativo post-troncal (periodo de formación especializada), lo que supone disponer de un periodo completo de al menos 5 años. Este requisito se considera irrenunciable para participar en el nuevo sistema de troncalidad y para garantizar la formación adecuada, pues resultará imposible elaborar y llevar a cabo el programa específico en un periodo de dos años posttroncales. La ampliación a 5 años mínimos de formación en Hematología y Hemoterapia es imprescindible para adaptarse a los mínimos que exige el Currículum Europeo. El Decreto ha de pronunciarse de una forma clara sobre la necesidad ineludible de ampliación de la duración del Programa Formativo de la Especialidad.
2. El examen y el método de acceso a la especialización médica deben clarificarse. Se ha de mantener el actual sistema de acceso para los médicos mediante el examen MIR, que ha de ser nacional, simultáneo y único; y con preguntas objetivas de tipo test cuyo resultado servirá para la elección del tronco y la especialidad. En estas preguntas se pueden incluir cuestiones objetivas que valoren habilidades clínicas, comunicativas y actitudes. Debe evitarse la introducción de nuevos métodos, con pruebas subjetivas no validables, que pueden distorsionar la evaluación correcta y justa de los candidatos.
3. Debido a las dificultades de puestos laborales para los futuros MIR españoles, no se debe reservar cupo para médicos extracomunitarios, salvo que en un análisis de las necesidades reales de los especialistas se objetive una carencia de licenciados españoles. Por este motivo la cifra del 10% que figura en este RD debería suprimirse.
4. Se ha de tener en cuenta el informe de la Comisión Nacional de Hematología para fijar la oferta de plazas anuales que se incluyan en cada convocatoria. La aceptación de todas las plazas presupuestadas por las CC. AA. puede originar una situación excedentaria con problemas de desempleo, como ya está ocurriendo.
5. No se debería realizar ninguna convocatoria de examen MIR con el nuevo modelo hasta que no se elaboren los nuevos Programas Formativos Troncales y Específicos en los que se defina con claridad su contenido y duración. Las comisiones han de conocer los programas de los otros troncos para evitar confusión o injerencia en contenidos específicos posteriores. A la hora de elegir tronco y especialidad, los futuros MIR deben poder conocer con detalle los programas específicos de la especialidad.
6. El acceso a la especialidad de Hematología y Hemoterapia se realiza sólo a través de la licenciatura de Medicina, como figura en el BOE de 2008 que define las especialidades en Ciencias de la Salud. Las ACE relacionadas con la especialidad han de desarrollarse sólo para los especialistas de Hematología y Hemoterapia y así debería recogerse.
7. En cuanto a la reespecialización, se ha de indicar la necesidad de haber realizado la formación específica completa para garantizar la preparación adecuada acorde con el programa oficial.
8. No ha de permitirse que en el periodo de formación específica los tutores modifiquen o adecúen el programa formativo oficial de la especialidad, aprobado por la Comisión Nacional.
9. Se demanda la posibilidad de que los especialistas de Hematología y Hemoterapia, tras su formación troncal médica, tengan la opción de acceder al ACE de Urgencias y Emergencias.
10. Los hematólogos con experiencia profesional acreditada de forma amplia en un laboratorio de Genética deben poder acceder de forma regulada a la nueva especialidad de Genética Clínica. Se ha de permitir a los Servicios de Hematología y Hemoterapia, con acreditada experiencia en Genética, el poder participar en la formación de los futuros especialistas de Genética Clínica.
11. En los informes a solicitar por la Secretaría General Técnica referentes a la ampliación del trámite de audiencia de los presidentes de las sociedades científicas relacionadas con las nuevas especialidades reguladas en este RD se ha de incluir a la SEHH, debido a la importante implicación y vinculación de la Hematología en la Genética Clínica.

### Evolución de las plazas MIR de Hematología y Hemoterapia

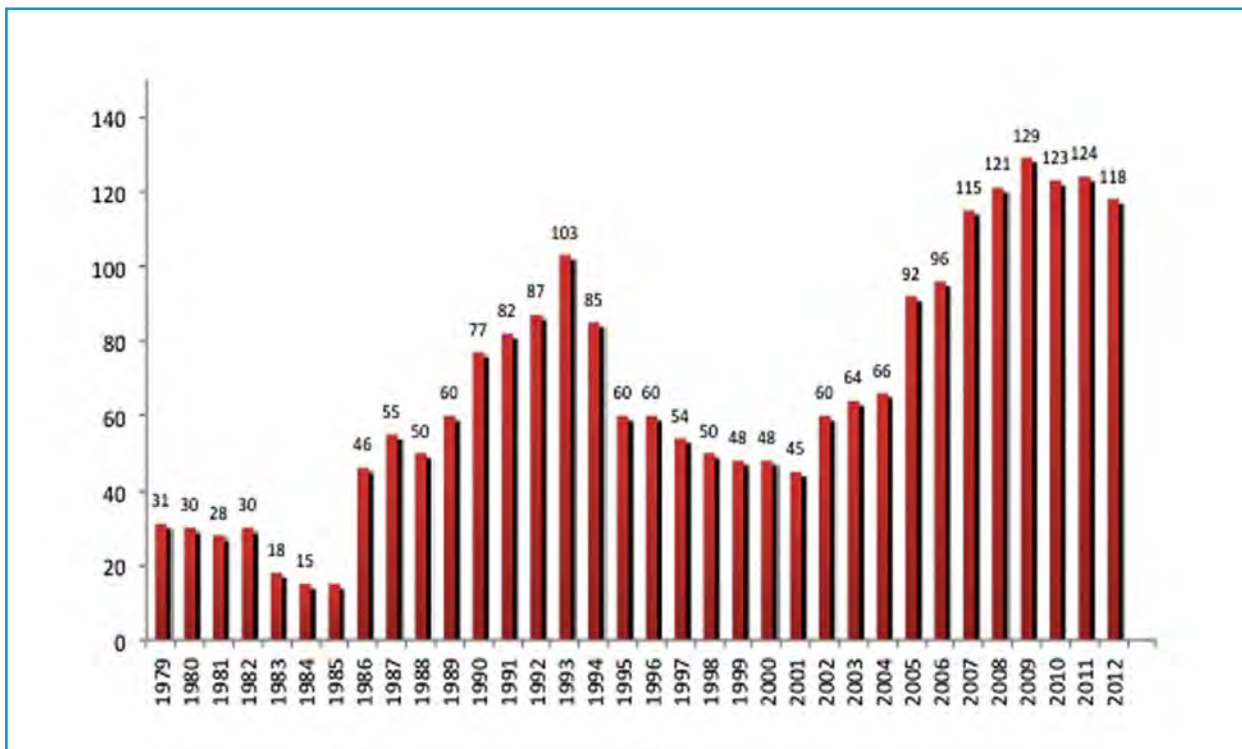
En la actualidad existen 131 plazas acreditadas en 76 centros hospitalarios diferentes (Tabla 2). Las plazas adjudicadas a lo largo de los años de existencia del sistema MIR se reflejan en la Tabla 3. Respecto a la elección de la especialidad, aunque ha mejorado en el último año, sigue estando en una mediana de orden elevada, algo que no ocurría en los primeros años del sistema MIR. Esta situación tiene muchas lectu-

ras, pues afecta a muchas especialidades médicas por igual debido a las preferencias cambiantes de los licenciados, principalmente por las dificultades de expectativas laborales y en parte también por la falta de atractivo y el desconocimiento general de la especialidad (Tabla 4). Para mejorar esta situación es preciso continuar divulgando el potencial y la relevancia asistencial de nuestras funciones. En la misma Tabla 2 se refleja el elevado porcentaje de médicos extracomunitarios que eligen nuestra especialidad, hecho que precisará de un análisis detallado respecto a su impacto laboral en nuestro país, pues supone entre el 25% y 40% del total. La cifra de plazas convocadas ha sido creciente en los últimos años. Las diferentes CNHH han tratado de adaptarse a las necesidades futuras de especialistas, con la complejidad que

esto conlleva debido a la ausencia de registros y estudios precisos, incluyendo la incertidumbre laboral y el impacto del cupo de médicos extracomunitarios, que por la situación actual regresan a sus países. En este sentido, debido al incremento poblacional, con apertura de nuevos hospitales, y a varios informes publicados hace unos años en los que se alertaba de la falta futura de hematólogos junto con otras especialidades, la CNHH aceptó el incremento de oferta de plazas. No obstante, el número de plazas convocadas en los últimos 6 años ha sido superior al recomendado por la CNHH, como consta en sus actas, debido a exigencias de las autonomías. La situación actual, con descenso poblacional, limitación de recursos y reposición parcial de las jubilaciones, obliga a convocar un menor número de plazas y a basarse en los resultados de los registros de especialistas que están en marcha para evitar una situación excedentaria. Además, el Estudio de Necesidades de Especialistas Médicos en España (2010-2025) del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad indica un superávit de especialistas de Hematología en los próximos años. Por otra parte, creemos que la oferta docente ha de revisarse respecto a los criterios de acreditación, siendo éste uno de los objetivos de la actual comisión para mejorar la formación de nuestros futuros especialistas. Otro objetivo futuro importante es la adaptación de nuestra especialidad de adaptar la formación troncal dentro del Tronco Médico. En este sentido, es preciso desarrollar un programa de 5 años

**Tabla 2. Centros acreditados para Formación MIR. Plazas acreditadas y ofertadas**

<b>Oferta docente MIR en Hematología y Hemoterapia. Convocatoria 2013</b>	
Centros acreditados	76 hospitales
Plazas totales acreditadas	136 plazas
Plazas totales ofertadas	118 plazas



**Tabla 3. Formación Especialista MIR en Hematología 1979-2012.**

**Tabla 4.** Adjudicación y número de orden MIR en Hematología y Hemoterapia

**EVOLUCIÓN DE LA ADJUDICACIÓN DE PLAZAS DE LA ESPECIALIDAD DE HEMATOLOGÍA Y HEMOTERAPIA, EN LAS CONVOCATORIAS DE PRUEBAS SELECTIVAS DE 2006 A 2013**

	Plazas adjudicadas				Primer n.º orden	Último n.º orden	Media de los n.º orden	Mediana de los n.º orden
	Españoles	Comunitarios	No comunitarios	TOTAL ADJUDICADAS				
<b>2006-07</b>	84	3	9	96	134	4.836	3.208	3.442
<b>2007-08</b>	88	5	22	115	18	4.927	3.324	3.762
<b>2008-09</b>	91	6	24	121	21	5.124	3.003	3.236
<b>2009-10</b>	70	6	50	126	81	6.035	3.466	3.815
<b>2010-11</b>	86	7	30	123	56	5.270	3.391	3.792
<b>2011-12</b>	87	3	34	124	88	5.822	3.333	3.732
<b>2012-13</b>	90	3	25	118	111	4.820	2.892	3.222

Información actualizada a 17 de mayo de 2013 por el Servicio de Gestión de Formación Sanitaria Especializada del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad

tanto en el escenario de troncalidad, en el que sería imprescindible mantener los 3 años de formación específica, como en el escenario de no troncalidad para adaptar los contenidos a los avances clínicos y biológicos de la especialidad. En la **Figura 2** reflejamos los principales pilares de los contenidos específicos de la Hematología y Hemoterapia, y en las **Tablas 5-7** se presenta un resumen de los programas formativos de 4 y 5 años de duración en los diferentes escenarios.

**Nuevo currículum europeo de Hematología**

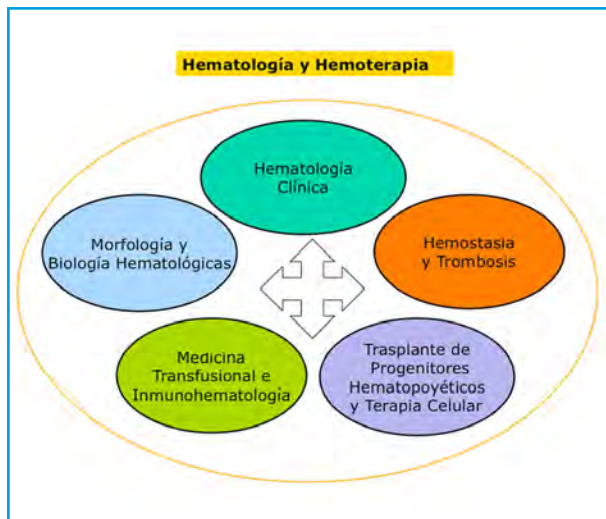
El comité de formación de la European Hematology Association (EHA), integrado por representantes de 23 países, formuló una Declaración de Bruselas en marzo de 2011 en la que se recogen los requisitos mí-

nimos para la formación en Hematología y Hemoterapia. Como se indica en las alegaciones a la troncalidad, es imprescindible adaptarse a estos contenidos y a su duración mínima de 5 años para poder lograr la homologación laboral en todos los países europeos.

Recientemente se ha actualizado el Currículum Europeo de Hematología, que ha de servir de guía para los programas formativos. Toda la información se encuentra disponible en la página web de la EHA: [www.eha.com](http://www.eha.com).

**Conclusiones: el futuro de la formación MIR en Hematología y Hemoterapia**

La formación de especialistas en Hematología y Hemoterapia ha de continuar realizándose mediante el sistema MIR tras la licenciatura de Medicina. A pesar de la implantación de la troncalidad y de la integración de nuestra especialidad en el Tronco Médico,



**Figura 2.** Resumen de contenidos específicos de la especialidad de Hematología y Hemoterapia.

**Tabla 5.** Resumen del Programa MIR actual de 4 años (total: 44 meses). Programa oficial actual (BOE 2006)

Años	ROTACIÓN	Meses
1.º	Medicina Interna y Especialidades Médicas	11
2.º 3.º 4.º	Hematología Clínica (incluye: hospitalización, TPH autólogo y alogénico y consulta externa)	11
	Citomorfolología y Biología Hematológicas (incluye citomorfolología, hematimetría, eritropatología, citometría, citogenética y biología molecular)	13
	Hemostasia y Trombosis	4
	Banco de Sangre e Inmunoematología	5 (1 en Centro de Transfusión)



**Tabla 6. Programa Formativo de Hematología y Hemoterapia. Propuesta de ampliación del Programa MIR a 5 años SIN TRONCALIDAD (total: 55 meses). Propuesta inicial/Borrador**

Años	ROTACIÓN	Meses
1.º	Medicina Interna y Especialidades Médicas	11
	Hematología Clínica (incluye: hospitalización y consulta externa)	12
	Citomorfoloía y Biología Hematológicas (incluye citomorfoloía, hematimetría, eritropatología, citometría)	12
	Hemostasia y Trombosis	5
2.º	Banco de Sangre, Medicina Transfusional Inmunoematología	6 (1 en Centro de Transfusión)
3.º		
4.º		
5.º		
	Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos y Terapia Celular	3
	Biología Hematológica Especial Citogenética y Biología Molecular en Hematología	3
	Gestión Clínica, Gestión de Laboratorio, Investigación Básica y Clínica en Hematología	3

*Nota: Se recomienda el incremento a 5 años para incluir los nuevos contenidos de la especialidad imprescindibles para adaptarse al currículum europeo EHA*

los programas formativos de Hematología y Hemoterapia han de preservar las competencias específicas de la especialidad mantenidas en los últimos años, integrando los nuevos conocimientos diagnósticos y terapéuticos. Estos contenidos han de preservar las competencias clínicas como especialidad derivada de la Medicina Interna y las competencias específicas del Laboratorio de Diagnóstico Hematológico, en Hemostasia y en la Medicina Transfusional. Ha de desarrollarse un nuevo programa formativo basado en las competencias asistenciales de los hematólogos y considerando las recomendaciones del CV-EHA que contemple 5 años mínimo para equipararse al de otros países y a la normativa europea e internacional. Respecto a las ACE, el borrador del nuevo RD regula su desarrollo, y nuestra especialidad debe definir cuáles son las ACE que conviene ofrecer en el área de la Hematología y Hemoterapia. Por otra parte, los centros acreditados han de ser revaluados para que los futuros hematólogos se formen preferentemente en centros en los que se mantenga la especialidad de forma integrada. Es muy importante mantener un debate abierto para que, independientemente del modelo hospitalario o del centro de trabajo posterior, se mantenga siempre en la etapa formativa de posgrado la especialidad de forma integral en sus tres vertientes, clínica, laboratorio y banco de sangre. El futuro modelo de troncalidad ha de contemplar estas consideraciones respecto a nuestra especialidad, exigiendo la aceptación por parte de la

**Tabla 7. Programa Formativo de Hematología y Hemoterapia. Propuesta de ampliación del Programa MIR a 5 años CON TRONCALIDAD MÉDICA de 2 años (total: 55 meses) Propuesta inicial/Borrador**

Años	ROTACIÓN	Meses
1.º	Medicina Interna y Especialidades Médicas Formación Troncal General en el Tronco Médico	22
2.º		
	Hematología Clínica (incluye: hospitalización, TPH autólogo y alogénico y consulta externa)	12
3.º	Citomorfoloía y Biología Hematológicas (incluye citomorfoloía, hematimetría, eritropatología, citometría, citogenética y biología molecular)	10
4.º		
5.º		
	Hemostasia y Trombosis	5
	Banco de Sangre e Inmunoematología	6 (1 en Centro de Transfusión)

*Nota: Es imprescindible el aumento a 5 años en el escenario de la Troncalidad para poder mantener el programa formativo actual de 3 años de Formación Específica en Hematología y Hemoterapia. En caso contrario, con 2 años específicos sería imposible adaptar el programa oficial actual*

administración del informe consensuado por todos los agentes implicados: la CNHH y la SEHH, junto con la SETS y la SETH.

A este respecto es necesario participar en los programas y comisiones docentes troncales y evaluar los programas formativos de las especialidades frontera, sobre todo del Tronco de Laboratorio, en el que incluso se permiten licenciados no médicos. Es necesario evitar la formación de otros especialistas que asuman el ejercicio de la Hematología en cualquiera de su facetas sin una formación adecuada que les permita la atención de calidad y el nivel clínico-científico que siempre ha mantenido la Hematología y Hemoterapia en nuestro país.

## Bibliografía

- Alegre A. Manual para Tutores MIR. Capítulo 17. El tutor del super-especialista o de las áreas de capacitación específica. Madrid: Editorial Panamericana; 2007. p. 231-45.
- Alegre A, Boqué C. El Sistema MIR en Hematología y Hemoterapia: situación actual y directrices de futuro. Madrid: Editorial Acción Médica; 2004.
- Alegre A, Villegas A. Formación MIR en Hematología y Hemoterapia. Libro Blanco de la Hematología y Hemoterapia en España. SEHH. EDIMSA. Madrid; 2012. p. 117-24.
- Alegre A, Villegas A, Barbolla L. La Comisión Nacional de la Especialidad de Hematología y Hemoterapia en la historia de la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia. Asociación Española de Hematología y Hemoterapia: 50 años de Historia. Madrid: Editorial Acción Médica; 2009. p. 129.
- Barber P, et al. Oferta y necesidad de especialistas médicos en España (2010-2025). Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad, 2011. <http://www.msssi.gob.es/profesionales/formacion/necesidadEspecialistas/home.htm>.
- Decreto por el que se determinan y clasifican las especialidades

en Ciencias de la Salud y se desarrollan determinados aspectos del sistema de formación sanitaria especializada. Real Decreto 183/2008, de 8 de febrero. BOE N.º 45, de 21 de febrero de 2008. p. 1020-35.

Primer borrador del Real Decreto de Troncalidad de la Formación MIR. Grupo de Troncalidad. Secretaría del Consejo Nacional de Especialidades en Ciencias de la Salud. Ministerio de Sanidad, Igualdad y Política Social, 11/12/2012.  
Programa Formativo Oficial de la Especialidad de Hematolo-

gía y Hemoterapia. BOE de 21 de octubre de 2006. Orden del Ministerio de Sanidad y Consumo de 2 de octubre 2006.

Segundo borrador del Real Decreto de Troncalidad de la Formación MIR. Grupo de Troncalidad. Secretaría del Consejo Nacional de Especialidades en Ciencias de la Salud. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad; 05/julio/2013.

## Trasplante hematopoyético haploidéntico: su utilidad y su tiempo han llegado

COORDINADORES: JORGE GAYOSO CRUZ. *Servicio de Hematología-UTMO.  
Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid*  
ÁLVARO URBANO ISPIZUA. *Servicio de Hematología.  
Hospital Clínic. Barcelona*

El trasplante alogénico de progenitores hemopoyéticos es un procedimiento médico que se asocia a un elevado número de complicaciones que comporta una alta incidencia de mortalidad. A pesar de ello, cada año se realizan en el mundo un número mayor de trasplantes alogénicos respecto al año anterior. Este hecho se debe a que es un procedimiento curativo en pacientes que padecen hemopatías malignas que no son curables en el momento actual con quimioterapia o radioterapia convencionales. El procedimiento en sí es relativamente sencillo: se trata de sustituir una hemopoyesis enferma por otra proveniente de un donante sano. El donante ideal es un hermano HLA idéntico al paciente, pero esta opción sólo está disponible en un 25-30% de los casos. Si no hay un hermano HLA idéntico, se puede utilizar un donante no emparentado HLA idéntico, que está disponible para un 60% de los casos. A pesar de la simplificación en el proceso internacional de búsqueda de un donante no emparentado, gracias al esfuerzo de los registros nacionales y mundiales, continúa siendo un procedimiento relativamente lento cuando la situación médica requiere un trasplante urgente, y en ocasiones se hace difícil de utilizar de nuevo el mismo donante si fuera preciso por un fallo de implante o por recidiva de la enfermedad que indicó el trasplante. La disponibilidad de unidades de cordón umbilical solventa en parte estas carencias: se puede obtener para un gran número de casos y de forma rápida, pero a un 10% de los pacientes no se les puede ofrecer una unidad adecuada debido a una celularidad escasa en la misma o porque hay poca compatibilidad en el HLA con el potencial receptor.

El trasplante haploidéntico a partir de un familiar del paciente tiene la gran ventaja de que prácticamente el 100% de los pacientes en los que se indica un trasplante alogénico dispone de un donante, y de que se puede acceder a él de forma inmediata. Además, en caso de fallo de implante o de recidiva seguiría estando accesible con prontitud, y muy probablemente a favor de una segunda donación. El gran inconveniente del trasplante haploidéntico es que precisamente por las muchas diferencias en el HLA entre el donante y el receptor la probabilidad de EICH severa es muy alta. Por este motivo desde hace muchos años se vienen utilizando trasplantes a partir de donantes haploidénticos en los que se procede a una depleción masiva de los linfocitos T del inóculo. Ello ha conllevado una probabilidad de fallo de implante y de recaídas superior al del trasplante convencional. Además, por la eliminación de la celularidad linfoide, la reconstitución inmune postrasplante es muy lenta y, por tanto, la incidencia de infecciones graves, muy alta. A pesar de todo ello, y gracias a los trabajos pioneros del grupo de Perugia, es un procedimiento muy establecido, sobre todo en niños, y con unos resultados que en algunos grupos internacionales son similares a los obtenidos cuando se somete al paciente a un trasplante con cordón umbilical. Recientemente se ha incorporado al arsenal de modalidades de trasplante alogénico la administración de ciclofosfamida postrasplante para eliminar los linfocitos T alorreactivos preservando los linfocitos T memoria capaces de montar una respuesta antiinfecciosa. Su aplicación en el contexto del trasplante haploidéntico para evitar la EICH severa ha tenido una rápida diseminación. En este simposio se tratará el trasplante haploidéntico con las dos aproximaciones actuales: con depleción linfoide T y con la administración de ciclofosfamida postrasplante, con especial énfasis en la reconstitución inmune y en los resultados clínicos obtenidos con las dos modalidades de trasplante haploidéntico.

## The role of NK cell alloreactivity on haploidentical transplantation

LOREDANA RUGGERI

*Division of Hematology and Clinical Immunology. Department of Clinical and Experimental Medicine. University of Perugia. Perugia, Italy*

### Introduction

Cure of leukemia by allogeneic hematopoietic transplantation relies on the action of donor T cells in the allograft which are vital for promoting engraftment, eradicating malignant cells (graft versus leukemia, GVL, effect), and reconstituting immunity. Unfortunately, they mediate Graft versus Host Disease (GVHD) which, in spite of progress in prophylaxis, is still responsible for significant morbidity and mortality.

In full haplotype-mismatched stem cell transplantation with donor and recipient pairs identical for one HLA haplotype and incompatible at the HLA class I and II loci of the unshared haplotype, all cases are at high risk of T cell mediated alloreaactions in the host-versus-graft (HvG) as well as in the graft-versus-host (GvH) direction. These T cell-mediated responses can be controlled to a large extent by a) appropriate immunosuppressive intensity of the conditioning regimen followed by a graft containing a “megadose” of hematopoietic cells, both of which together prevent graft rejection, and b) extensive T cell depletion of the graft which prevents GvHD<sup>(1)</sup>. Unlike mismatched transplants, haploidentical transplants can rely on another type of alloreactivity, mediated by natural killer (NK) cells, which is triggered by MHC mismatches between killer cell Ig-like receptors (KIR) on donor NK cells and HLA class I molecules on recipient cells<sup>(2)</sup>.

### NK cell alloreactivity

Several years ago an inverse correlation was established between expression of surface MHC class I molecules on target cells and susceptibility to NK cell-mediated lysis suggesting MHC molecules protect normal cells from NK cell-mediated lysis<sup>(3)</sup>. The lack of expression of self MHC molecules on target cells resulted in susceptibility to NK cell-mediated lysis (“missing self” recognition).

NK cells are primed to kill by signals delivered through several different activating receptors (reviewed in refs. no. 4 and 5). However, NK killing of autologous cells is prevented as each NK cell co-expresses at least one inhibitory receptor for self-MHC class I molecules. Human NK cells discriminate between allelic forms of MHC molecules via clonally-distributed receptors, termed KIRs (from Killer Cell Ig-like Receptor), that are specific for epitopes that are shared by MHC class I alleles, i.e. group 1 and group 2 HLA-C alleles, and HLA-Bw4 alleles.

Although HLA and KIR genes are inherited independently most individuals possess a full complement of KIR genes for inhibitory receptors for the 3 major class I ligands (group 1 and group 2 HLA-C alleles, and HLA-Bw4 alleles)<sup>(6)</sup> and can thus make an NK repertoire which is as diverse as the class I KIR ligands of the individual. In the 162 individuals we screened for KIR genotyping, 97% bore KIR2DL1 which is the receptor for HLA-C group 2 alleles; 100% expressed KIR2DL2/3 receptors which are specific for HLA-C group 1 alleles and 94% bore KIR3DL1 which is the receptor for HLA-Bw4 alleles<sup>(7)</sup>, and Mancusi *et al.*, unpublished observations).

The HLA class I genotype imposes selection during development of the NK-cell receptor repertoire by dictating which KIRs are to be used as inhibitory receptors for self HLA class I. In addition, the HLA class I genotype on the NK-cell KIR repertoire determines the frequencies of cells expressing a given KIR<sup>(8)</sup>.

The CD94-NKG2A inhibitory receptor complex is expressed primarily in NK cells that do not express an inhibitory KIR for self HLA class I, so it fills the gaps in the KIR repertoire. Alloreactive NK cells are not found among CD94-NKG2A positive NK cells because HLA-E, the ligand for this receptor, is expressed on cells from all individuals (reviewed in refs. no. 4 and 5).

Thus, in every individual, NK cell gene expression of different KIR and CD94/NKG2 receptors generates the NK cell repertoire of that person. As KIRs are clonally distributed, each cell in the repertoire bears a different receptor or, less frequently, two or more receptors. However, every mature NK cell expresses at least one receptor that is specific for self HLA class I molecules (because the individual's HLA selects the self-tolerant repertoire). Consequently, when faced with mismatched allogeneic targets, NK cells in the repertoire will sense the missing expression of self HLA class I alleles and will mediate alloreactions.

The great diversity of KIR expression ensures the generation of alloreactive NK cells between individuals who are mismatched for either one of the two subgroups of HLA-C alleles and/or the HLA-Bw4 allele group. For example, individuals who express Group 2 HLA-C alleles and possess NK cells that express KIR specific for Group 2 HLA-C alleles (KIR2DL1) are alloreactive against cells from individuals who do not express Group 2 HLA-C alleles (who are homozygous for Group 1 HLA-C alleles). Individuals who express Group 1 HLA-C alleles possess NK cells with KIR specific for Group 1 HLA-C alleles (KIR2DL2 and/or KIR2DL3) and are alloreactive against cells from individuals who do not express Group 1 HLA-C alleles (who are homozygous for Group 2 HLA-C alleles). Likewise, HLA-Bw4 positive individuals expressing the Bw4-specific KIR3DL1 receptor may possess NK cells that are alloreactive against Bw4-negative cells.

### Donor-vs-recipient NK cell alloreactivity in haploidentical transplants

In HLA haplotype-mismatched hematopoietic transplantation with a potential for GvH NK-mediated reactions, the engrafted stem cells give rise to an NK cell wave of donor origin which regenerates the same repertoire as the donor's, and so includes high-frequencies of donor-vs-recipient alloreactive NK cells<sup>(9)</sup>. Donor-versus-recipient NK cell alloreactivity reduced the risk of leukemia relapse in 57 acute myeloid leukemia (AML) patients at high risk of relapse, while improving engraftment and protecting against GvHD<sup>(2)</sup>.

Experimental evidence confirmed NK cells were directly involved in controlling relapse of AML. *In vitro* studies showed 100% myeloid leukemias were killed by alloreactive NK cells but only a minor fraction of common phenotype acute lymphoblastic leukemias were lysed. This was the only non-susceptible target in all the primary tumors of lympho-hematopoietic lineage we have tested to date. Moreover, transfer of NK cells into NOD/SCID mice eradicated transplanted human AML provided that the NK cells were alloreactive towards the transplanted AML<sup>(2)</sup>.

An updated analysis of transplantation outcomes of 130 AML patients transplanted from haploidentical donors from 1993 through January 2013 demonstrates transplantation from NK alloreactive donors does not increase the risk of GvHD and exerts a remarkable control of leukemia relapse and is associated with improved leukemia-free survival.

### Donor-vs-recipient NK cell alloreactivity in unrelated-donor hematopoietic transplantation

As approximately 50% of unrelated-donor transplants are performed in the presence of one or more HLA allele-level mismatches, NK cell alloreactivity may be expected to occur in this setting. Results from retrospective studies addressing this issue are now available<sup>(10-16)</sup>, but several show no advantage of transplantation from donors with potential to exert NK cell alloreactivity. Common to these reports is the lack of functional assessment of donor-vs-recipient NK cell alloreactivity and transplant protocols which differ from the haploidentical: they are heterogeneous in terms of patient populations, underlying diseases (including ALL which is resistant to alloreactive NK killing, see above), conditioning regimens, graft composition, and post-transplant immunosuppressive regimens. Unlike the "megadose" of extensively T cell-depleted stem cells in haploidentical grafts, unrelated-donor transplants generally use un-manipulated bone marrow harvests (or, less frequently, peripheral blood progenitors) which contain ~4 log more T cells and up to 1 log fewer stem cells. Furthermore, they depend on post-transplant immune suppression to help prevent and/or control GvHD. The relatively few transplanted stem cells, immune suppressive GvHD prophylaxis, and the further immune suppression given when GvHD develops, all combine to adversely affect NK cell maturation from their bone marrow precursors. Indeed, under these conditions a recent study demonstrated a very delayed and poor reconstitution of potentially alloreactive KIR-bearing NK cells<sup>(17)</sup>.

Even under these adverse conditions, some of these studies documented an increased GvL effect in transplants from donors with potential to exert NK cell alloreactivity<sup>(11,13-15)</sup>. Interestingly, the one report that demonstrated a dramatic survival advantage for patients transplanted from donors with potential to exert donor-vs-recipient NK cell alloreactivity administered ATG pre-transplant (which provided *in vivo* T cell depletion) and a graft containing 2-3-fold more nucleated cells than usual in unrelated-donor transplants<sup>(11)</sup>.

## Selection of NK alloreactive donors

One consequence of the haloidential transplant studies is revision of current criteria for donor selection. Donor selection for AML now involves a search for the donor who is able to mount donor-vs recipient NK cell alloreactivity.

The search for NK alloreactive donors may require extension from the immediate family (parents and siblings) to other family members such as aunts, uncles and cousins. An extended search raises the chance of finding an NK alloreactive donor from the random 30% to > 60% (which is close to the maximum, bearing in mind that HLA type of about 30% of the population makes them resistant to alloreactive NK killing).

*HLA typing.* For NK alloreactive donor selection, first HLA type the recipient by high resolution molecular techniques. Recipients who express class I alleles belonging to the 3 major class I groups (HLA-C group 1, HLA-C group 2, and HLA-Bw4 alleles) will block all NK cells from every donor. Recipients who express alleles belonging to 1 or 2 of these three class I groups have the chance of finding NK alloreactive donors. Donor HLA typing will identify the relative who expresses the allele in the class I group that is not expressed by the patient. Most of these donors will possess NK cells that are alloreactive against the recipient's.

*KIR genotyping.* As we have observed 3% of the population lack KIR2DL1 and 6% lack KIR3DL1 while 100% have KIR2DL2/3, KIR genotyping of the donors is necessary to make sure the donor possesses the relevant KIR gene and, thus, to improve accuracy of NK alloreactive donor identification.

*NK cloning.* In some individuals allelic variants in the HLA-Bw4 inhibitory NK receptor gene KIR3DL1 may not allow full receptor expression at the cell membrane<sup>(18)</sup>. Others may express the corresponding NK clones in very low frequencies<sup>(7)</sup>. Direct functional assessment of the donor alloreactive NK repertoire through the generation of large numbers of donor NK clones and cytotoxicity assays against recipient target cells may be necessary to identify these donors.

## Therapeutic perspectives from mouse models

NK alloreactivity favors engraftment as our murine transplant models show<sup>(2)</sup>. Even after mild host immune suppression, infusion of donor alloreactive NK cells ablated the host lympho-haematopoietic cells, thus preventing rejection of the MHC-mismatched BMT.

Experimental evidence suggests NK cells attack predominantly the hematopoietic cells of the host but not other tissues which are common targets for T cell-mediated GvH disease. Murine alloreactive NK

cells, even when infused in large numbers, do not cause GvHD<sup>(2)</sup>. Interestingly, alloreactive NK cells kill host-type dendritic cells which prevents presentation of host antigens to donor T cells, i.e. the crucial step that initiates GvH reactions. Indeed, alloreactive NK cells in a pre-transplant conditioning protected mice from GvHD to such an extent as to allow a safe infusion of otherwise lethal doses of allogeneic T cells<sup>(2)</sup>.

Even in the overt absence of acute systemic GVHD, the NK conditioning itself, or the transfer of allogeneic T cells might still cause acute thymic GVHD, i.e., damaged stroma, and impaired thymopoiesis and selection of the T cell repertoire<sup>(19)</sup>. However, the use of an alloreactive NK-based conditioning regimen in conjunction with the adoptive transfer of large numbers of allogeneic T cells affected neither the architectural organization nor the cellular composition of the thymic stromal compartment nor did it impair regular thymopoiesis<sup>(20)</sup>.

Therefore, conditioning with alloreactive NK cells might protect from post-transplant infections because it allows T cell-replete mismatched transplants without GVHD and does not endanger long-term thymic T cell reconstitution. Indeed, the time-kinetics of donor-type T cells and dendritic cell recovery were much faster after NK-based than standard conditioning. Thus, mice responded immediately to infectious challenges and mounted a protective T cell-mediated immunity which allowed them to survive later high-virulence challenges and, concomitantly, were protected from GVHD<sup>(21)</sup>.

In conclusion, unlike T cell alloreactivity, NK alloreactivity combines all the features which make it uniquely suited for mismatched hematopoietic transplantation. In mice, alloreactive NK cells eradicate leukemia and favor engraftment by killing host lympho-hematopoietic cells. By eliminating host-type dendritic cells they reduce GvHD, to such an extent that T cell-replete mismatched bone marrow can be transplanted without GvHD. We envisage harnessing the potential of NK cell alloreactivity to enhance the graft-versus-leukemia effect and reduce transplant-related mortality and the incidence of infection-related deaths, thus offering survival to more leukemia patients.

## References

1. Aversa F, Tabilio A, Velardi A, et al. Treatment of high risk acute leukemia with T-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *New Engl J Med* 1998;339:1186-1193.
2. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor Natural Killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002;295:2097-2100.
3. Kärre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2 deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 1986;319:675-678.

4. Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri M. Natural Killer cell receptors: new biology and insights into the graft versus leukemia effect. *Blood* 2002;100:1935-1947.
5. Velardi A, Ruggeri L, Moretta A, Moretta L. NK-cells: a lesson from mismatched haematopoietic transplantation. *Trends Immunol* 2002;23:438-444.
6. Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP et al. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* 1997;7:753-760.
7. Ruggeri L, Capanni M, Mancusi A et al. Impact of NK Cell Alloreactivity on Mismatched Haematopoietic Transplantation: an Update on Donor Selection Criteria and on Transplantation Outcomes. *Bone Marrow Transpl* 2004;33:S68.
8. Shilling H, Young N, Guethlein LA et al. Genetic Control of human NK cell repertoire. *J Immunol* 2002;169: 239-247.
9. Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, et al. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 1999;94:333-339.
10. Davies SM, Ruggeri L, DeFor T, et al. Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. *Blood* 2002;100:3825-3827.
11. Giebel S, Locatelli F, Lamparelli T, et al. Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood* 2003;102:814-819.
12. Lowe EJ, Turner V, Handgretinger H, et al. T-cell alloreactivity dominates natural killer cell alloreactivity in minimally T-cell-depleted HLA-non-identical paediatric bone marrow transplantation. *Br J Haematol*. 2003;123:323-326.
13. Morishima Y, Yabe T, Inoko H, et al. Clinical significance of killer Ig-like receptor (KIR) on acute GvHD, rejection and leukemia relapse in patients transplanted non-T cell depleted marrow from unrelated donors; roles of inhibitory KIR epitope matching and activating KIR genotype [abstract]. *Blood*. 2003;102:526a.
14. Beelen DW, Ottinger H, Ferencik S, Elmaagacli AH, Peceny R, Grosse-Wilde H. KIR ligand disparities are associated with a decreased risk of relapse after allogeneic stem cell transplantation for myeloid leukaemia. [abstract]. *Bone Marrow Transplant* 2004;33:S17.
15. Elmaagacli AH, Ottinger, H Koldehoff M, Peceny R, Trenschel R, Beelen DW. Reduced risk of molecular and haematological relapse in patients with CML after KIR-mismatched haematopoietic stem cell transplantation [abstract]. *Bone Marrow Transplant* 2004;33:S59.
16. Bornhauser M, Schwerdtfeger R, Martin H, Frank KH, Theuser C, Ehninger G. Role of KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation using unrelated donors [letter]. *Blood* 2004;103:2860-2861.
17. Shilling HG, McQueen KL, Cheng NW, Shizuru JA, Negrin RS, Parham P. Reconstitution of NK cell receptor repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2003;101:3730-3740.
18. Pando MJ, Gardiner CM, Gleimer M, McQueen KL, and Parham P. The protein made from a common allele of KIR3DL1 (3DL\*004) is poorly expressed at cell surfaces due to substitution at position 86 in Ig domain 0 and 182 in Ig domain 1. *J Immunol* 2003;171:6640-6647.
19. Krenger W, Rossi S, Piali L, and Holländer GA. Thymic atrophy in murine acute graft-versus-host disease is effected by impaired cell cycle progression of host pro-T and pre-T cells. *Blood*, 2000; 96:347-354.
20. Burchielli E, Ruggeri L, Hafen K, Perruccio K, Holländer G, Velardi A. NK Cell Conditioning to T Cell-Replete Mismatched Bone Marrow Transplantation Protects Thymic Structure and Function [abstract]. *Bone Marrow Transpl* 2004;33:S56.
21. Ruggeri L, Perruccio K, Montagnoli C, Romani L, and Velardi A. NK cell conditioning to T Cell-Replete Mismatched BMT Confers Immediate Responsiveness to Infectious Challenges [abstract]. *Bone Marrow Transpl* 2004;33:S18.

## Trasplante haploidéntico de pacientes pediátricos

MARTA GONZÁLEZ-VICENT, MIGUEL ÁNGEL DÍAZ PÉREZ

Unidad de Trasplante Hematopoyético y Terapia Celular. Hospital Infantil Universitario Niño Jesús. Madrid

### Introducción

El trasplante hematopoyético es la única opción curativa para determinadas enfermedades hematológicas malignas y no malignas. Sólo el 25-30% de estos pacientes tienen un donante familiar (hermano) idéntico. En el resto de los casos, se deberá utilizar un donante alternativo como es un donante no emparentado HLA-idéntico, sangre de cordón umbilical (único o doble) o un donante haploidéntico. La búsqueda de un donante no emparentado es un procedimiento largo, con una mediana de 3-4 meses desde su inicio. Los pacientes con enfermedades de alto riesgo pueden progresar o incluso fallecer durante este tiempo de espera. Este inconveniente es evitado con el uso de un donante familiar haploidéntico.

### Ventajas

- 1. Disponibilidad inmediata:** en el caso del trasplante haploidéntico el paciente acude a la consulta con su donante. El familiar haploidéntico está altamente motivado y permite disponibilidad inmediata sin tiempos de espera.
- 2. Selección del donante:** el mejor donante haploidéntico puede ser escogido en función de la disparidad KIR, el haplotipo KIR o la madre en casos de no disparidad KIR.
- 3. Manipulación del inóculo:** el injerto puede ser manipulado para evitar la enfermedad injerto contra receptor (EICH) y el fallo de prendimiento.
- 4. Estudios de quimerismo:** la disparidad HLA facilita los estudios de quimera postrasplante.
- 5. Terapia celular:** la disponibilidad del donante permite la realización de terapia celular postrasplante en el caso de infecciones virales o quimerismo mixto/recaída, lo que no se puede realizar en el caso del trasplante de cordón.
- 6. Segundo trasplante:** puede realizarse inmediatamente en caso de fallo primario o secundario de injerto del mismo donante o de otro donante haploidéntico

### Inconvenientes

- 1. Retraso en la reconstitución inmune:** el retraso de la recuperación linfocitaria facilitará el desarrollo de infecciones, principalmente virales.
- 2. Fallo de injerto:** la disparidad HLA puede facilitar el fallo de prendimiento, que se puede evitar con la manipulación del inóculo (infusión de altas dosis de CD34+, depleción CD3/CD19).

### Selección de donante

#### Disparidad KIR

Las células NK expresan receptores inhibidores en su superficie llamados *killer immunoglobulin-like receptor* (KIR) que reconocen KIR ligandos en alelos HLA-clase I (HLA-C1, HLA-C2 y HLA-Bw4). Las células NK están “licenciadas” para ejercer alorreactividad contra dianas alogénicas que no expresan sus ligandos KIR (HLA-I).

La selección de donante basada en la disparidad KIR disminuye el EICH y la recaída y mejora la supervivencia libre de eventos, principalmente en la leucemia mieloblástica aguda, según fue publicado inicialmente por la Dra. Ruggeri. De acuerdo a la hipótesis inicial “ligando-ligando”, una célula NK del donante reconoce a una del receptor como extraña y la mata cuando ésta carece de uno o más alelos HLA de clase I específicos para sus receptores KIR. Este modelo asume que cada individuo tiene que expresar al menos un KIR para cada alelo HLA propio y sólo estudia los ligandos KIR.

El modelo “receptor-ligando” se basa en la determinación directa del repertorio de receptores KIR del donante y los ligandos del paciente para predecir la alorreactividad NK.

#### Uso de la madre como donante

El desarrollo de tolerancia inmune durante el embarazo entre la madre y el feto impacta en el resultado



del trasplante mejorando la supervivencia. Por eso, en el caso de no existir disparidad KIR, si está disponible, se recomienda usar a la madre como donante.

Asimismo, cuando el haplotipo que no comparten en el trasplante haploideéntico es el de origen materno (NIMA: antígenos maternos no heredados) el pronóstico es mejor que si es el de origen paterno.

### Haplotipo KIR

El uso de donantes de haplotipo B, es decir, con un alto número de receptores activatorios KIR, confiere un menor riesgo de recaídas postrasplante. En caso de varios donantes con haplotipo B se optaría por aquel con más receptores activatorios o aquel con receptores centroméricos.

### Número de disparidades HLA

El número de disparidades HLA (3 o 4 antígenos) no parece influir en el pronóstico.

## Fuente de progenitores

### Sangre periférica manipulada

- **Selección CD34+:** Las células CD34+ a dosis altas tienen actividad veto, que significa que suprime los linfocitos T precursores dirigidos contra sus propios antígenos, pero no contra antígenos de una tercera parte. Esto permite sobrepasar la barrera del HLA en el trasplante haploideéntico. El uso de altas dosis (“megadosis”) de células CD34+ obtenidas de sangre periférica movilizada con factores de crecimiento de granulocitos (G-CSF) como fuente de progenitores fue publicado por Aversa y el grupo de Perugia. La incidencia de EICH era muy baja, así como la tasa de recaídas (16%). Sin embargo, la mortalidad tóxica alcanzó el 40% debido al aumento de infecciones por el retraso de la reconstitución inmune.
- **Depleción CD3/CD19:** con la depleción CD3/CD19 se infunden células facilitadoras del injerto (células *natural killer*, células dendríticas) además de progenitores CD34+. Con este procedimiento se facilita el prendimiento, pero la incidencia de EICH es más elevada (48%), puesto que la cantidad de linfocitos T infundidos es mayor que con la selección CD34+.
- **Depleción TCR  $\alpha\beta$ :** este procedimiento ha sido recientemente utilizado por el grupo de Tübinga liderado por el Dr. Handgretinger. La depleción T obtenida es comparable a la de la selección CD34+ y se infunden linfocitos  $\gamma\delta$ , que son no reactivos y tienen importantes propiedades antiinfecciosas y antitumorales.

- **Depleción *in vivo*:** el anticuerpo anti-CD52 (alemtuzumab) se puede usar para depleción de las células T *in vivo* facilitando el injerto. Sin embargo, se acompaña de una alta tasa de recaídas e infecciones virales.
- **Sangre periférica movilizada con plerixafor:** la combinación de G-CSF y plerixafor en la movilización puede incrementar la cantidad de células CD34+ recolectadas.

### Médula ósea sin manipular

La médula ósea se puede utilizar como fuente de progenitores sin manipular asociando altas dosis de ciclofosfamida (CF) postrasplante. La CF postrasplante elimina los linfocitos T alorreactivos y facilita el injerto de las células del donante sin dañarlas, ya que las células progenitoras son quiescentes y resistentes a las altas dosis de CF por sus altos niveles de aldehído dehidrogenasa. Luznik y su grupo (Johns Hopkins) han utilizado este método con una incidencia muy baja de EICH agudo (6%) y crónico (5%), pero una alta tasa de recaída (58%).

### Médula ósea movilizada y sangre periférica

Varios grupos de investigadores chinos han utilizado un inóculo combinando sangre periférica y médula ósea movilizada con G-CSF. La incidencia de EICH aguda y crónica fue elevada (46% y 54% respectivamente), pero con baja recaída (20%) y una supervivencia libre de eventos cerca del 70%.

## Acondicionamiento

- **Mieloablativo:** inicialmente en el grupo de Perugia el acondicionamiento era mieloablativo, basado en irradiación corporal total y con elevada toxicidad.
- **De intensidad reducida (AIR):** con el uso de altas dosis de CD34+ en la selección y depleción CD3/CD19, se vio que no era necesario el acondicionamiento mieloablativo para el prendimiento y se empezó a usar AIR basado en fludarabina para disminuir la toxicidad y acelerar la reconstitución inmune.

### Profilaxis de EICH

La mayoría se basaba en el uso de seroterapia con globulina antitimocito (ATG) u OK-T3. Otros grupos asocian rapamicina porque mejora la reconstitución inmune, con aumento de las células T reguladoras en sangre periférica.

## Terapia celular

### Inmunoterapia antiinfecciosa

Consiste en la generación de clones de linfocitos T CD4+ del donante antipatógenos (citomegalovirus, *Aspergillus*), no alorreactivos. Así se consigue controlar las infecciones sin producir EICH, pero el procedimiento es laborioso y muy costoso. También se puede utilizar como fuente de linfocitos un tercer donante o mediante selección con sistema Clinimacs.

### Inmunoterapia adoptiva

Consiste en la depleción *ex vivo* de células T alorreactivas del donante mediante inmunotoxinas, selección inmunomagnética (anti-CD25) o con depleción fotodinámica para infundirlas al paciente sin producir EICH. Se puede insertar el gen suicida de timidín-quinasa del virus herpes simple en las células T para hacerlas susceptibles a ganciclovir en caso necesario.

### Infusión de células T reguladoras (Tregs)

La infusión de células Tregs del donante coinfundidas con linfocitos T convencionales ha demostrado en modelos murinos que previene la EICH. Por ello el grupo de Perugia ha utilizado la infusión de  $2 \times 10^6$ /kg de Tregs y 4 días después  $1 \times 10^6$ /kg de linfocitos T convencionales y  $10 \times 10^6$ /kg de CD34+ del donante haploidentico. Así se promueve el injerto, con una rápida reconstitución inmune, consiguiendo un amplio repertorio de células T y una baja incidencia de EICH.

### Infusión de células NK

Las infusiones de células NK se pueden utilizar después del trasplante para mejorar la inmunidad innata y la actividad antitumoral. Para mejorar su efectividad se someten a incubación con IL-15.

## Conclusiones

Los avances en el trasplante haploidentico han mejorado los resultados del mismo en los últimos años,

por lo que no se debe demorar un trasplante con indicación cuando no se dispone de donante familiar idéntico.

Son necesarias nuevas estrategias para mejorar la reconstitución inmune, disminuyendo así las infecciones y para prevenir la recaída en este tipo de trasplantes.

## Bibliografía

- Bayraktar UD, Champlin RE and Ciurea SO. Progress in haploidentical stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012; 18: 372-380.
- Reisner Y, Hagin H and Martelli MF. Haploidentical hematopoietic transplantation: current status and future perspectives. *Blood* 2011; 118: 6006-6017.
- Barrett J, Gluckman E, Handgretinger R and Madrigal A. Point-counterpoint: haploidentical family donors versus cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011; 17: S89-S93.
- Gonzalez-Vicent M, Molina B, Andion M y cols. Allogeneic hematopoietic transplantation using haploidentical donor vs unrelated cord blood donor in pediatric patients: a single-center retrospective study. *Eur J Hematol* 2011; 87: 46-53.
- Aversa F, Tabilio A, Velardi A y cols. Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *N Engl J Med* 1998; 339: 1186-1193.
- Luznik L, O'Donnell P, Symons H y cols. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 14: 641-650.
- Ruggeri L, Capanni M, Urbani E y cols. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002; 295: 2097-2100.
- Bethge WA, Faul C, Bornhauser M, y cols. Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults using CD3/CD19 depletion and reduced intensity conditioning: an update. *Blood Cells Mol Dis* 2008; 40: 13-19.
- Handgretinger R, Klingebiel T, Lang P y cols. Megadose transplantation of purified peripheral blood CD34+ progenitor cells from HLA-mismatched parental donors in children. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27: 777-783.
- Amrolia PJ, Muccioli-Casadei G, Huls H y cols. Adoptive immunotherapy with allodepleted donor T-cells improves immune reconstitution after haploidentical stem cell transplantation. *Blood* 2006; 108: 1797-1808.
- Leung W, Iyengar R, Triplett B y cols. Comparison of killer Ig-like receptor genotyping and phenotyping for selection of allogeneic blood stem cell donors. *J Immunol* 2005; 174: 6540-6545.
- Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A y cols. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood* 2011; 117: 3921-3928.

## Trasplante haploidéntico sin depleción T

J. GAYOSO CRUZ, P. BALSALOBRE, D. SERRANO, G. RODRÍGUEZ, M. KWON, C. MUÑOZ, J. ANGUITA, A. PÉREZ-CORRAL, I. BUÑO, J.L. DÍEZ-MARTÍN

*Servicio de Hematología-UTMO. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón. Madrid*

### Introducción

Sólo el 25-30% de los casos de tumores hematológicos en los que se indica trasplante alogénico (TPH) disponen de un hermano HLA idéntico. Adicionalmente, se encuentra donante no familiar adulto (DNE) compatible en un 60% de las búsquedas, pudiendo aumentar hasta casi el 90% cuando se incluyen las búsquedas de sangre de cordón umbilical (SCU), aunque sólo el 40% llegan a ser trasplantados a partir de un DNE o SCU en los primeros 6 meses tras el inicio de la búsqueda (Memoria REDMO 2010).

Debido a lo anteriormente expuesto, existen casos que precisan un trasplante alogénico y no tienen un donante óptimo a tiempo, por lo que son necesarias nuevas estrategias para ofrecerles esta opción.

Entre ellas está el **trasplante haploidéntico a partir de donantes familiares**, con las ventajas de rápida disponibilidad, implicación del donante y simplicidad logística respecto al donante no familiar.

Existen **diferentes plataformas de TPH haploidéntico** que se han venido desarrollando básicamente desde los años 90 empleando diversos procedimientos de depleción T *in vitro*, que van a ser revisadas por otros autores dentro de este simposio, con los inconvenientes iniciales de elevadas tasas de fracaso de injerto, mortalidad tóxica (MRT) debida fundamentalmente a infecciones oportunistas, enfermedad injerto contra huésped (EICH) y frecuentes recidivas, por lo que su difusión y aceptación han sido limitadas.

En los últimos años, los grupos de Baltimore y Seattle<sup>(1,2)</sup>, han desarrollado un procedimiento de TPH haploidéntico submieloablato empleando progenitores de médula ósea con **profilaxis de la EICH con ciclofosfamida en dosis altas** postinfusión de progenitores, que ofrece una plataforma accesible, sencilla y económica al TPH para casi cualquier paciente, que será el objeto de esta comunicación.

### Profilaxis de la EICH con ciclofosfamida post-TPH

El empleo de **ciclofosfamida en dosis altas post-TPH para la profilaxis de la EICH** (50 mg/kg/día los días +3 y +4) se basa en el efecto citotóxico que la ciclofosfamida ejerce sobre los linfocitos T alorreac-tivos que se expanden tras la infusión de progenitores haploidénticos. Estos clones alorreac-tivos son eliminados por efecto de la ciclofosfamida mientras los clones de linfocitos de memoria no activados y las células progenitoras son respetados debido a su estado quiescente y al mayor contenido en aldehído-deshidrogenasa, respectivamente<sup>(3-5)</sup>.

El TPH haploidéntico con **profilaxis de la EICH con ciclofosfamida en dosis altas** (50 mg/kg i.v.) los días +3 y +4 postinfusión de progenitores y una combinación de tacrolimus y micofenolato, descrito por L. Luznik *et al.*<sup>(2)</sup> es un procedimiento muy bien tolerado, con una MRT del 15% en el primer año, incidencia acumulada de EICH aguda II-IV del 36% y formas graves III-IV del 6%, permitiendo una SLP a 2 años del 30-35% debido a una alta tasa de recaídas (50-60%), con una SG del 36%, algo mejor para neoplasias linfoides.

Entre los hallazgos más relevantes asociados a este procedimiento, es preciso destacar expresamente los resultados en **pacientes con enfermedad de Hodgkin recaída/refractaria**<sup>(7)</sup>, con SG, SLP e incidencia de recaída/progresión del 58%, 51% y 40%, respectivamente, con mediana de seguimiento de 25 meses, que comparan favorablemente con los obtenidos en casos similares trasplantados a partir de donante hermano HLA idéntico o DNE en una comparación retrospectiva, en especial por disminución de la TRM y baja incidencia de EICHa III-IV (11%) y EICH crónica extensa (35%).

De igual forma, el mismo procedimiento de intensidad reducida con la adición de ATG se ha ensayado en **pacientes con enfermedades hematológicas no malignas (HPN y drepanocitosis)** con buena tolerancia y baja incidencia de EICH, con la limitación de alta tasa de fracaso de injerto<sup>(7,8)</sup>.

## Modificaciones al esquema original

En nuestro centro desde diciembre de 2007 hemos adaptado el procedimiento para el **tratamiento de pacientes con neoplasias hematológicas de alto riesgo e indicación de realizar TPH alogénico que no disponen de un donante óptimo** para realizarlo en el momento apropiado de la evolución de su enfermedad.

**Sobre el esquema original, hemos incluido diferentes modificaciones con el propósito de reducir las recaídas** (emplear busulfán i.v. en dosis crecientes hasta un esquema mieloablativo, reducir la duración de la profilaxis de EICH hasta el día +90, empleo de sangre periférica [SP] como fuente de progenitores), que son las que se recogen en el presente documento.

Con una estrategia parecida empleando **un esquema mieloablativo con fludarabina + busulfán i.v., progenitores de SP y ciclofosfamida post-TPH**, el grupo de Atlanta ha comunicado una serie de 20 pacientes con neoplasias de alto riesgo, principalmente leucemias agudas, con resultados prometedores: TRM 10% a 1 año, SG 69% y SLE 50% a 1 año e incidencias de EICH aguda III-IV del 10% y EICH crónica del 35% con seguimiento de 20 meses<sup>(9)</sup>.

De forma similar, el grupo de Génova ha empleado la MO como fuente de progenitores con un esquema de acondicionamiento mieloablativo con fludarabina + thiotepa + busulfán i.v. y ciclofosfamida post-TPH con resultados precoces muy interesantes en pacientes con LMA, en especial pacientes en RC1 y RC2 con SLE del 68% a 1 año frente al 37% en pacientes en fases avanzadas<sup>(10)</sup>.

## Comparación con TPH de hermano HLA idéntico, DNE y SCU

**El TPH haploidéntico con esquema submieloablativo y ciclofosfamida en dosis altas post-TPH ha mostrado resultados equiparables al TSCU de doble cordón** en la comparación no aleatorizada de 2 estudios multicéntricos de fase II del Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network publicada por Brunstein *et al.*<sup>(11)</sup> donde los pacientes recibían el mismo acondicionamiento con ciclofosfamida, fludarabina y TBI 200 cGy, alcanzando SLP y SG al año del 54% y 46% para el TSCU y del 62% y 48% para el TPH haploidéntico, respectivamente, con incidencia acumulada de EICH aguda II-IV del 40% y del 32% ( $p = NS$ ), compensando la menor MRT a 1 año del TPH haploidéntico (7% vs. 24%) con una mayor incidencia acumulada de recidiva (31% vs. 45%) respecto al TSCU.

La mayor ventaja desde el punto de vista clínico del TPH haploidéntico con ciclofosfamida post-TPH es la **buena reconstitución inmunológica** de esta

estrategia respecto a los procedimientos de depleción T<sup>(12)</sup> e incluso frente al empleo de DNE o SCU<sup>(10)</sup>, lo que disminuye de forma significativa las complicaciones infecciosas, fundamentalmente víricas y fúngicas, traduciéndose en una disminución de la MRT. El grupo de Génova ha comparado la reconstitución inmune tras el TPH haploidéntico con ciclofosfamida a dosis altas y presenta resultados similares a los TPH de hermano HLA idéntico en cifras de linfocitos CD3+ y sus diferentes subpoblaciones entre los 3-6 meses, francamente mejores que los de los DNE y SCU.

Existen ya en la literatura **series de TPH haploidéntico que comparan sus resultados con los de DNE y/o SCU e incluso con los de hermano HLA idéntico**, con números limitados de pacientes y experiencias específicas de un solo centro. Así, el grupo de Atlanta ha publicado una serie<sup>(13)</sup> comparando 117 THP de hermano HLA idéntico y 101 TPH de DNE frente a 53 casos de TPH haploidéntico con ciclofosfamida post-TPH contemporáneos realizados en su centro, obteniendo resultados globales superponibles para las tres modalidades de TPH (MRT a 2 años del 13%, 16% y 7%, respectivamente, con incidencia acumulada de EICH aguda de grados III-IV del 8%, 11% y 11% a los 6 meses, SG a 2 años del 76%, 67% y 64% y SLE a 2 años del 53%, 52% y 60%, respectivamente, sin diferencias significativas en los eventos clínicos analizados). En el último EBMT de Londres 2013, el grupo de Génova ha presentado la comparación de los resultados en su centro del TPH de hermano HLA idéntico, DNE, SCU y TPH haploidéntico<sup>(14)</sup> donde los resultados del TPH haploidéntico con empleo de médula ósea y ciclofosfamida post-TPH en los días +3 y +5 seguido de ciclosporina y micofenolato son equiparables en MRT, SLE y SG a los del resto de TPH tanto en pacientes en primera o segunda remisión como en fases más avanzadas de la enfermedad, presentando incluso menores incidencias de EICH agudo (14% en HAPLO y SCU vs. 30% en hermanos y DNE) y crónico (12% en HAPLO vs. 24% en el resto de donantes).

## Experiencia española con ciclofosfamida post-TPH

Nuestro centro ha sido pionero en el país en el empleo del TPH haploidéntico con ciclofosfamida en dosis altas post-TPH, iniciando la utilización de dicho procedimiento en pacientes con neoplasias de muy alto riesgo sin donante alternativo y proponiendo modificaciones del esquema original encaminadas a reducir las recaídas (emplear busulfán i.v. en dosis crecientes hasta un esquema mieloablativo, reducir la duración de la profilaxis de EICH hasta el día +90, empleo de SP como fuente de progenitores). Dentro

del subcomité de TPH haploideéntico del GETH se ha analizado la casuística de TPH haploideéntico con ciclofosfamida post-TPH (datos no publicados, pendientes de aceptación como comunicación oral en el presente congreso), que incluye 60 casos (edad mediana: 34 años; rango: 16-65) procedentes de 11 centros, con empleo de progenitores de MO en el 48% y SP en el 52%, 81% submieloablivos, 68% con TPH previo, 60% en fases visibles de su enfermedad, con resultados superponibles en los *end-points* fundamentales a lo descrito en la literatura (MRT a los 12 meses del 15-20%, SLE a 1 año del 50-60%, SG a 1 año del 40-50%, recaídas 40-60%, EICH aguda II-IV 38% y III-IV 15-20% al día +180). Estos resultados son mejores en pacientes con enfermedad de Hodgkin (SLE a 1 año 60-65%) que en el resto de patologías, no parece existir diferencias entre el empleo de MO y SP respecto al prendimiento e incidencia de EICH aguda/crónica y los pacientes cuyo TPH haploideéntico es su primer TPH son los de menor MRT (< 10%).

**Se pueden encontrar las recomendaciones propuestas dentro del GETH para el procedimiento de TPH haploideéntico con ciclofosfamida en dosis altas post-TPH, disponibles íntegramente en la página web del GETH ([www.geth.es](http://www.geth.es)).** Los puntos principales se resumen a continuación.

### Indicaciones

El TPH haploideéntico se considera indicado en pacientes con neoplasias hematológicas de alto riesgo que no disponen de donante idéntico en el momento ideal de proceder al TPH, independientemente de si ha iniciado o no una búsqueda de DNE/SCU.

Como en el resto de procedimientos de TPH, se deben considerar la edad, la comorbilidad, el pronóstico de la enfermedad de base y la disponibilidad de tratamientos alternativos, conforme a la práctica habitual de cada centro.

### Selección de donantes

La selección del donante haploideéntico la realizamos en función de múltiples factores coexistentes o no en el mismo, dado que cada paciente puede disponer de múltiples donantes HLA haploideénticos entre sus familiares (padres, madres, hermanos o incluso primos).

En primer lugar, se realizará al paciente un estudio de **anticuerpos anti-HLA** para evitar a donantes frente a los que pueda estar sensibilizado.

Seleccionamos aquellos **donantes que presenten alorreactividad KIR**, evaluados según el modelo ligando-ligando y la información facilitada por inmunología, para tratar de explotar la alorreactividad NK<sup>(15-17)</sup>.

Siempre que esté disponible, tratamos de **utilizar a la madre como donante**, dado que Perugia describió menor tasa de recaídas en casos de LMA que empleaban a la madre como donante<sup>(18)</sup>, probablemente debido a la exposición antigénica feto-materna durante la gestación.

En ausencia de la madre, emplearemos **criterios de selección habituales en el resto de TPH alogénicos** (mejor donantes varones, más jóvenes, compatibilidad ABO, CMV).

Este tópico ha sido recientemente revisado por S. Ciurea en BBMT<sup>(19)</sup>, aunque su algoritmo de selección de donantes difiere del descrito, considerando de forma prioritaria la presencia de anticuerpos anti-HLA en el paciente, el empleo de donantes completamente haploideénticos, la compatibilidad ABO, donantes varones y jóvenes, dejando en último término la alorreactividad frente antígenos maternos no heredados (NIMA) y la compatibilidad KIR.

### Fuente de progenitores

El procedimiento original empleaba médula ósea como fuente de progenitores, pero debido a condicionantes logísticas y a la disponibilidad de algunos donantes, iniciamos el uso indistinto de progenitores de SP en un intento de disminuir las recaídas. El grupo de Seattle presentó en la reunión del ASBMT 2012 una serie con idénticos resultados empleando SP, sin aumento de la incidencia de EICH aguda/crónica<sup>(20)</sup>, y el grupo de Atlanta ha publicado en 2013 una serie<sup>(10)</sup> con similares conclusiones. En la actualidad nuestra preferencia es el **empleo de progenitores de SP entre 4-6 x 10<sup>6</sup> CD34+/kg**, con un máximo de 8 x 10<sup>6</sup> CD34+/kg.

### Esquema de acondicionamiento submieloablivo

El **acondicionamiento submieloablivo (BUX2)**, modificado del original, consiste en fludarabina 30 mg/m<sup>2</sup> i.v. (días -6 a -2), ciclofosfamida 14,5 mg/kg i.v. (días -6 y -5) y busulfán 3,2 mg/kg i.v. (días -4 y -3) en lugar de 200 cGy de irradiación corporal total del esquema original.

Este procedimiento lo empleamos preferentemente en pacientes en RC, con comorbilidades, segundos TPH o pacientes con enfermedad de Hodgkin, en los que los prometedores resultados del TPH haploideéntico con dosis altas de ciclofosfamida no parecen depender de la intensidad del acondicionamiento.

### Esquema de acondicionamiento mieloablivo

El **acondicionamiento mieloablivo ajustado (BUX3)** consiste en fludarabina 30 mg/m<sup>2</sup> i.v. (días -6 a -2), ciclofosfamida 14,5 mg/kg i.v. (días -6 y -5) y busulfán 3,2 mg/kg i.v. (días -4 -3 y -2).

Adicionalmente empleamos un **esquema mieloablativo estándar (BUX4)** con fludarabina 40 mg/m<sup>2</sup> i.v. (días -6 a -3) y busulfán 3,2 mg/kg i.v. (días -6 a -3).

Este procedimiento lo empleamos preferentemente en pacientes sin comorbilidades, primeros TPH, pacientes que no están en RC o con leucemias agudas, en los que los resultados del TPH haploidéntico con dosis altas de ciclofosfamida están penalizados por una alta tasa de recaídas.

**Profilaxis de la EICH**

Se emplea como profilaxis de la EICH un esquema basado en el empleo de ciclofosfamida en dosis altas tras la infusión de progenitores: **ciclofosfamida 50 mg/kg i.v. (días +3 y +4)** con hiperhidratación, MESNA y diuréticos, seguido de **ciclosporina o tacrolimus** en dosis estándar desde el día +5 hasta el día +90, y **micofenolato mofetilo (MMF)** desde el +5 hasta el +35, suspendiendo MMF en ausencia de EICH.

En casos con neoplasias de muy alto riesgo con enfermedad visible al TPH, iniciamos la retirada de la inmunosupresión desde el día +45 o +50 si no han tenido manifestaciones de EICH.

**Conclusiones**

En la actualidad, cualquier paciente que precise un TPH alogénico puede acceder al mismo. El TPH haploidéntico con profilaxis de la EICH con ciclofos-

famida en dosis altas post-TPH es una alternativa adecuada para pacientes con neoplasias hematológicas de alto riesgo que precisen un TPH alogénico y no dispongan de un donante apropiado en el momento óptimo para proceder con el TPH. La reconstitución inmunológica parece más precoz y eficiente que la de los procedimientos con depleción T, aunque está por determinar si puede traducirse en un mayor efecto de injerto contra tumor. Los resultados de este procedimiento se aproximan a los de los TPH de donantes alternativos (DNE y SCU) e incluso a los de los TPH de hermano HLA idéntico si se realizan en la situación adecuada del paciente y su enfermedad. Quedan por establecer los procedimientos que puedan mejorar los resultados, en especial en lo que respecta a disminuir las recaídas (empleo de SP, acondicionamientos mieloablativos, inmunoterapia post-TPH, etc.).

**Bibliografía**

1. Luznik L, Engstrom LW, Iannone R, Fuchs EJ. Post-transplantation cyclophosphamide facilitates engraftment of major histocompatibility complex-identical allogeneic marrow in mice conditioned with low-dose total body irradiation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2002;8:131-138.
2. Luznik L, O'Donnell PV, HJ Symons et al. HLA-Haploidentical Bone Marrow Transplantation for Hematologic Malignancies Using Nonmyeloablative Conditioning and High-Dose, Posttransplantation Cyclophosphamide. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2008; 14:641-650.

**Tabla 1. Comparación de resultados de TPH alternativos**

Serie	Fuente/donante	MRT @1año	Recaídas @ 1 año	EICH aguda II-IV	EICH crónica extensa	SLP @1 año	SG @1 año
Brunstein et al. <sup>(11)</sup>	Doble SCU	24%	31%	40%	25%	46%	54%
	vs. HAPLO CTX (RIC)	vs. 7%	vs. 45%	vs. 32%	vs. 13%	vs. 48%	vs. 62%
Ciurea et al. <sup>(12)</sup>	HAPLO depleción T	42%	36%	11%	18%	30%	21%
	vs. HAPLO CTX	vs. 16%	vs. 34%	vs. 20%	vs. 7%	vs. 64%	vs. 50%
Bashey et al. <sup>(13)</sup>	Hermano vs. DNE	10%	vs. 34%	27%	11%	53%	76%
	vs. HAPLO CTX	vs. 10%	vs. 34%	vs. 39%	vs. 12%	vs. 52%	vs. 67%
		vs. 4%	vs. 33%	vs. 30%	vs. 4%	vs. 60%	vs. 64%
			@ 24 meses		@ 24 meses	@ 24 meses	@ 24 meses
Bacigalupo et al. <sup>(14)</sup>	Hermano	17%		30%		41%	
	vs. DNE	vs. 34%		vs. 30%	24% global	vs. 39%	
	vs. SCU	vs. 34%	26-36% (p NS)	vs. 14%	vs. 12% HAPLO CTX	vs. 36%	NR
	vs. HAPLO CTX	vs. 17%		vs. 14%		vs. 43%	
						@ 3 años	

CTX: ciclofosfamida, DNE: donante no emparentado, EICH: enfermedad injerto contra huésped, HAPLO: TPH haploidéntico, MRT: mortalidad relacionada con el trasplante, NR: no reportado, NS: no significativo; SG: supervivencia global, SLP: supervivencia libre de progresión

3. Mayumi H, Umesue M, Nomoto K. Cyclophosphamide induced immunological tolerance: an overview. *Immunobiology*. 1996;195:129-139.
4. Luznik L, Jones RJ, Fuchs EJ. High-dose cyclophosphamide for graft-versus-host disease prevention. *Curr Opin Hematol*. 2010;17(6):493-499.
5. Jones RJ. Haploidentical transplantation: repurposing cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012 Dec;18(12):1771-2.
6. Burroughs LM, O'Donnell PV, Sandmaier BM et al. Comparison of outcomes of HLA-matched related, unrelated, or HLA-haploidentical related hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning for relapsed or refractory hodgkin lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 14:1279-1287.
7. Brodsky RA, Luznik L, Bolaños-Meade J, et al. Reduced intensity HLA-haploidentical BMT with post transplantation cyclophosphamide in nonmalignant hematologic diseases. *Bone Marrow Transplant*. 2008 Oct;42(8):523-7.
8. Bolaños-Meade J, Fuchs EJ, Luznik L, et al. HLA-haploidentical bone marrow transplantation with posttransplant cyclophosphamide expands the donor pool for patients with sickle cell disease. *Blood*. 2012 Nov 22;120(22):4285-91.
9. Solomon SR, Sizemore CA, Sanacore M, et al. Haploidentical transplantation using T cell replete peripheral blood stem cells and myeloablative conditioning in patients with high-risk hematologic malignancies who lack conventional donors is well tolerated and produces excellent relapse-free survival: results of a prospective phase II trial. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18(12):1859-66.
10. Raiola AM, Dominiotto A, Ghiso A, et al. Unmanipulated haploidentical bone marrow transplantation and posttransplantation cyclophosphamide for hematologic malignancies after myeloablative conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19(1):117-22.
11. Brunstein CG, Fuchs EJ, Carter SL et al. Alternative donor transplantation after reduced intensity conditioning: Results of parallel phase II trials using partially HLA-mismatched related bone marrow or unrelated double umbilical cord blood grafts. *Blood* 2011; 118: 282-288.
12. Ciurea SO, Mulanovich V, Saliba RM, et al. Improved early outcomes using a T cell replete graft compared with T cell depleted haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18(12):1835-44.
13. Bashey A, Zhang X, Sizemore CA, Manion K, Brown S, Holland HK et al. T-Cell-Replete HLA-Haploidentical Hematopoietic Transplantation for Hematologic Malignancies Using Post-Transplantation Cyclophosphamide Results in Outcomes Equivalent to Those of Contemporaneous HLA-Matched Related and Unrelated Donor Transplantation. *J Clin Oncol*. 2013 Apr 1;31(10):1310-6.
14. Bacigalupo A, Dominiotto A, Di Grazia C, Lamparelli T, Gualandi F, Ibatici A et al. Unmanipulated haploidentical transplants compared with other alternative donors and matched sibling grafts: a single center experience in 488 patients. *Bone Marrow Transplantation* 2013 (S2); Comunicación oral #O383.
15. HJ Symons and EJ Fuchs. Hematopoietic SCT from partially HLA-mismatched (HLA-haploidentical) related donors. *Bone Marrow Transplantation* (2008) 42, 365-377.
16. Kasamon YL, Luznik L, Leffell MS, et al. Nonmyeloablative HLA-haploidentical bone marrow transplantation with high-dose posttransplantation cyclophosphamide: effect of HLA disparity on outcome. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 Apr;16(4):482-9.
17. Symons HJ, Leffell MS, Rossiter ND, et al. Improved survival with inhibitory killer immunoglobulin receptor (KIR) gene mismatches and KIR haplotype B donors after nonmyeloablative, HLA-haploidentical bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 Apr;16(4):533-42.
18. Stern M, Ruggeri L, Mancusi A, Bernardo ME, et al. Survival after T cell-depleted haploidentical stem cell transplantation is improved using the mother as donor. *Blood*. 2008 Oct 1;112(7):2990-5.
19. Ciurea SO, Champlin RE. Donor selection in T cell-replete haploidentical hematopoietic stem cell transplantation: knowns, unknowns, and controversies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013 Feb;19(2):180-4.
20. K. Raj, M. Streetly, M. Kazmi, E. Harrington, L.C. Getzendaner, S.J. Lee, P.V. O'Donnell. Peripheral blood progenitor cell (PBPC) transplantation from haploidentical donors following reduced intensity conditioning (RIC) for high-risk hematologic malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012; 18, (2), S331.

## Immune reconstitution after high dose cyclophosphamide in haploidentical transplantation

HEATHER SYMONS, MD, MHS

Department of Oncology. Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center at Johns Hopkins University. Baltimore, MD, USA

### Background

Allogeneic stem cell transplantation (alloSCT) is a potentially curative treatment for a wide variety of diseases, including hematologic malignancies, hemoglobinopathies, immunodeficiency, and autoimmune disorders, and can be used to induce tolerance in solid organ allografts. Only about 50-60% of patients in need of alloSCT have an HLA-matched sibling or unrelated donor<sup>(1,2)</sup>. In recent years, there has been a vast improvement in the outcomes of HLA-mismatched SCT resulting in reduced toxicities and death.

The kinetics of immune reconstitution and risk of infectious complications appear to be directly correlated. Perhaps the best evidence for this comes from the impact of T cell depletion on immune reconstitution and infections. In the haploSCT setting, rigorous T cell depletion of the graft is associated with less acute graft versus host disease (aGVHD) but is accompanied by profoundly delayed lymphocyte recovery and an increased incidence of both severe infections and non-relapse mortality (NRM)<sup>(3-5)</sup>. Numerous studies have also shown a strong correlation between the absolute lymphocyte count (ALC) after SCT and a variety of outcomes including risk of late cytomegalovirus (CMV) infection, relapse, overall survival (OS), and progression-free survival (PFS).<sup>(6-9)</sup>

Over the past ten years, we have focused on reducing the toxicity of haploSCT while preserving the GVT effect to the ~40% of patients who lack an HLA-matched donor<sup>(10)</sup>. Previous studies at Johns Hopkins with high-dose, posttransplantation cyclophosphamide (PT/Cy) have demonstrated low rates of NRM and serious infections<sup>(10)</sup>. We characterized IREC in forty-nine consecutively engrafting hematologic malignancies patients after nonmyeloablative conditioning, T cell-replete, haploSCT and GVHD prophylaxis including PT/Cy.<sup>(11)</sup> *In vivo* and *in vitro* results discussed below support our hypothesis that PT/Cy's selective killing of alloreactive, rapidly proliferating naïve T cells over resting memory T cells accounts, at least in

part, for superior IREC and low infectious morbidity and mortality after haploSCT. Patients with advanced hematologic malignancies (median age 51, range 14-71; 5 AML, 2 ALL, 4 MDS, 2 CML, 4 CLL, 1 CMML, 25 NHL, 7 Hodgkins, 3 mantle cell) received Cy 14.5 mg/kg/day IV on days -6 and -5, fludarabine 30 mg/m<sup>2</sup>/day IV on days -6 to -2, 200 cGy of TBI on day -1. T cell replete bone marrow was collected from donors with a median age of 44 (range 14-68). GVHD prophylaxis consisted of Cy (50 mg/kg/day) on days 3 and 4, mycophenolate mofetil (MMF) for 30 days, and tacrolimus for 6 months.

Post-transplantation recovery of lymphocyte subsets was notable for the following: 1) The median lymphocyte count at day 30 after transplantation is 250/ $\mu$ l and recovers to over 850/ $\mu$ l by day 60 (Figure 1). This is favorable as ALC's >200 early after SCT have been correlated with superior outcomes; 2) Overall, 74% of patients recover an ALC of >1000/ $\mu$ l after haploSCT. This is favorable as the incidence of patients with ALC recovery >1000/ $\mu$ l has been significantly lower in prior publications; 3) By day 60, CD4+ T cell counts recover to levels in the recipient prior to SCT (Figure 1); 4) CD8+ T cells, and CD19+ B cells recover to pre-transplant donor levels at 1 year post-transplant (Figure 3). CD4+ and CD8+ T cell recovery are favorable as compared to other haploSCT<sup>(12-14)</sup> and cord regimens<sup>(15,16)</sup> and are comparable to that seen after matched related SCT<sup>(17,18)</sup> (Figures 1 and 3); 5) CD56+ T cells recover to pre-transplant donor levels by day 60 post-transplant (Figure 3); and 6) Recovery of CD31+ recent thymic emigrants and CD45RA+ naïve T cells is delayed compared to recovery of memory T cells (Figure 2). Additionally, we saw a statistically improved OS (Figure 4, left panel) and a trend towards an improved PFS (Figure 2, right panel) with an ALC above the median as compared to below the median, which remained significant in multivariate analysis.

*Recovery of donor-derived CMV specific immunity by Day 60 in 12/17 patients after haploSCT with PT/Cy.* Human cytomegalovirus (CMV) is an important pathogen in the setting of hematopoietic SCT, and



assays of CMV-specific T cell frequencies can be used to determine the kinetics of post-transplantation immune reconstitution. Protection from active CMV infection in the alloSCT setting is critically dependent on reconstitution of functional CMV-specific CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells<sup>(19)</sup> or the generation of *de novo* (or new) responses. Using interferon- $\gamma$  elispot, we analyzed the frequency of CMV specific T cells after haploSCT with PT/Cy in 17 patients with CMV+ donors and found that the frequency of CMV-specific T cells returned to the level of the donor pre-transplant by day 60 post-SCT (Figure 5).

*GVHD, infection, or relapse affect reconstitution of the T cell repertoire after haploSCT with PT/Cy.* Defects in reconstituting a broad diversity of T-cell populations may limit the T cell response to infections and the T cell-based graft-versus-leukemia effect<sup>(20)</sup>. We used T cell receptor  $\beta$  chain variable region, complementarity determining region 3 spectratyping to analyze the diversity of the T cell receptor repertoire at 6 months and 12 months after haploSCT in 3 separate populations of patients, 1) those without relapse or GVHD; 2) those with GVHD but no relapse; and 3) those with late relapse. We found that in patients without GVHD, relapse, or active infections, that their T cell receptor repertoire at 6 months post-SCT was as diverse as that of the pre-transplant donor's (Figure 6).

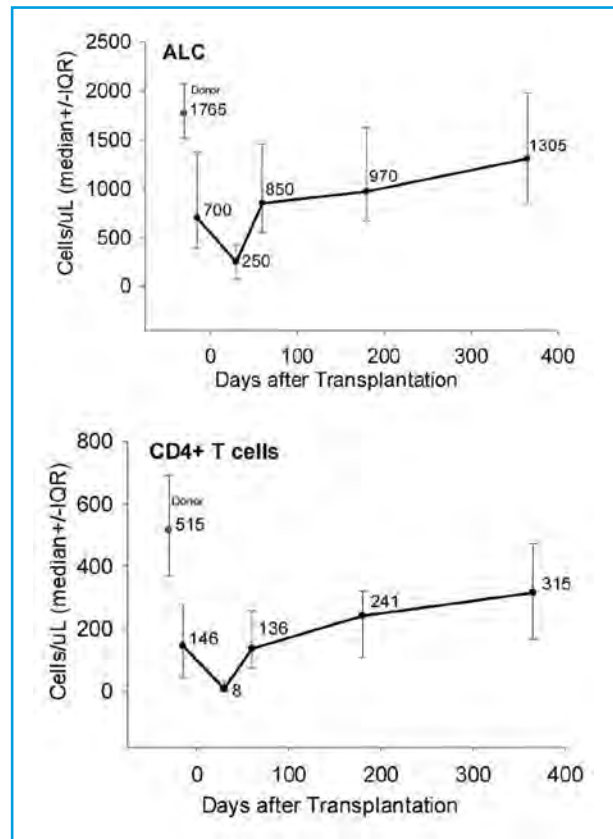


Figure 1. Phenotypic immune reconstitution (ALC, CD4<sup>+</sup> T cells).

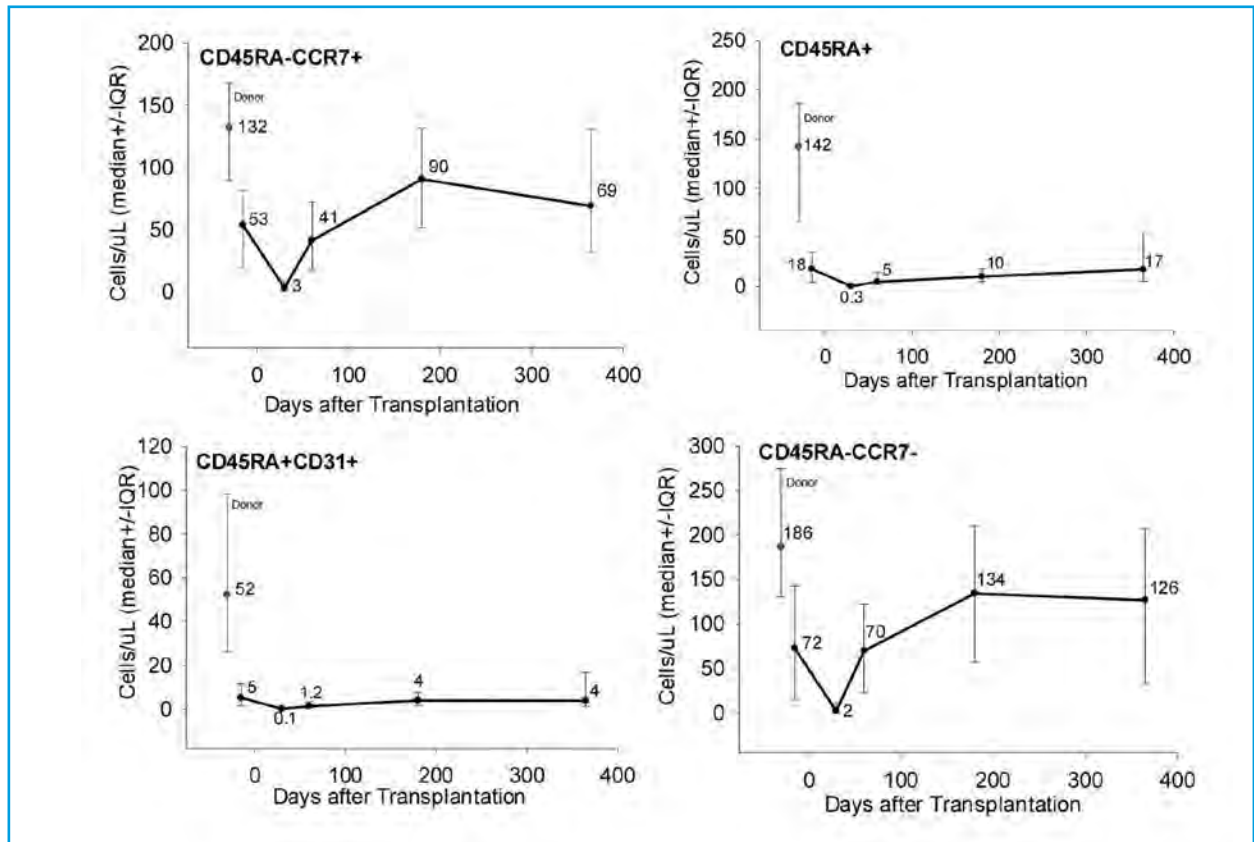


Figure 2. Phenotypic immune reconstitution (naïve and memory T cells).

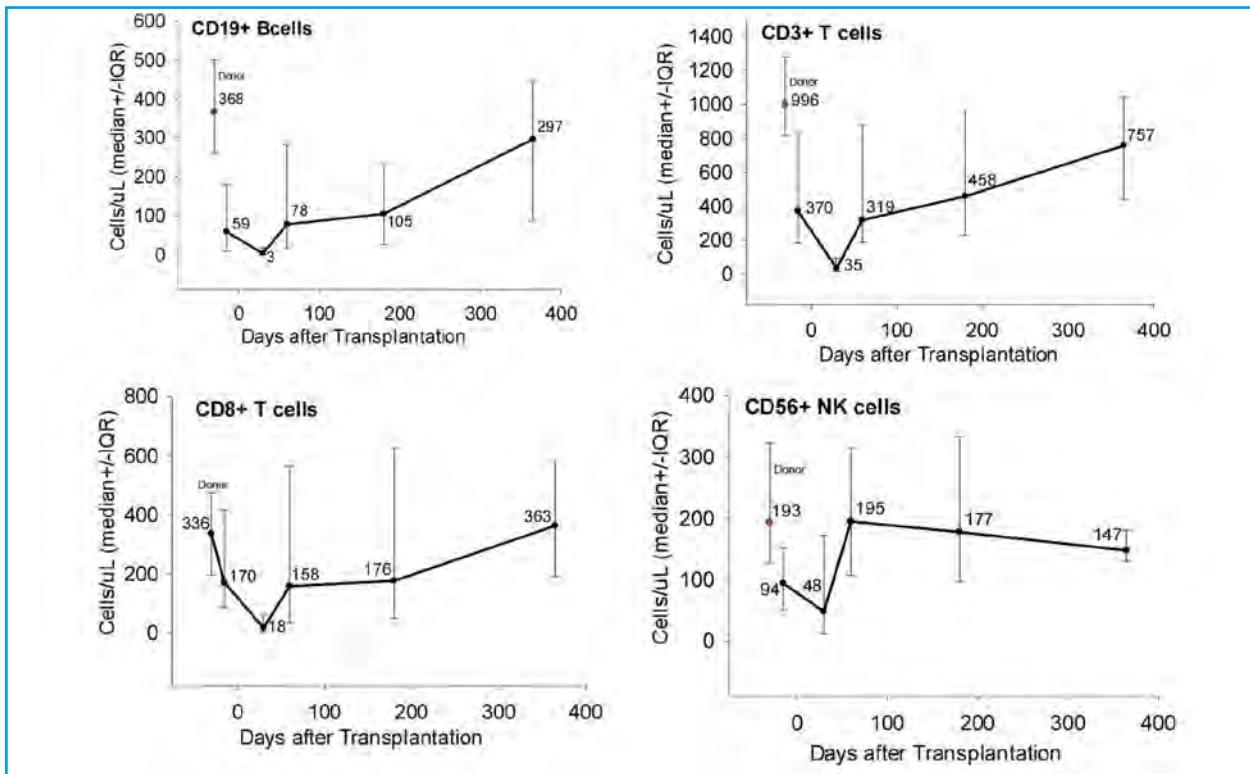


Figure 3. Phenotypic immune reconstitution (B cells, T cells, NK cells).

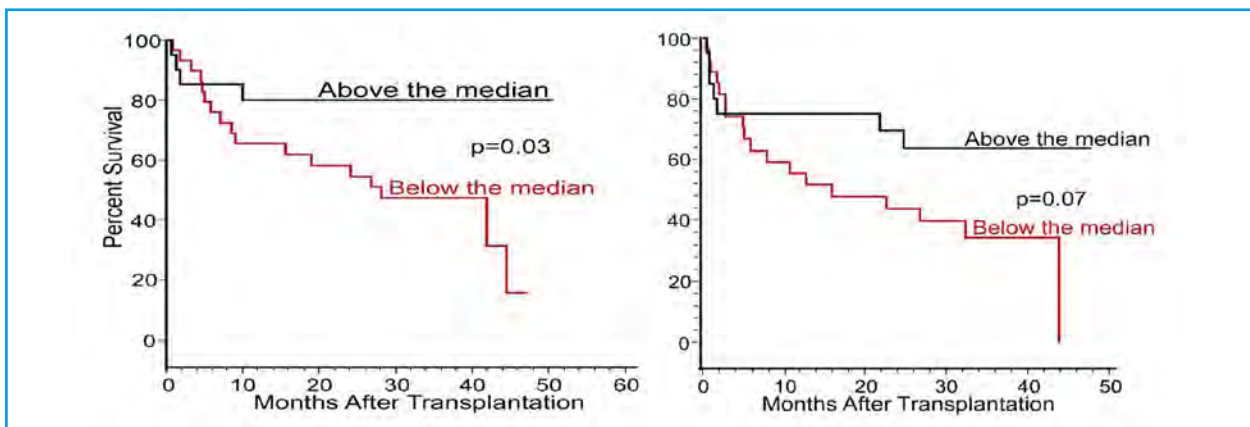


Figure 4. ALCs and outcomes.

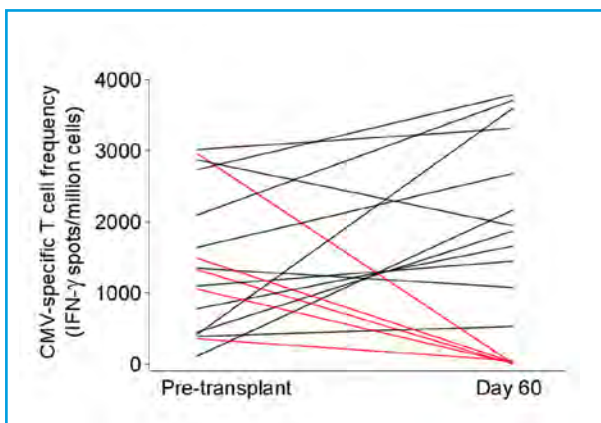


Figure 5. CMV-specific T cell frequency.

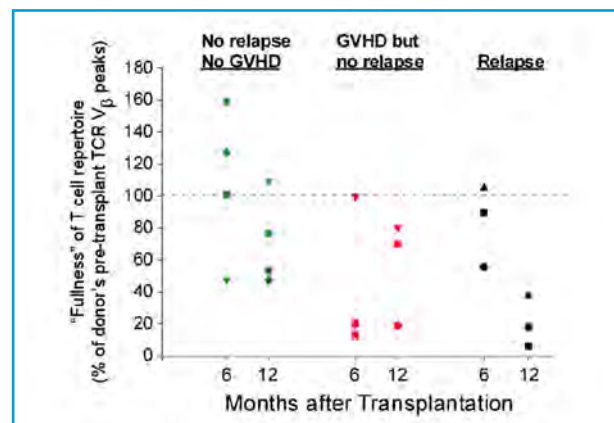


Figure 6. V  $\beta$  spectratyping.

*Incidence of severe infections after haploSCT with PT/Cy.* Morbidity and mortality from severe infections have been particularly problematic after haploSCT<sup>(3,14)</sup> employing extensive T cell depletion. In contrast, none of the haploSCT patients that Hopkins performed IREC studies in (n=49) died from infection. As well, there were low rates of severe infections as follows: Definite or probable viral infections included: Hemorrhagic cystitis (BK+): 37% (18/49) and other (HSV, RSV, influenza, parainfluenza, VZV: 18% (9/49). Proven or probable invasive fungal infections included lower respiratory: 8% (4/49) and disseminated: 2% (1/49).<sup>(13)</sup> The incidence of severe bacterial, viral, and fungal infections on the BMT CTN haploSCT trial was 28%.<sup>(21)</sup>

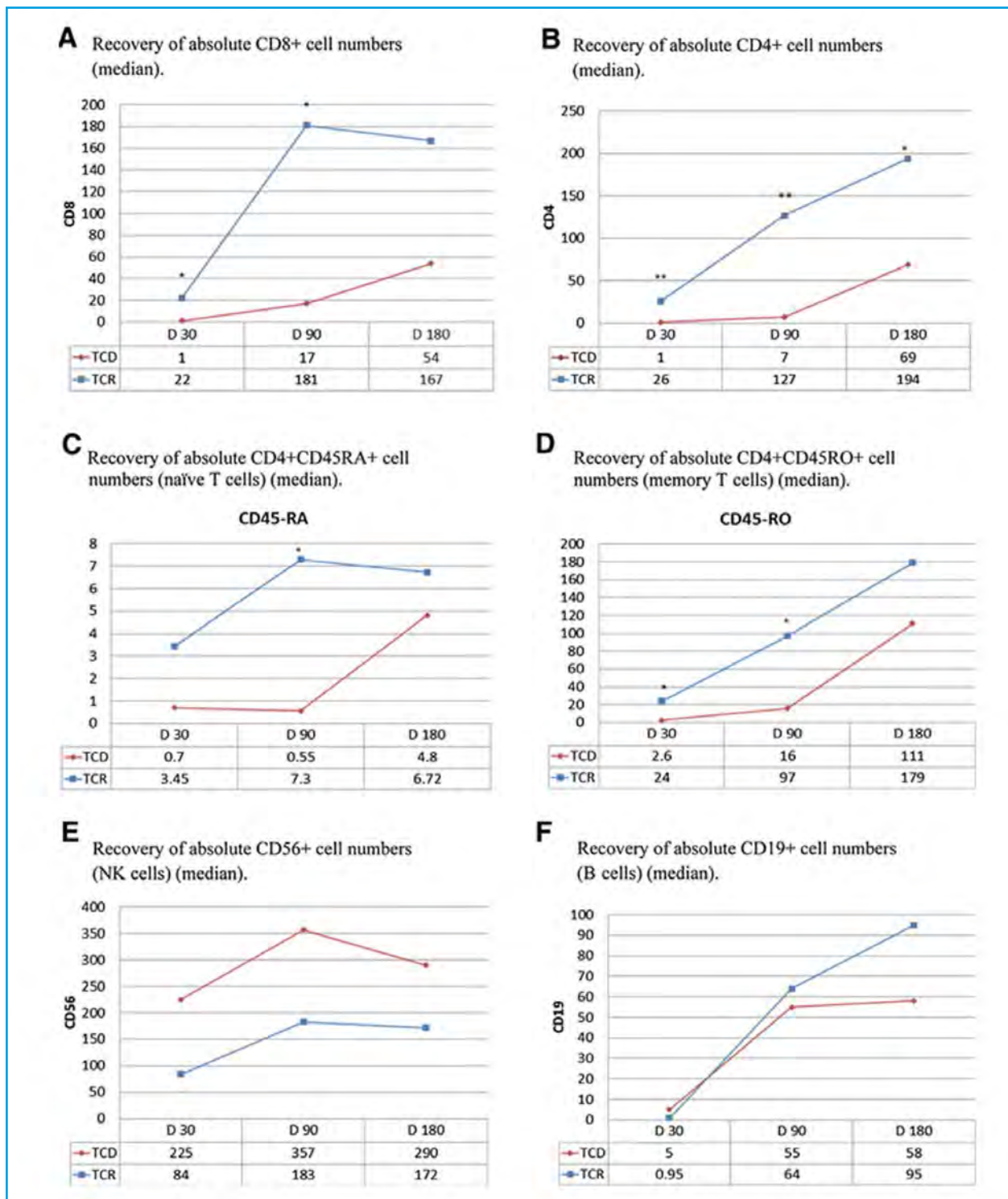
Ciurea *et al.* has also shown improved NRM after T cell replete (TCR) haploSCT as compared with T cell deplete (TCD) haploSCT.<sup>(22)</sup> The T cell replete group was accompanied by a better immune reconstitution of T cell subsets in the first 6 months posttransplantation (Figure 7). On day 30 posttransplantation, a 20-fold greater number of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells were observed among evaluable patients in the TCR group (N=18) compared to the TCD group (N=7). The median number of absolute CD4<sup>+</sup> cells in the TCR group was 26 versus 1/mL (P = .00084; N = 25), and the median number of absolute CD8<sup>+</sup> cells was 22 versus 1/mL (P = .006; N = 25), respectively. The CD4<sup>+</sup> T cells remained significantly lower in the TCD group until after day 180, when the median absolute CD4<sup>+</sup> count was 194/mL in the TCR compared with 69/mL in the TCD group (P = .04). The absolute CD8<sup>+</sup> counts also seemed to be higher at day 180 in the TCR group (median 167 versus 54/mL); however, it did not reach statistical significance (P = .40). Improved immune reconstitution was also noted for naive and memory T cells in the TCR group. The median absolute numbers of CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> (naive T cells) and CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> (memory T cells) were higher at day 30 and at day 90 posttransplantation, 3.4 versus 0.7/mL and 7.3 versus 0.55/mL for the naive T cells, and 24 versus 2.6/mL and 97 versus 16/mL for the memory T cells between the TCR and the TCD groups, respectively. Interestingly, there was a higher proportion of CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells at all time points in the TCD group, although these differences were not statistically significant. The number of CD19<sup>+</sup> B cells was similar between the 2 groups during the first 6 months posttransplantation. After day 180, there were no significant differences in any lymphocyte subsets.

Additionally, the incidence of viral and fungal infections was significantly lower when compared to the TCD group. There was a trend for a lower probability of developing any infection in the first 6 months posttransplantation in the TCR group (P =

.06). Viruses were the most common cause of infection in both groups. During the first 180 days posttransplantation, there were 22 episodes per 1000 patient-days in the TCD group and 11 episodes per 1000 patient-days in the TCR group during the first 180 days posttransplantation. Patients in the TCD group were 1.5 times (95% confidence interval [CI]: 1.03-2.1) more likely to develop a viral infection (P = .035) during this time period. Among the viral infections, CMV reactivation and human polyomavirus BK cystitis were the most frequent. Fourteen of 33 patients (42.2%) had CMV reactivation with a total of 30 episodes in the TCD group compared with 15 of 32 patients (46.8%) with 24 episodes in TCR group. For human polyomavirus BK cystitis, 15 of 33 cases (45.4%) were found in the TCD group versus 11 of 32 (34.4%) in the TCR group. There was no significant difference in the incidence of bacterial infections between the 2 groups. Thirty-two bacterial infections occurred in the TCR group compared with 38 episodes in the TCD group. On average, 7 and 10 episodes occurred per 1000 patient-days for the TCR and TCD group, respectively. Invasive fungal infections were third in frequency, with 12 episodes in 11 of 33 patients (33%) in the TCD group, and only 3 episodes in 3 of 32 patients (9%) in the TCR group. The TCR group had a significantly lower probability of having a fungal infection (P = .008). Patients in the TCD group were 5.6 times (95% CI: 1.6-20.2) more likely to have an invasive fungal infection within 6 months posttransplantation than those in the TCR group. Survival analysis revealed a significantly lower probability of death from an infection in the TCR group. The NRM attributed to infections was 24% in the TCD group and 9% in the TCR group (P = .01)

### Selective T cell killing by PT/Cy

We have hypothesized that PT/Cy's selective killing of alloreactive, rapidly proliferating naive T cells over resting memory T cells accounts, at least in part, for superior IREC and low infectious morbidity and mortality after haploSCT. To examine the differential sensitivity of memory T cell subsets to Cy, peripheral blood lymphocytes (PBL) from human volunteers vaccinated with live attenuated Yellow Fever (YF) vaccine were incubated for 30 minutes with 4-HC, the active metabolite of Cy. FACS analysis demonstrated a significant reduction in both T<sub>N</sub> (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) and central memory (T<sub>C<sub>M</sub></sub>) cells (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) (Figure 8), leaving a population that was largely CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>. Surviving CD8<sup>+</sup> T cells (and to a lesser extent CD4<sup>+</sup> cells; not shown), were enriched for cells expressing the co-stimulatory molecule CD27 (Figure 8, right panels). Interestingly, among these CD27<sup>+</sup> cells, two populations express-



**Figure 7.** Recovery of T cell subsets after transplant in T cell replete (TCR) and T cell depleted (TCD) haploidentical stem cell transplantations. (A) Absolute CD8<sup>+</sup> cell numbers (median). (B) Absolute CD4<sup>+</sup> cell numbers (median). (C) Absolute CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> cell numbers (naïve T cells) (median). (D) absolute CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> cell numbers (memory T cells) (median). (E) Absolute CD56<sup>+</sup> cell numbers (natural killer [NK] cells) (median). (F) Absolute CD19<sup>+</sup> cell numbers (B cells) (median).

ing the IL-7 receptor  $\alpha$  chain (CD127) were revealed (dim and bright), which were also present in untreated cells but were enriched after 4-HC (Levitsky, unpublished data). IL-7 receptor signaling is associated

with induction of the anti-apoptotic genes Bcl-2 and Bcl-xL, perhaps contributing to their survival. These preliminary *in vitro* data are consistent with selective naïve T cell killing by Cy, sparing populations of

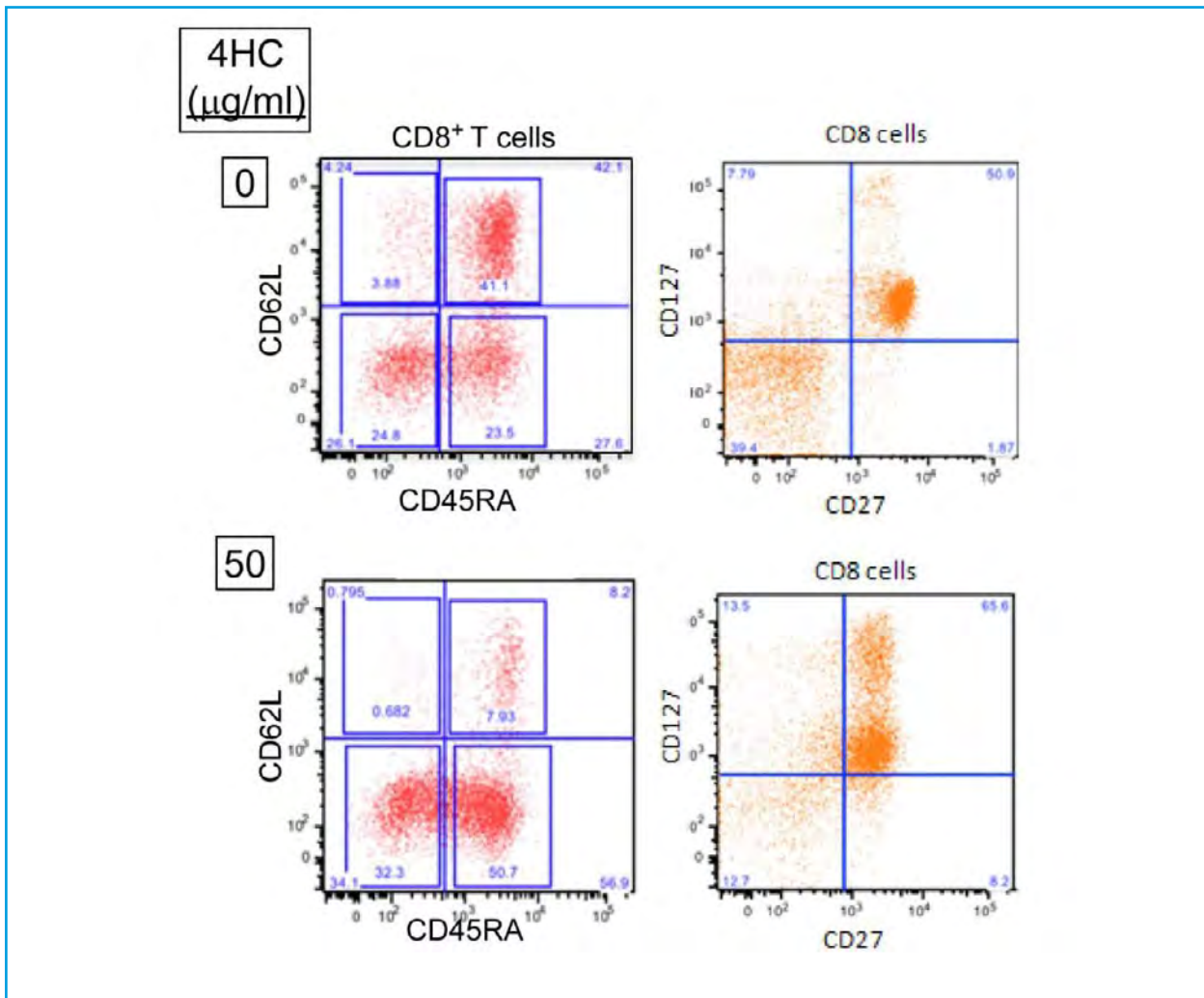


Figure 8. Selective T cell killing by PT/Cy.

memory T cells having the potential for engraftment, expansion, and effector functions.

### Conclusion

In conclusion, haploSCT with PT/Cy has allowed for less infectious complications and lower NRM. Immune reconstitution in this setting is promising and PT/Cy's selective killing of rapidly proliferating, alloreactive T cells over resting, memory T cells is likely one explanation of these promising results.

### References

1. Beatty PG, Boucher KM, Mori M, Milford EL. Probability of finding HLA-mismatched related or unrelated marrow or cord blood donors. *Human Immunology* 2000;61:834-840.
2. Tiercy JM, Nicoloso G, Passweg J et al. The probability of identifying a 10/10 HLA allele-matched unrelated donor is highly predictable. *Bone Marrow Transplant* 2007;40:515-522.
3. Aversa F, Terenzi A, Tabilio A et al. Full Haplotype-Mismatched Hematopoietic Stem-Cell Transplantation: A Phase II Study in Patients With Acute Leukemia at High Risk of Relapse. *Journal of Clinical Oncology* 2005;23:3447-3454.
4. Henslee-Downey PJ, Parrish RS, Macdonald JS et al. Combined in vitro and in vivo T lymphocyte depletion for the control of graft-versus-host disease following haploidentical marrow transplant. *Transplantation* 1996;61:738-745.
5. Dey BR, Spitzer TR. Current status of haploidentical stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2006;135:423-437.
6. Boeckh M, Leisenring W, Riddell SR et al. Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and T-cell immunity. *Blood* 2003;101:407-414.
7. Kim DH, Kim JG, Sohn SK et al. Clinical impact of early absolute lymphocyte count after allogeneic stem cell transplantation. *British Journal of Haematology* 2004;125:217-224.
8. Le Blanc K, Barrett AJ, Schaffer M et al. Lymphocyte Recovery Is a Major Determinant of Outcome after Matched Unrelated Myeloablative Transplantation for Myelogenous Malignancies. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2009;15:1108-1115.
9. Tedeschi SK, Jagasia M, Engelhardt BG et al. Early lymphocyte reconstitution is associated with improved transplant outcome after cord blood transplantation. *Cytherapy* 2010;13:78-82.

10. Luznik L, O'Donnell PV, Symons HJ et al. HLA-Haploidentical Bone Marrow Transplantation for Hematologic Malignancies Using Nonmyeloablative Conditioning and High-Dose, Posttransplantation Cyclophosphamide. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2008;14:641-650.
11. Symons HJ, Kesserwan C, Kos F et al. Favorable Immune Reconstitution After Nonmyeloablative, T-Cell Replete, HLA-Haploidentical BMT with Post-Transplant Cyclophosphamide. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2011;118:1009.
12. Federmann B, Hagele M, Pfeiffer M et al. Immune reconstitution after haploidentical hematopoietic cell transplantation: impact of reduced intensity conditioning and CD3/CD19 depleted grafts. *Leukemia* 2011;25:121-129.
13. Rizzieri DA, Koh LP, Long GD et al. Partially Matched, Nonmyeloablative Allogeneic Transplantation: Clinical Outcomes and Immune Reconstitution. *Journal of Clinical Oncology* 2007;25:690-697.
14. Bethge WA, Haegele M, Faul C et al. Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults with reduced-intensity conditioning and CD3/CD19 depletion: fast engraftment and low toxicity. *Exp.Hematol.* 2006;34:1746-1752.
15. Komanduri KV, John LS, de Lima M et al. Delayed immune reconstitution after cord blood transplantation is characterized by impaired thymopoiesis and late memory T-cell skewing. *Blood* 2007;110:4543-45.
16. Ruggeri A, Peffault de Latour R, Carmagnat M et al. Outcomes, infections, and immune reconstitution after double cord blood transplantation in patients with high-risk hematological diseases. *Transplant Infectious Disease* 2011;13:456-465.
17. Petersen SL, Ryder LP, Bjork P et al. A comparison of T-, B- and NK-cell reconstitution following conventional or nonmyeloablative conditioning and transplantation with bone marrow or peripheral blood stem cells from human leukocyte antigen identical sibling donors. *Bone Marrow Transplant* 2003;32:65-72.
18. Storek J, Dawson MA, Storer B et al. Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *Blood* 2001;97:3380-3389.
19. Tormo N, Solano C, Benet I et al. Reconstitution of CMV pp65 and IE-1-specific IFN-gamma CD8+ and CD4+ T-cell responses affording protection from CMV DNAemia following allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2011;46:1437-1443.
20. Talvensaari K, Clave E, Douay C et al. A broad T-cell repertoire diversity and an efficient thymic function indicate a favorable long-term immune reconstitution after cord blood stem cell transplantation. *Blood* 2002;99:1458-1464.
21. Brunstein CG, Fuchs EJ, Carter SL et al. Alternative donor transplantation after reduced intensity conditioning: results of parallel phase 2 trials using partially HLA-mismatched related bone marrow or unrelated double umbilical cord blood grafts. *Blood* 2011;118:282-288.
22. Ciurea Stefan O, Mulanovich Victor, Saliba Rima M, et al. Improved Early Outcomes Using a T Cell Replete Graft Compared with T Cell Depleted Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation . *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2012;18:, Issue 12, 1835–1844.

## **Actualización en el diagnóstico y tratamiento de los síndromes mielodisplásicos**

COORDINADORES: JOSÉ FRANCISCO FALANTES GONZÁLEZ. *Servicio de Hematología.  
Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla*  
JOAQUÍN SÁNCHEZ GARCÍA. *Servicio de Hematología.  
Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba*

## Diagnóstico integrado de los síndromes mielodisplásicos primarios: datos clínicos, morfología, inmunofenotipo, citogenética y biología molecular

T. VALLESPÍ<sup>1</sup>, C. SÁNCHEZ-MORATA<sup>2</sup>, M. ORTEGA<sup>1</sup>, L. ARENILLAS<sup>3</sup>, L. GALLUR<sup>4</sup>, M. NAVARRETE<sup>2</sup>, N. MARTÍNEZ-MORGADO<sup>1</sup>, M. AZNAR<sup>1</sup>, J. MONTORO<sup>5</sup>, D. VALCÁRCEL<sup>5</sup>, C. PALACIO<sup>4</sup>, L. FLORENSA<sup>3</sup>

Unidades de Diagnóstico en Hematología: <sup>1</sup> Citogenética; <sup>2</sup> Citología; <sup>4</sup> Inmunofenotipo;

<sup>5</sup> Servicio de Hematología Clínica. Hospital Universitario Vall d'Hebron. Barcelona.

<sup>3</sup> Laboratori de Citologia Hematològica. Escola de Citologia Hematològica S. Woessner. Hospital del Mar. Barcelona

### Introducción

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) son un grupo heterogéneo de neoplasias hematopoyéticas clonales malignas que se caracterizan por la presencia de alteraciones morfológicas y funcionales de las células de las diferentes líneas hematopoyéticas y grados variables de anemia, leucopenia y trombocitopenia a pesar de una médula ósea normocelular o hiper celular. Presentan un curso clínico variable, con una supervivencia mediana inferior a 2 años, que está en estrecha relación con el subtipo de SMD, y frecuentemente evolucionan a leucemia aguda<sup>(1,2)</sup>.

Los SMD se pueden clasificar según su etiología en “primarios” o *de novo* y en “secundarios” a tratamientos previos con agentes citotóxicos por enfermedades neoplásicas (benignas o malignas) o autoinmunes<sup>(1,2)</sup>.

### Diagnóstico de los síndromes mielodisplásicos primarios

El diagnóstico de SMD no es fácil ya que existen muchas enfermedades que causan alteraciones morfológicas (displasia) en las células de la sangre. Hay que tener en cuenta que mielodisplasia no es sinónimo de SMD<sup>(1)</sup>, que no existe un dato patognomónico de SMD y que, en todos los casos con sospecha de SMD, debe excluirse cualquier otra causa de displasia: déficit de factores madurativos (ácido fólico, vitamina B<sub>12</sub>), fármacos que inducen dismielopoyesis, alcoholismo, enfermedades crónicas, alteraciones metabólicas, afecciones renales o hepáticas e infecciones víricas<sup>(2)</sup>.

Por otra parte, el hallazgo de cualquiera de las enfermedades anteriores no excluye totalmente el diagnóstico de SMD y son necesarios conocimientos suficientes y criterio para discernir si la mielodisplasia hallada se debe toda a la patología de base o es excesiva y por tanto orientarnos hacia un síndrome mielodisplásico (Caso 3).

Finalmente, hay que tener en cuenta que clonalidad no es siempre signo de malignidad y que podemos encontrar alteraciones clonales en enfermedades benignas (Caso 1) que desaparecen cuando se soluciona la causa (déficit de vitamina B<sub>12</sub>) de la enfermedad.

En el momento actual el diagnóstico de SMD se basa fundamentalmente en las alteraciones morfológicas, pero este diagnóstico viene refrendado por otros estudios que son la citogenética, el inmunofenotipo y la biología molecular. En algún caso especial (hipoplasia, mielofibrosis) la biopsia de médula ósea puede ser de ayuda. La biopsia sirve también para valorar la dismegacariopoyesis y los acúmulos de precursores en situación no paratrabecular (ALIP)<sup>(4)</sup> que se asocian a mal pronóstico si su naturaleza es granulocítica<sup>(5)</sup>.

### Datos clínicos

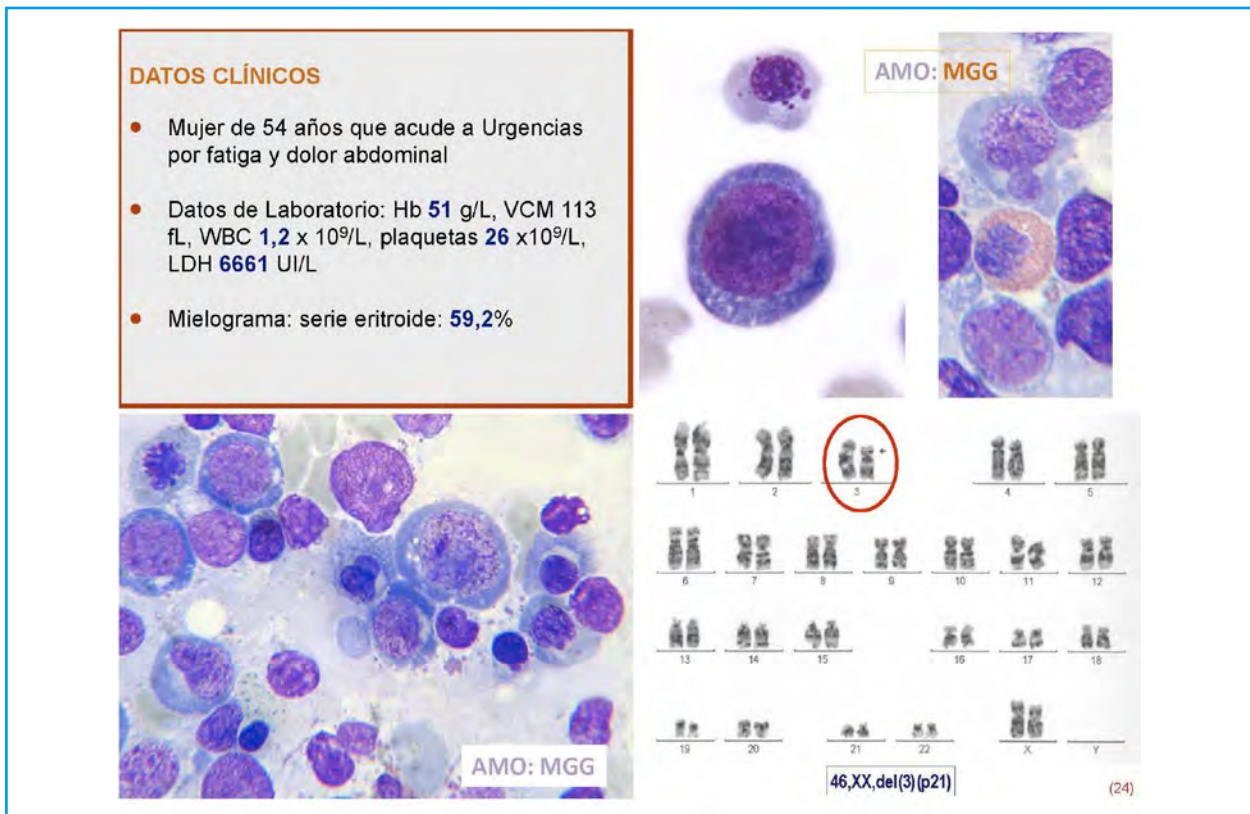
Generalmente son síntomas relacionados con las citopenias. Muchos pacientes presentan dependencia transfusional. La neutropenia o la plaquetopenia aisladas son poco frecuentes.

### Morfología

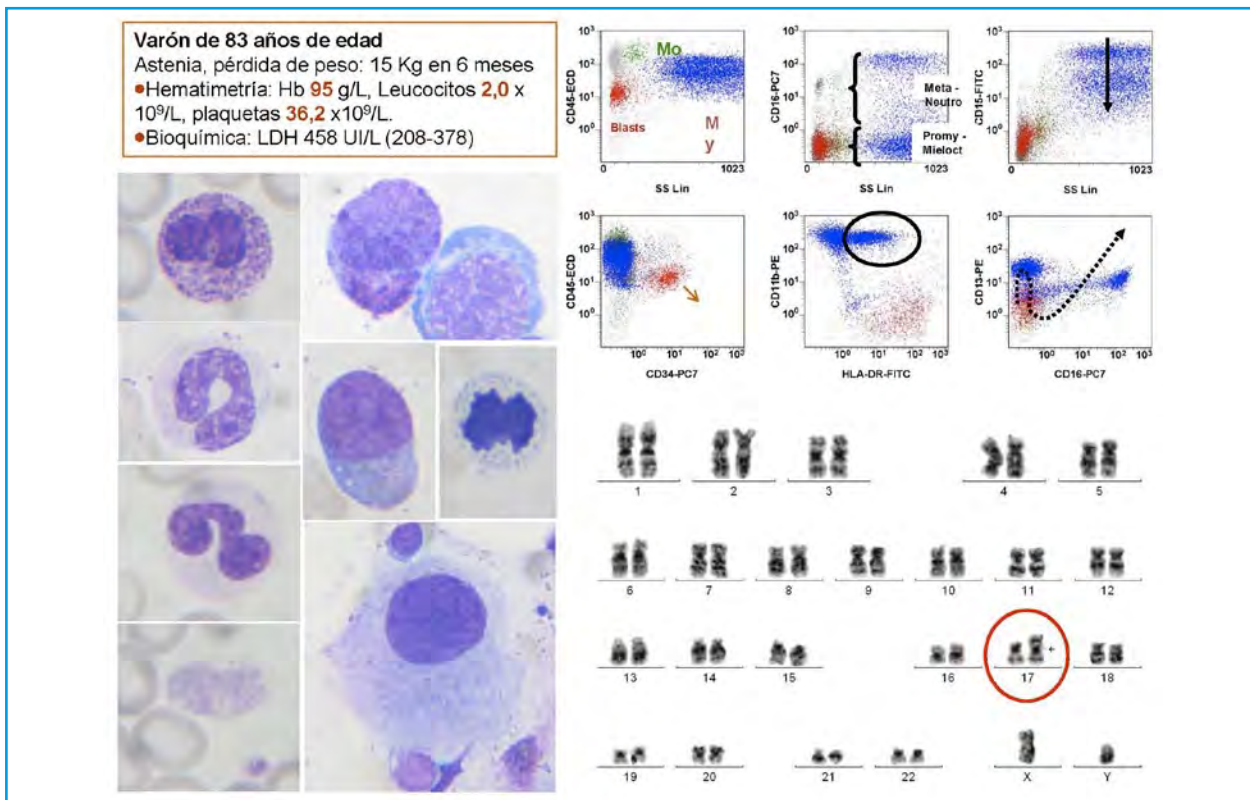
Deben analizarse las alteraciones morfológicas de las células de la sangre y de la médula ósea, y realizar un mielograma calculando el porcentaje de blastos tras contar 500 células.

**Diseritropoyesis:** se estudia en **100 eritroblastos** policromáticos y ortocromáticos principalmente. Las anomalías más características son: multinuclearidad, anomalías en la forma del núcleo, cariorrexis, hernias nucleares, puentes internucleares, pulverización nuclear, megaloblastosis, distribución anómala de la hemoglobina (citoplasma fantasma), punteado basófilo, vacuolización, sideroblastos anillados (tinción de Perls) y eritroblastos PAS positivos (reacción del ácido periódico de Schiff).

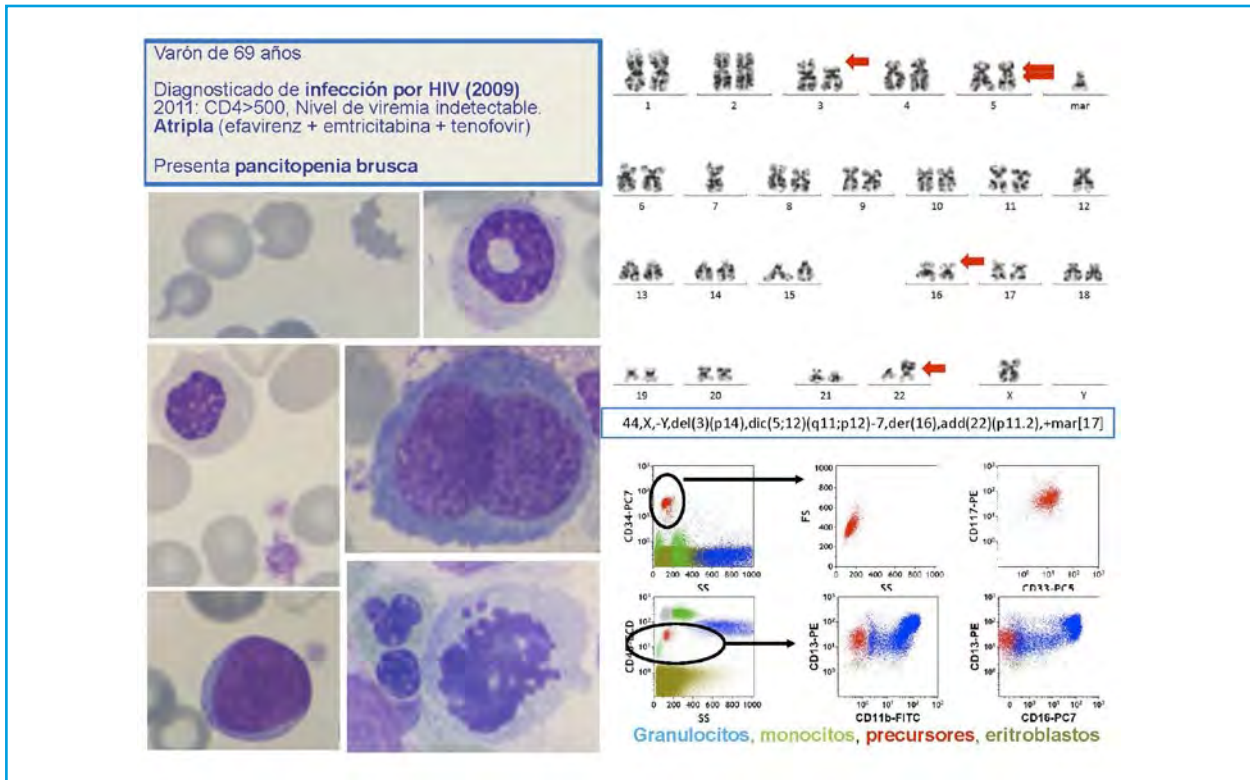




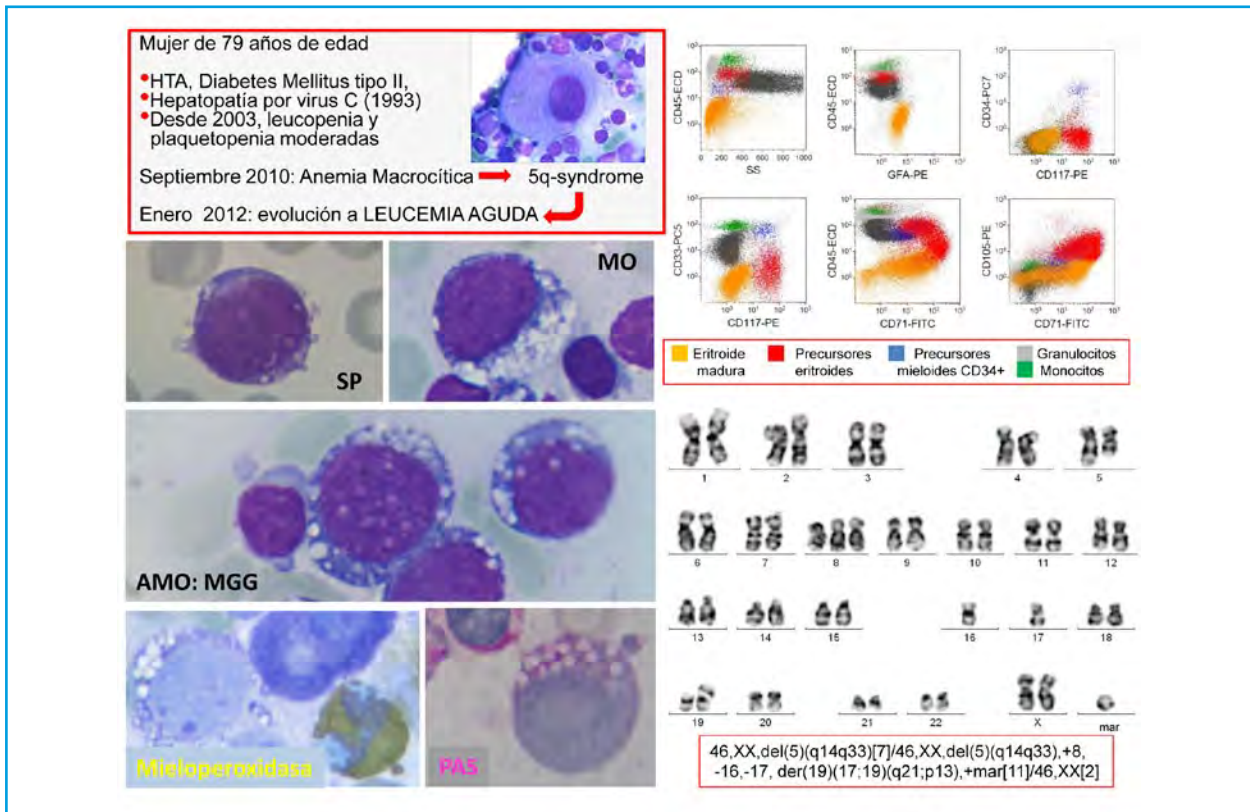
**Caso 1.** Rasgos displásicos (megaloblastosis, contorno anormal del núcleo, cariorrexis, punteado basófilo) y deleción del brazo corto del cromosoma 3 en una paciente con anemia megaloblástica por déficit de B<sub>12</sub>.



**Caso 2.** Dismielopoyesis en las tres series: punteado basófilo, cariorrexis, desgranulación e hipergranulación y cuerpos de Döhle. Alteraciones inmunofenotípicas y megacariocito con núcleo hiposegmentado en un paciente con isocromosoma 17.



**Caso 3.** Diseritropoyesis: dacriocito, queratocito, hematíe falciforme y espiculado, eritroblasto en sangre, eritroblasto gigante binucleado en médula ósea, cariorrexis; disgranulopoyesis: núcleo en roscón; dismegacariocitopoyesis: plaqueta con pseudópodos. Aumento de células blásticas y cariotipo complejo.



**Caso 4.** Paciente diagnosticada de síndrome 5q- que evolucionó a leucemia aguda eritroide cuyo cariotipo exhibía una evolución clonal compleja.

**Disgranulopoyesis (100 granulocitos):** hiposegmentación, pseudo-Pelger, núcleo en anillo, núcleo en espejo, hipersegmentación, condensación anómala de la cromatina (*clumping*), desgranulación, hipogranulación, gránulos pseudo-Chédiak, bastones de Auer.

**Dismegacariocitopoyesis (en 30 megacariocitos):** micromegacariocitos, megacariocitos hipobulados, megacariocitos con múltiples y pequeños núcleos<sup>(2)</sup>.

Con los resultados se diagnostica al paciente y se clasifica de acuerdo con los criterios de la OMS (Tabla 1)<sup>(3)</sup>.

En cuanto al **SMD hipoplásico**, sigue sin considerarse como una entidad clínica<sup>(6)</sup>. Lo mismo sucede con el SMD con fibrosis. Recientes trabajos reportan que se encuentra fibrosis en el 17% de los SMD<sup>(7)</sup>, que puede encontrarse en cualquier subtipo, que no se asocia a alteraciones citogenéticas específicas ni constituye una entidad clínica diferenciada pero que su presencia se relaciona con un pronóstico desfavorable<sup>(7)</sup>.

### Citogenética

El estudio del cariotipo es obligatorio ya que implica diagnóstico y es imprescindible para establecer el pronóstico. Se utilizan las técnicas de citogenética convencional con cultivos cortos (24 horas). Según el último estudio del Grupo Germano-Austríaco, realizado sobre 2.072 pacientes con cariotipo patológico,

las anomalías más frecuentes, aisladas o formando parte de un cariotipo complejo, en orden de mayor a menor frecuencia, son: 5q-, -7/7q-, +8, -18/18q-, 20q-, -5, -Y, +21, -17/17p-, inv/t(3q), -13/13q-, +1/+1q, -21, +11, -12, 12p-, t(5q), 11q-, 9q-, t(7q) y -20<sup>(8)</sup>. Como puede observarse, en los SMD son más características las amplificaciones y las deleciones que las translocaciones<sup>(9)</sup>.

Las técnicas convencionales se complementan con las técnicas de FISH pero estas últimas nunca pueden sustituir al cariotipo convencional. Si no se obtuvieran metafases o fueran insuficientes para establecer el cariotipo, es necesario repetir el aspirado de médula ósea y hacer el estudio citogenético debido a la gran repercusión de éste a la hora de establecer el riesgo y adecuar el tratamiento.

El estudio del cariotipo debe de realizarse al diagnóstico, antes de recibir tratamiento y si la enfermedad progresa. Las implicaciones pronósticas de las distintas anomalías citogenéticas se muestran en la Tabla 2.

### Entidades clínico-citogenéticas

Así como el SMD asociado a 5q- como anomalía aislada constituye un síndrome con unas características propias ya definidas por van den Berghe en 1974<sup>(10)</sup>, los estudios llevados a cabo para demostrar que el SMD con 20q- es una entidad clínica distinta ofrecen resultados contradictorios. Los trabajos de Ka-

Tabla 1. SMD: criterios de la OMS

Subtipo	Sangre	Médula ósea
Anemia refractaria (AR) Neutropenia refractaria (NR) Plaquetopenia refractaria (PR) Citopenias refractarias con displasia unilínea (ARJU)	Anemia < 1% blastos Neutropenia < 1% blastos Plaquetopenia < 1% blastos Unipenia o bicitopenia con < 1% de blastos	Unilínea displasia ≥ 10% < 5% blastos < 15% sideroblastos anillados
AR con sideroblastos anillados (ARSA)	Anemia 0% blastos	≥ 15% sideroblastos anillados sólo Diseritropoyesis < 5% blastos
Citopenia refractaria con displasia multilínea (CRDM)	Citopenia(s) < 1% blastos sin bastones de Auer < 1 x 10 <sup>9</sup> /monocitos	Displasia ≥ 10% en ≥ 2 líneas < 5% blastos sin b. de Auer ± sideroblastos anillados
AR con exceso de blastos tipo 1 (AREB-1)	Citopenia(s) < 5% blastos sin bastones de Auer < 1 x 10 <sup>9</sup> /monocitos	Displasia unilínea o multilínea 5-9% blastos sin b. de Auer
AR con exceso de blastos tipo 2 (AREB-2)	Citopenia(s) 5-19% blastos sin bastones de Auer < 1 x 10 <sup>9</sup> /monocitos	Displasia unilínea o multilínea 5-9% blastos + b. de Auer
SMD inclasificable	Citopenias ≤ 1% de blastos	Si displasia clara en < 10% de una o más líneas mieloides y alteración citogenética = SMD < 5% de blastos
SMD asociado a del(5q) como única anomalía	Anemia < 1% blastos Plaquetas: número normal o aumentadas	Megacariocitos hipobulados < 5% blastos sin b. de Auer

nagal-Shamanna *et al.*<sup>(11)</sup> sobre 27 pacientes y Braun *et al.*<sup>(12)</sup> sobre 62 que asociaban la presencia de 20q- con intensa mielodisplasia han sido refutados tanto por Mullier *et al.*<sup>(13)</sup> (21 pacientes) como por el grupo del MLL de Munich<sup>(14)</sup> que en un estudio de 305 pacientes con del(20q) observan sólo una mínima dis-

plasia en alrededor del 40%. Curiosamente el grupo de Mullier encuentra una asociación significativa entre la presencia de neutrófilos hipogranulares con vacuolización y eritrofagocitosis y el hallazgo de un ider(20q)<sup>(13)</sup>.

### Biología molecular

En este momento, no se incluyen los estudios de genes para el diagnóstico de SMD pero es evidente que las mutaciones de múltiples genes intervienen en la patogénesis y progresión de los SMD, y también que algunas de ellas se asocian a diversas características clínico-biológicas de los SMD. Las mutaciones de TP53, EZH2, ETV6, RUNX1 y ASXL1 predicen una supervivencia más corta independientemente de otros factores pronósticos bien establecidos<sup>(15)</sup>.

Recientemente, en un trabajo conjunto del Grupo francés de SMD y el de enfermedades mieloproliferativas, se ha demostrado que en los SMD la mutación del JAK2V617K se asocia a pronóstico favorable<sup>(16)</sup>.

**Tabla 2. SMD: Sistema de puntuación en base a las anomalías cromosómicas (Haase, Greenberg)**

Grupo pronóstico	Anomalías citogenéticas
Muy favorable	-Y del(11q)
Favorable	Normal, del(5q), del(12p), del(20q), doble incluyendo del(5q)
Intermedio	del(7q), +8, +19, i(17q), o cualquier otra anomalía única, o dos clones independientes
Desfavorable	-7, inv(3)/del(3q), doble incluyendo -7/del(7q), complejo (3 anomalías)
Muy desfavorable	Muy complejo: < 3 anomalías

**Tabla 3. Estudios requeridos para valorar la displasia por citometría de flujo (adaptado de Westers *et al.*)**

Médula ósea	Estudio recomendado	Alteración
Progenitores granulocíticos y monocíticos	% de células en células nucleadas totales Expresión de CD45 Expresión de CD34 Expresión de CD117 Expresión de HLA-DRCD45 Expresión de CD45 Expresión asincrónica de CD11b, CD15 Expresión de CD5, CD7, CD19, CD56	Aumentado Pérdida/disminución/aumento Pérdida/disminución/aumento Expresión alta o baja homogénea Pérdida/disminución/aumento Pérdida/disminución/aumento Presencia de marcadores maduros Presencia de marcadores de otra línea
Serie granulocítica en maduración	% granulocitos/% linfocitos SSC granulocitos maduros/SSC linfocitos Relación entre CD13 y CD11b Relación entre CD13 y CD16 Relación entre CD15 y CD10	Disminuido Disminuido Patrón atípico Patrón atípico Patrón atípico (p. ej., pérdida de CD10 en los neutrófilos maduros)
Monocitos	% de células Distribución de los estadios madurativos Relación entre HLA-DR y CD11b Relación entre CD36 y CD14 Expresión de CD13 y CD33 Expresión de CD56	Aumentado/Disminuido Desplazada hacia la inmadurez Patrón alterado Patrón alterado (Homogéneo) Infra/sobreexpresado Presencia de marcadores de otra línea (infidelidad de línea)
Progenitores de células B	Enumeración como fracción del total de CD34+ basada en CD45/CD34/SSC en combinación con CD10 o CD19	Disminuida o ausente
Compartimento eritroide	% de eritroblastos Relación entre CD71 y CD235a Expresión de CD71 Expresión de CD36 % de CD117+ precursores	Aumentado Patrón atípico Disminuido Disminuido Aumentado

### Asociaciones de mutaciones con características citogenéticas y citopenias

Los estudios de Jeromin *et al.*<sup>(17)</sup> del grupo alemán MLL (Munich Leukemia Laboratory) estudian las mutaciones del SF3B1 en 947 pacientes (825 SMD y 122 t-SMD) y encuentran que el SF3B1 se encuentra mutado en el 50,8% de los SMD, sobre todo (100%) en la ARSA y en las CRDM-SA (69,6%), por lo que concluyen que está asociado a la presencia de sideroblastos anillados. Son mutaciones que permanecen estables durante la evolución de la enfermedad.

Este mismo grupo analiza las mutaciones de U2AF1 en 404 casos de SMD y concluye que están más frecuentemente asociadas al subtipo AREB, que los pacientes presentan niveles significativamente más bajos de leucocitos, hemoglobina y plaquetas y que las mutaciones de U2AF1 se asocian con mucha frecuencia a la presencia de del(20q).

Según el estudio de Bejar *et al.*<sup>(15)</sup>, los genes mutados que más frecuentemente se asocian con un cariotipo específico son el TET2 y el TP53. Mientras que las mutaciones de TET2 están sobreexpresadas en los SMD con cariotipo normal ( $p = 0,005$ ), las de TP53 se observan en los pacientes con cariotipo complejo ( $p < 0,001$ ). De hecho, 8 de los 33 casos con TP53 mutado (24,2%) tenían anomalías en 17p13, sugiriendo que la mutación y la pérdida del cromosoma 17p se encuentran muy frecuentemente juntas, lo que hace que desaparezca la actividad supresora del 17p nativo. En contraste, las mutaciones de EZH2, que se localiza en la porción distal del cromosoma 7q no se asocian con las deleciones 7q.

Este mismo grupo de trabajo observa que las mutaciones de RUNX1, TP53 y NRAS se asocian (cada una de ellas) con trombocitopenias graves. Los pacientes con mutaciones de estos genes además tienden a tener un número elevado de blastos.

Finalmente, Mullier *et al.*<sup>(13)</sup> encuentran una asociación frecuente entre la presencia de 20q- y las mutaciones U2AF1, SRSf2 y ASXL1.

### Inmunofenotipo

Actualmente, el papel de la citometría de flujo (CF) en el diagnóstico y pronóstico de los SMD está fuera de duda. Ya en 2009, el Grupo de Trabajo en Citometría de Flujo en los SMD dentro de la European Leukemianet reportó las primeras iniciativas para estandarizar el estudio de los SMD<sup>(18)</sup>. Estas guías se han ido definiendo y, en este momento, recomiendan que la CF en SMD incluya el estudio de anomalías de valor establecido, como la expresión de antígenos aberrantes en los progenitores mieloides así como alteraciones asociadas a la disgranulopoyesis y la dismonocitopoyesis. En la [Tabla 3](#) se exponen

los parámetros recomendados para valorar la displasia por CF<sup>(19)</sup>. Los que parecen ser más reproducibles en estudios multicéntricos son: el porcentaje de mieloblastos respecto a las células nucleadas totales, el porcentaje de linfoblastos B respecto al total de precursores CD34+, la intensidad media de fluorescencia (MFI) de CD45 en los mieloblastos (expresada como la ratio de MFI de CD45 entre mieloblastos y linfocitos), y la distribución de la señal de SSC de los granulocitos (expresada como la ratio entre las modas de las distribuciones de SSC de los granulocitos y de los linfocitos<sup>(20,21)</sup>). Este último parámetro se relaciona con la segmentación y la granularidad (complejidad interna) de los granulocitos. Se considera que existe mielodisplasia cuando hay dos o más alteraciones inmunofenotípicas.

El Grupo de Trabajo cree que el estudio inmunofenotípico debería ser considerado como parte del diagnóstico integrado de los SMD. Más recientemente, en un informe basado en los trabajos de los distintos investigadores postulan que la CF puede ser de gran ayuda en el diagnóstico diferencial entre la AR y la CRDM. También puede ser muy útil en el diagnóstico de la CRUD, en los SMD inclasificables y en la citopenia idiopática de significado incierto (ICUS)<sup>(22)</sup>.

En relación con otros subtipos de la OMS, se ha reportado que el SMD con 5q- muestra un perfil inmunofenotípico específico: incremento de progenitores mieloides (< 2%), expresión aberrante de CD7 en más de un 15% de los progenitores, CD10 y CD71 normales en los granulocitos, ausencia de la expresión aberrante de CD56 en monocitos y disminución de la expresión de CD71 en la serie eritroide<sup>(23)</sup>.

### Resumen

Como en la mayoría de las hemopatías, la integración de todos los datos es fundamental para el diagnóstico de SMD y para adecuar el tratamiento. La morfología, el inmunofenotipo y la citogenética nos darán el diagnóstico del paciente y el pronóstico que puede refinarse con datos evolutivos como las necesidades transfusionales. A la hora de decidir el tratamiento del SMD, deberán tenerse en cuenta las enfermedades asociadas frecuentes debido a que estas enfermedades son propias de personas de edad avanzada. En un futuro próximo las alteraciones moleculares entrarán a formar parte tanto del diagnóstico como del pronóstico de los SMD.

### Agradecimientos

Luis García-Alonso ha contribuido a la realización de las figuras. El trabajo de T. Vallespí ha sido subvencionado en parte por un Proyecto de Colaboración entre el Institut de Recerca Vall d'Hebrón y Celgene (expediente **PR(AG)28/2008**).

## Bibliografía

1. Documentos Consenso Hematología (José F. Tomás, director): Síndromes mielodisplásicos (Guillermo F. Sanz, coordinador). Nova Sidonia (ed.) Madrid, 2008.
2. Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos (GESMD) y Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia. Guías españolas de diagnóstico y tratamiento de los síndromes mielodisplásicos y la leucemia mielomonocítica crónica. Haematologica. Grupo Acción Médica: Madrid 2012.
3. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe E, Pileri SA, Stein H, et al. (Eds.): WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC: Lyon 2008.
4. Ríos A, Cañizo MC, Sanz MA, Vallespí T, Sanz G, Torradella M, Gomis F, Ruiz C, San Miguel JF. Bone marrow biopsy in myelodysplastic syndromes: morphological characteristics and contribution to the study of prognostic factors. *Br J Haematol* 1990;75: 26-33.
5. Mangi MH, Mufti GJ. Primary myelodysplastic syndromes: diagnostic and prognostic significance of immunohistochemical assessment of bone marrow biopsies. *Blood* 1992; 79: 198-205.
6. Schemenau J, Baldus SE, Anlauf M, Blum S, Nachtkamp K, Neukirchen J et al. Hypoplastic myelodysplastic syndromes are not a specific clinical entity. *Leuk Res* 2013; 37 (Suppl 1): S63.
7. Della Porta MG, Malcovati L, Boveri E, Travaglino E, Pietra D, Pascutto C et al. Clinical relevance of bone marrow fibrosis and CD34-positive cell clusters in primary myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 2009; 27:754-62.
8. Haase D. Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol* 2008; 87: 515-26.
9. Costa D, Muñoz C, Carrió A, Nomdedeu M, Calvo X, Sole F et al. Reciprocal translocations in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemias: Review of 5,654 patients with an evaluable karyotype. *Genes Chromosomes Cancer* 2013; 52: 753-63.
10. Van den Berghe H, Michaux L. 5q-, twenty-five years later: a synopsis. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 94:1-7.
11. Kanagal-Shamanna R, Yin CC, Miranda RN, Bueso-Ramos CE, Wang XI, Muddasani R et al. Therapy-related myeloid neoplasms with isolated del(20q): comparison with cases of de novo myelodysplastic syndrome with del(20q). *Cancer Genet* 2013; 206: 42-6.
12. Braun T, de Botton S, Taksin AL, Park S, Beyne-Rauzy O, Coiteux V et al. Characteristics and outcome of myelodysplastic syndromes (MDS) with isolated 20q deletion: a report on 62 cases. *Leuk Res* 2011; 35: 863-7.
13. Mullier F, Daliphard S, Garand R, Dekeyser M, Cornet Y, Luquet I et al. Morphology, cytogenetics, and survival in myelodysplasia with del(20q) or ider(20q): a multicenter study. *Ann Hematol* 2012; 91: 203-13.
14. Bacher U, Haferlach T, Grossmann V, Zenger M, Alpermann T, Meggendorfer M et al. Characterization of 305 patients with myelodysplastic syndromes and 20q-deletion: cytomorphological features, and concomitant cytogenetic and molecular genetic alterations. *Leuk Res* 2013; 37 (Suppl 1): S45.
15. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, Kantarjian H, Raza A, Levine RL, Neuberger D, Ebert BL. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* 2011; 364:2496-506.
16. de Renzis B, Mansat-De Mas V, Wattel E, Beyne-Rauzy O, Knoops L, Cabrespine A et al. Prognostic impact of JAK2V617F mutation in myelodysplastic syndromes: a matched case control study. *Leuk Res Reports* 2013;2:64-66.
17. Jeromin S, Dicker F, Meggendorfer M, Eder C, Grossmann V, Kohlmann A et al. SF3B1 mutations in MDS subgroups and s-AML and their association with cytogenetics and other molecular markers. *Leuk Res* 2013; 37 (Suppl 1): S11.
18. van de Loosdrecht AA, Alhan C, Béné MC, Della Porta MG, Dräger AM, Feuillard J et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from the first European LeukemiaNet working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2009; 94: 1124-34.
19. Westers TM, Ireland R, Kern W, Alhan C, Balleisen JS, Bettelheim et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: a report from an international consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leukemia* 2012; 26: 1730-1741.
20. Ogata K, Della Porta MG, Malcovati L, Picone C, Yokose N, Matsuda A et al. Diagnostic utility of flow cytometry in low-grade myelodysplastic syndromes: a prospective validation study. *Haematologica* 2009; 94: 1066-74.
21. Della Porta MG, Picone C, Pascutto C, Malcovati L, Tamura H, Handa H et al. Multicenter validation of a reproducible flow cytometric score for the diagnosis of low-grade myelodysplastic syndromes: results of a European LeukemiaNet study. *Haematologica* 2012; 97: 1209-17.
22. van de Loosdrecht AA, Ireland R, Kern W, Della Porta MG, Alhan C, Balleisen JS et al. Rationale for the clinical application of flow cytometry in patients with myelodysplastic syndromes: position paper of an International Consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leuk Lymphoma* 2013; 54: 472-5.
23. Oelschlaegel U, Westers TM, Mohr B, Parmentier S, Sockel K, Bornhäuser M et al. Myelodysplastic syndromes (MDS) with a deletion 5q display a specific immunophenotypic profile. *Leuk Res* 2013; 37 (Suppl 1): S47.
24. Vallespí T and García-Alonso L. Atlas of blood cells and blood diseases: Atlas of Integrated Diagnosis in Hematology (ISSN 2014-0045). Website: <http://www.atlasbloodcells.es>

## **Simposio del Grupo Español de Citología Hematológica. Anemia diseritropoyética congénita**

COORDINADORAS: M.<sup>a</sup> ANTONIA DURÁN PASTOR. *Servicio de Hematología.  
Hospital Universitari Son Espases. Palma Mallorca*  
ESPERANZA Tuset ANDÚJAR. *Servicio de Hematología. ICO.  
Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta. Girona*

Las anemias diseritropoyéticas congénitas (ADC) representan un grupo infrecuente de entidades hereditarias, en las que está alterado el proceso de la eritropoyesis, del que resulta una eritropoyesis ineficaz que será responsable de la anemia y de las diferentes anomalías morfológicas de los eritroblastos de la médula ósea que caracterizan a estas enfermedades.

Los primeros casos publicados, como tales, fueron a partir de los años 60 por el grupo de Crookston (Congenital dyserythropoietic anemia. Abstr XIth Congress Internat Soc Hematol. Sydney; 1966) para las ADC de tipo II, y el de Wendt y Heimpel (Kongenitale dyserythropoetische. Anämie bei einem eineiigen Zwillingpaar. Med Klinik 1967) en las de tipo I. Aunque han pasado más de 50 años de estas primeras publicaciones y se ha progresado en esta enfermedad en todos los aspectos, en algunos casos siguen siendo entidades de difícil diagnóstico. Por este motivo junto a las anomalías morfológicas tan características que acompañan a estas entidades, nos ha parecido de interés a nuestro grupo proponer este simposio.

Hasta hace pocos años las alteraciones citomorfológicas características en los eritroblastos han sido la piedra angular del diagnóstico de las ADC y de ello nos hablará la Dra. Elisa Luño, que revisará las anomalías morfológicas tanto a nivel óptico como a nivel ultraestructural.

Más recientemente se han identificado mutaciones en algunos de los genes implicados en la patogenia de estas enfermedades, lo cual ha facilitado su diagnóstico molecular así como su clasificación e identificación de nuevas entidades, por lo que su conocimiento es de gran importancia. De ello nos hablará la Dra. Leticia Ribeiro.

El manejo clínico y terapéutico de estos pacientes puede resultar complejo así como las complicaciones derivadas del mismo. La Dra. Díaz Heredia, con amplia experiencia en el tema, nos comentará al respecto.

Y para finalizar el Dr. Ricardo Bernal nos presentará un caso clínico-citológico que nos ilustrará todos los aspectos comentados en las diferentes ponencias.

## Aspectos citomorfológicos de las anemias diseritropoyéticas congénitas

ELISA LUÑO FERNÁNDEZ

Servicio de Hematología. Hospital Universitario Central de Asturias. Oviedo

### Introducción

El término diseritropoyesis, independiente de la causa que lo origine, implica un trastorno selectivo durante el proceso de maduración de la eritropoyesis y su consecuencia son las anomalías morfológicas de los precursores eritroblásticos y un defecto en la producción de eritrocitos. La diseritropoyesis es un hallazgo común en enfermedades hereditarias y adquiridas, lo que, unido a su variabilidad en la expresión morfológica, puede dificultar el diagnóstico. El término diseritropoyesis relacionado con enfermedades hereditarias fue utilizado por primera vez por Wendt y Heimpel para casos de anemia diseritropoyética congénita (ADC) de tipo I y por Crookston *et al.*<sup>(1)</sup> para casos de ADC de tipo II.

### Clasificación de las ADC

En 1968, Heimpel y Wendt<sup>(2)</sup> propusieron clasificar las ADC en tres tipos, incluyendo un tipo III que había sido descrito por Wolff y Von Hofe en 1951 como “multinuclearidad eritroide familiar”, y por Bergström y Jacobsson<sup>(3)</sup> en 1962 como “eritrorreticulosis hereditaria benigna”. Las ADC son un grupo heterogéneo de enfermedades hereditarias poco frecuentes que se caracterizan por eritropoyesis ineficaz, que implica trastornos morfológicos y funcionales, una morfología característica en médula ósea más evidente a nivel ultraestructural y un variable grado de anemia. Las anomalías morfológicas de los eritroblastos han sido la piedra angular del diagnóstico, pero, tras la identificación de los genes causales de muchas de ellas, el estudio molecular ha adquirido un peso fundamental. Sin embargo, la clasificación de trabajo, clásica, basada en las alteraciones morfológicas y también en hallazgos serológicos y bioquímicos en ADC de tipo II, sigue siendo todavía útil en la práctica clínica. Para su diagnóstico, se requiere evidencia de anemia congénita o hereditaria con ictericia; evidencia de diseritropoyesis ineficaz; mor-

fología típica de los eritroblastos en médula ósea y exclusión de otras diseritropoyesis hereditarias que acompañan a síndromes talasémicos, hemoglobino-patías, déficit homocigoto de piruvato cinasa o a anemias sideroblásticas congénitas, con las que comparten el carácter hereditario y la diseritropoyesis, pero no los rasgos morfológicos, y que además se clasifican por el correspondiente defecto subyacente. Los síntomas de las ADC incluyen anemia de intensidad variable, ictericia, hepatoesplenomegalia y sobrecarga progresiva de hierro, más manifiesta en los tipos I y II. La sobrecarga férrica, presente incluso en pacientes no transfundidos, se debe a un incremento de la absorción del hierro en el tracto intestinal y hemocromatosis, secundarias a eritropoyesis ineficaz, que se asocia a supresión de la expresión de hepcidina en respuesta a una señal de naturaleza desconocida. Elevados niveles de citocinas como GDF15, miembro del factor transformante- $\beta$  o como *twisted* gastrulación (TWSG1)<sup>(4)</sup>, así como elevados niveles en suero de hemojuvelina (HJV)<sup>(5)</sup>, que por un mecanismo competitivo regula negativamente la hepcidina, se han postulado como posibles mediadores de la respuesta que desregula la homeostasis del hierro en las ADC, también incluidas en el grupo de anemias “que acumulan hierro”. Una excepción la constituyen los casos familiares de ADC de tipo III, en los que el componente hemolítico con hemosiderinuria crónica condiciona incluso en ocasiones ferropenia secundaria, a pesar de la diseritropoyesis ineficaz<sup>(6)</sup>.

Los criterios para su clasificación en uno u otro de los tres tipos clásicos se basaban en el patrón de herencia, en las características clínicas, en las alteraciones morfológicas presentes en médula ósea y en los hallazgos serológicos (Tabla 1)<sup>(2)</sup>. Desde 1968<sup>(7)</sup>, se describieron distintas variantes, todas ellas ADC de difícil diagnóstico, con diferencias en el tipo de herencia, en la síntesis de cadenas de globina, variantes serológicas, clínicas y las más difíciles de definir y más numerosas, variantes morfológicas que no permitían encuadrarlas en un subtipo concreto ya definido, algunas de ellas



formas mixtas con sólo algunos de los rasgos morfológicos de ADC tipos I y/o II, o con hallazgos diseritropoyéticos inhabituales adicionales, e incluso con una morfología claramente distinta de la de los tipos

clásicos. En la clasificación propuesta por Wickramasinghe en 1998<sup>(8)</sup>, la anemia diseritropoyética similar al tipo II pero con test serológicos negativos y llamativa multinuclearidad como en la de tipo III, fue incluida como ADC de tipo IV en el grupo de variantes<sup>(9)</sup>, pero desapareció como entidad en posteriores clasificaciones<sup>(10,11)</sup>, ya que algunos de los casos publicados fueron reclasificados como ADC de tipo II al repetir el test de lisis en medio ácido con un mayor número de sueros. Dentro de las ADC variantes, tipos IV-VII (Tabla 2), se fueron incluyendo como grupo casos con tres o más familias no relacionadas, entre ellas, ADC con llamativa eritroblastosis postesplenectomía, ADC con inclusiones intraeritrocitarias, entidad descrita por Wickramasinghe<sup>(1,2)</sup>, asignada como variante VII por Wickramasinghe y Wood<sup>(10)</sup> y que con los criterios de clasificación actuales propuestos por Iolascon *et al.*<sup>(11)</sup> representa un tipo IV/KLF1 mutado<sup>(13)</sup>. Otra variante, considerada extremadamente rara, es la eritropoyesis ineficaz congénita sin displasia eritroide, también publicada por Wickramasinghe<sup>(8)</sup> como ictericia idiopática diseritropoyética. Finalmente, la anemia diseritropoyética con trombocitopenia se incluye en el grupo de variantes XDAT/GATA1 mutado (Val205Met) de la nueva clasificación<sup>(11)</sup>. La falta de criterios definitivos morfológicos, relacionados con el patrón de herencia y sobre todo genéticos, para su asignación, condujo a la superposición de entidades que ha hecho que actualmente se haya impuesto una clasificación, basada en el defecto molecular subyacente en cada una de las ADC (Tabla 3)<sup>(11)</sup>.

**Tabla 1.** Características de las anemias diseritropoyéticas congénitas de tipos I-III

Tipo I	Tipo II	Tipo III
Herencia AR	Herencia AR	Herencia AD
Macrocitosis, ↑ VCM	VCM normal	Megalocitos en frotis
Cambios megaloblásticos	Eritropoyesis normoblástica	Cambios megaloblásticos
Hasta 7% eritroblastos binucleados (ocasionalmente tri- o tetranucleados)	Binuclearidad en eritroblastos maduros (10-35%)	Eritroblastos gigantes mononucleados y multinucleados (hasta 12 núcleos por célula)
Puentes internucleares Cromatina en "esponja" o "queso suizo"	"Dobles membranas" periféricas en eritroblastos y hematías ↓ Glicosilación de banda 3 en SDS-PAGE Test de HAM positivo	Gigantismo y multinuclearidad Hendiduras ( <i>clefts</i> )* intranucleares Lobulación nuclear

\* Inespecíficas

Wickramasinghe SN. *Blood Rev* 1998; 12:178-200

Wickramasinghe SN, Wood WG. *Br J Haematol* 2005; 131:431-446

**Tabla 2.** Características de anemias diseritropoyéticas congénitas variantes

TIPO ADC	SP	MO
<b>IVa</b>	Anemia severa transfusión-dependiente	Marcada hiperplasia eritroide, normoblástica Cambios diseritropoyéticos inespecíficos leves/moderados (marcada irregularidad del núcleo, cariorrexis)
<b>IVb</b>	Anemia moderada	Similar a IVa
<b>V</b>	Hb normal o leve ↓ VCM normal o leve ↑ Hiperbilirrubinemia no conjugada	Hiperplasia eritroide leve o moderadamente megaloblástica o normoblástica Poca o ninguna displasia eritroide
<b>VI</b>	Hb normal o leve ↓ Macrocitosis	Hiperplasia eritroide con marcada megaloblastosis Diseritropoyesis inespecífica
<b>VII</b>	Anemia severa transfusión-dependiente	Marcada hiperplasia eritroide, normoblástica Cambios diseritropoyéticos inespecíficos con núcleos de forma irregular en muchos eritroblastos policromatófilos Inclusiones intraeritroblásticas que semejan precipitados de globinas (no reaccionan con anti-α/β-globina)
<b>ACD con marcada eritroblastosis postesplenectomía</b>	Anemia leve/moderada hipocrómica/normocrómica	Marcada hiperplasia eritroide Cambios diseritropoyéticos inespecíficos con núcleos de forma irregular en muchos eritroblastos policromatófilos Ocasional eritroblastosis postesplenectomía

Wickramasinghe SN, Wood WG. *Br J Haematol* 2005;131:431-446

Tabla 3. Características de diferentes tipos de anemias diseritropoyéticas congénitas

TIPO ADC	I	II	III familiar	III esporádica	IV	Variantes
<b>Herencia</b>	AR	AR	AD	Variable AR/AD espontánea	AD <i>¿de novo?</i>	AR/Ligada X
<b>N.º casos</b>	~ 169	~ 454	3 familias/60	< 20	< 10	> 20
<b>SP</b>	Macroцитos	Normocitos	Megalocitos	Megalocitos	Normocitos Eritroblastosis	Variable
<b>M. óptica MO</b>	Megaloblastosis Puentes internucleares	Normoblástica Binuclearidad Eritroblastos maduros: 30-35%	Megaloblástica Eritroblastos gigantes mono y multinucleados Multinuclearidad (hasta 12 x célula)		Normoblástica Hiperplasia eritroide diseritropoyética Punteado basófilo	Variable
<b>MET<sup>1</sup> MO</b>	Heterocromatina "en esponja"	"Doble membrana" periférica	Hendiduras <i>clefts</i> intranucleares Cariorexix Núcleos de contorno variable y/o con diferente ultraestructura en la misma célula		CDA-I-like CDA-II-like Inclusiones citoplasmáticas atípicas	CDA-I-like CDA-II-like Otras
<b>Test HAM</b>	Negativo	Habitualmente positivo		Negativo	–	–
<b>Glicosilación</b>	Alguna anomalía	Muy anormal	Alguna anomalía	No estudiada	–	–
<b>Gen implicado</b>	<i>CODANINA-1</i>	<i>SEC13B</i>	<i>KIF23</i>	Desconocido	<i>KIF1</i>	Desconocido/ <i>GATA-1</i>
<b>Cromosoma</b>	15q15.1-q15.3	20p11.2	15q21-25	Desconocido	19p13.2	Desconocido/Xp11.23

<sup>1</sup> Microscopio electrónico de transmisión

Iolascon A et al. *Haematologica* 2012;97:1786-1794

Liljeholm M et al. *Blood* 2013; doi:10.1182/blood-2012-10-461392

Jaffray JA et al. *Blood Cells Mol Dis* 2013; Mar 20, doi: 10.1016/j.bcmd.2013.02.006

### Características citomorfológicas de las ADC

La principal causa de anemia en las ADC es la diseritropoyesis, defecto cualitativo en la serie eritroblástica que provoca eritropoyesis ineficaz, aumentada destrucción intramedular de hematíes y sus precursores y con frecuencia una vida media acortada. El patrón de herencia no siempre es fácil de establecer, sobre todo en familias con pocos descendientes y/o en los que la historia familiar es negativa, lo que, unido a la escasa frecuencia de las ADC y al carácter con frecuencia moderado y bien tolerado de la anemia, hace que en más del 60% de los casos, a pesar de la existencia de anemia y/o hiperbilirrubinemia conocidas, el diagnóstico se haga en la edad adulta<sup>(9)</sup>. El estudio morfológico, primer paso para el diagnóstico de todos los tipos de ADC, debe ser seguido de test de confirmación, bioquímicos y genéticos. En médula ósea, hay hiperplasia eritroblástica con elevada proporción de eritroblastos displásicos, que no se acompaña de displasia de las series granulocítica o megacariocítica. Algunas publicaciones de la década

de los 70 sugerían una posible afectación multilineal basada en la observación de anomalías del contorno nuclear en algunos neutrófilos<sup>(14)</sup> y en la presencia de "duplicación de membranas" en las tres series mieloides, pero estos hallazgos no fueron confirmados en publicaciones posteriores. La eritropoyesis ineficaz se refleja en la cifra de reticulocitos, subóptima para el grado de anemia, mientras que existe hiperplasia eritroblástica. La cifra absoluta de reticulocitos suele ser normal, baja o sólo ligeramente elevada. La LDH está aumentada. La hiperbilirrubina indirecta y la disminución o ausencia de haptoglobina son reflejo del aumento de hemólisis intra- y extravascular. Las pruebas ferrocinéticas confirman el aumento del *turnover* del hierro y una reducida utilización del <sup>59</sup>Fe, pero actualmente no se utilizan. Por ello, el diagnóstico de ADC debe ser considerado cuando la respuesta reticulocitaria es subóptima para el grado de anemia, en un paciente con hiperplasia eritroblástica, o cuando existe hiperbilirrubinemia inexplicada o sobrecarga férrica. Puesto que la diseritropoyesis es con frecuencia el resultado de un defecto adquirido de la

*stem cell* y está presente en SMD, leucemias agudas, tras la exposición a tóxicos ambientales u otros tóxicos que afectan a la médula ósea, por deficiencias de B<sub>12</sub>, folato o hierro, o infección por parvovirus B<sub>19</sub>, estas entidades deben ser excluidas. Particularmente en SMD y eritroleucemias, los rasgos diseritropoyéticos pueden imitar a los de las ADC. Entre las pruebas que pueden facilitar el diagnóstico diferencial está el estudio citogenético, ya que las ADC no se asocian con anomalías citogenéticas, y la PAS negatividad eritroblástica.

### Anemia diseritropoyética congénita tipo I

Alrededor de 169 casos han sido registrados en el mundo hasta 2012. La incidencia estimada en Europa, es de 0,24 x 1.000.000 de nacimientos/año<sup>(15)</sup>. El patrón de herencia es autosómico recesivo. A lo largo de la vida la anemia, macrocítica con VCM > 110 fL en el 75% de los casos, suele ser moderada (Hb 80-110 g/L) y no requiere transfusión, excepto en intervenciones quirúrgicas, infecciones intercurrentes o embarazo. Sólo unos pocos casos son transfusión-dependientes. Los síntomas clínicos son muy variables e incluso pueden pasar desapercibidos. En adultos con ADC de tipo I es frecuente la sobrecarga férrica, con niveles de ferritina de entre 600 y 1.500 µg/L e IST elevados en suero, incluso en pacientes no transfundidos. Algunos pacientes tienen hemosiderinuria, que puede prevenir o limitar la sobrecarga férrica.

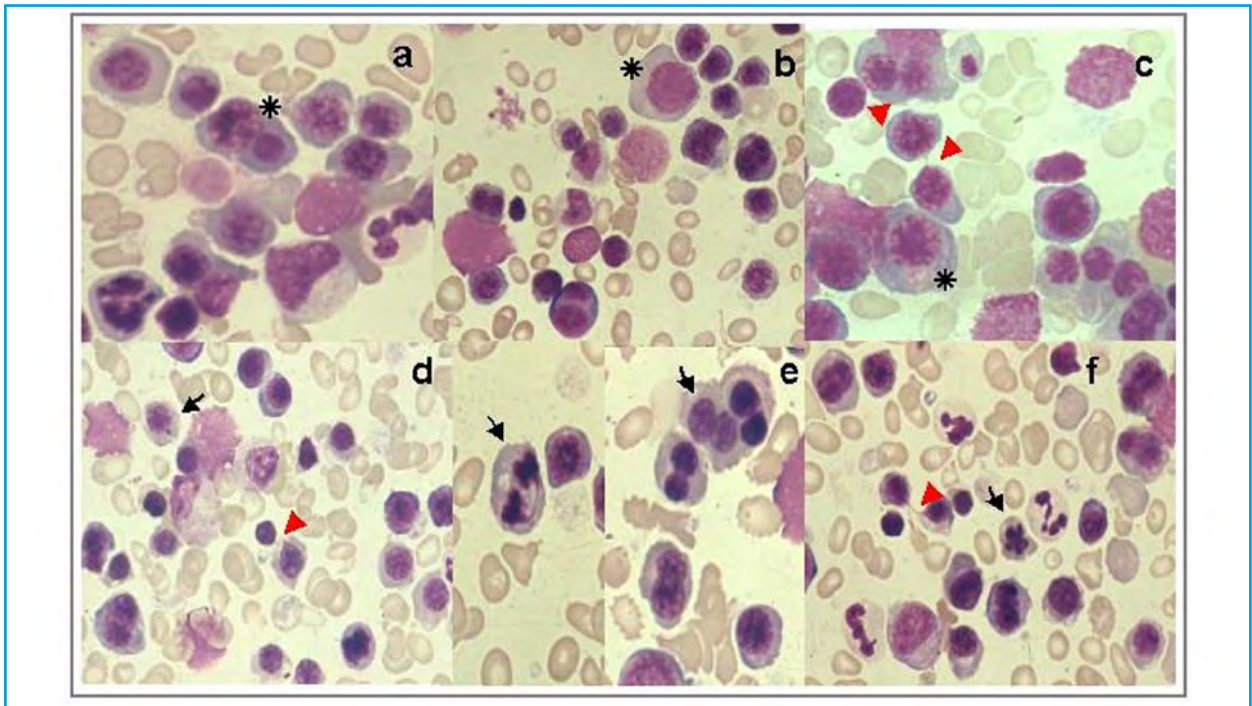
### Hallazgos morfológicos a nivel óptico

En el frotis de sangre periférica, la macrocitos, moderada, es constante, incluso en algunos casos en los que el VCM es normal. Hay anisopoiquilocitosis, eliptocitos, punteado basófilo y, en algunos casos, anillos de Cabot, inclusiones intracitoplasmáticas semejantes a los cuerpos de Howell-Jolly en pacientes no esplenectomizados y eritroblastosis. Cuando la poiquilocitosis es intensa, se asocia a una reducción en la proteína de membrana 4.1. En médula ósea, hay intensa hiperplasia eritroblástica y signos evidentes de diseritropoyesis. Las anomalías de los progenitores eritroides afectan al tamaño celular, al aspecto de la cromatina, a la morfología del o de los núcleos y al aspecto del citoplasma, comienzan por debajo del estadio de proeritroblasto y se hacen más llamativas en los eritroblastos policromatófilos. Los eritroblastos son con frecuencia de tamaño superior al normal, hay cambios megaloblásticos y anisocromía nucleocitoplasmática que hace difícil distinguir entre los policromatófilos y los ortocromáticos, pues el grado de hemoglobinización citoplasmática parece retrasado respecto al núcleo. Las anomalías que afectan a la cromatina en diferentes grados son las más carac-

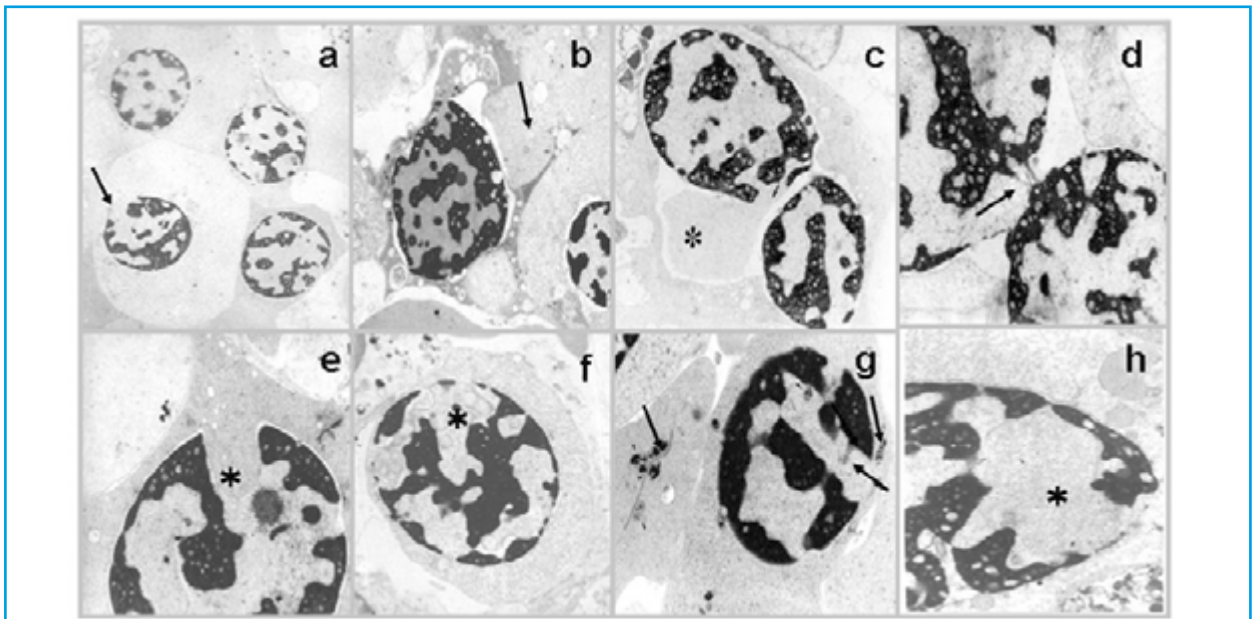
terísticas y numerosas y predominan en la periferia nuclear. Áreas densas, oscuras, hiperromáticas, alternan con áreas translúcidas netamente separadas, como reflejo de la desigual distribución y condensación de la cromatina (Figura 1 a y c). En las células más severamente afectadas, el núcleo puede llegar a ser sólo una masa homogénea por haber perdido la estructura cromatínica (Figura 1 b). Algunos núcleos de gran tamaño ocupan la célula casi por completo y su contorno puede tener forma oval, en balón de rugby o calabaza (Figura 1 e-f). Con menos frecuencia, hay formas tri- y, sobre todo, binucleadas con núcleos de diferentes tamaños y con diferente estructura cromatínica, en los que la separación entre los núcleos no siempre es completa (Figura 1 d-f). Tanto en el núcleo como en el citoplasma la afinidad tintorial está reducida. Son también muy característicos, aunque presentes en escaso porcentaje (0,6-3%)<sup>(10,16)</sup>, los puentes internucleares que unen dos núcleos de una misma célula o células incompletamente divididas (Figura 1 c, d y f). Algunos autores elevan su frecuencia al 20%<sup>(11)</sup> pero probablemente incluyan en este porcentaje otras anomalías relacionadas con la división de los eritroblastos. A nivel citoplasmático puede haber vacuolización y zonas decoloradas por irregular hemoglobinización. Otras anomalías incluyen puentes intercitoplasmáticos, punteado basófilo grueso, cuerpos de Howell-Jolly, mitosis atípicas, fragmentación nuclear, cariorrexis y picnosis (Figura 1 a, d, e y f). Al diagnóstico, suele haber aumento de hierro en el SMF sin sobrecarga ni sideroblastos en anillo, excepto en los casos diagnosticados en edades más avanzadas.

### Hallazgos ultraestructurales

Las alteraciones morfológicas a nivel ultraestructural son características, predominando las alteraciones de las estructuras nucleares de los eritroblastos sobre las citoplasmáticas<sup>(14)</sup>. Cabe resaltar, entre todas ellas, la especial apariencia de la cromatina, las numerosas anomalías de la maduración y forma del núcleo, las alteraciones de la membrana nuclear y los puentes internucleares. Los proeritroblastos presentan rasgos megaloblásticos, pero las anomalías típicas se detectan por debajo de ese estadio y aumentan con la maduración, siendo muy llamativas en los eritroblastos tardíos, principalmente desde el policromatófilo. A nivel nuclear, la "cromatina en esponja" es la anomalía más constante (30-60%) y característica (Figura 2 a-h)<sup>(9-11)</sup>. En la cisterna perinuclear, hay ensanchamiento de los poros nucleares, más numerosos y amplios en las células más maduras, con llamativas invaginaciones y protrusiones de la membrana nuclear de tamaño variable (Figura 2 e). La rotura, frecuente, de los poros nucleares dilatados per-



**Figura 1.** ADC tipo I: a, c) Eritroblastos con anomalías de la cromatina. Áreas densas alternan con áreas traslúcidas en la periferia nuclear. Eritroblasto binucleado cuyos núcleos tienen diferente estructura cromatínica (\*). Mitosis atípica. b) Núcleo que es sólo una masa homogénea (\*). c) Puentes internucleares (puntas de flecha). Inclusión amorfa intracitoplasmática (\*). d) Cuerpo de Howell-Jolly (flecha). Puente internuclear. e) Mitosis atípica. Células con binuclearidad incompleta (flechas). Núcleo en calabaza. f) Núcleos en calabaza. Puente internuclear (punta de flecha). Núcleo en trébol. MGG.



**Figura 2.** ADC tipo I: a-h) Núcleos tardíos con “cromatina en esponja” o “queso suizo”. a y e) Ensanchamiento de los poros nucleares con/sin rotura (flecha, \*). b) Núcleo de contorno irregular con intensa dilatación de la membrana nuclear que engloba áreas citoplasmáticas que han perdido su estructura y presentan un aspecto amorfo (flecha). c) Eritroblasto incompletamente dividido, con dilatación de la membrana nuclear que contiene material amorfo (\*). d) División incompleta. Los dos trozos nucleares están unidos por un puente de cromatina. f) La dilatación de los poros y su rotura permite la entrada de organelas citoplasmáticas en el núcleo (\*). g) Eritroblasto con mitocondrias cargada de micelas ferruginosas que han penetrado en el núcleo a través de la membrana nuclear rota (flechas). Reticulocito con sideroacrestia (flecha). h) Desorganización de la cromatina nuclear que deja una gran área vacía (\*). Microscopía electrónica de transmisión (MET). Doble contraste.

mite la penetración de material citoplasmático en el área nuclear, pudiéndose observar distintas organelas citoplásmicas como *clusters* de ribosomas o mitocondrias cargadas de micelas ferruginosas en casos con sideroacrestia, y también figuras mielínicas (Figura 2 f y g). En ocasiones, la intensa desorganización de la cromatina nuclear conduce a la desaparición de grandes áreas del contorno nuclear (Figura 2 h). El espacio perinuclear está con frecuencia dilatado y en él no es infrecuente encontrar también figuras mielínicas (Figura 2 b-d), que también se pueden identificar en entidades relacionadas como anemias hemolíticas y hemoglobinas inestables. Como resultado de divisiones nucleares incompletas, algunos núcleos tienen forma oval o de balón de rugby, mientras que otros muestran una clara segmentación medial y adoptan forma de calabaza, unidos ambos segmentos por una amplia área (Figura 2 c). Se observan también algunas formas tri- y, sobre todo, binucleadas, cuyos núcleos tienen distinta estructura cromatínica y diferente tamaño. A veces uno de ellos es sólo un pequeño “brote” o trozo nuclear. Son característicos los puentes cromatínicos internucleares, que, procedentes de la zona más marginal de dos núcleos y rodeados de una vaina estrecha de citoplasma, unen dos núcleos de una misma célula o núcleos de dos células diferentes (Figura 2 d), puentes y trozos nucleares que también pueden estar presentes en los SMD y sobre todo en la eritroleucemia. A nivel citoplásmico son frecuentes las invaginaciones y vesículas de rofeocitosis, los *clusters* de ferritina y el depósito de micelas ferruginosas intramitocondriales. Aunque algunos autores consideran que el depósito de micelas ferruginosas intramitocondriales, formando o no un anillo perinuclear, que refleja sideroacrestia y conduce a la degeneración de las crestas e incluso de la membrana mitocondrial, es más frecuente durante la evolución y no al diagnóstico, en distintas publicaciones que tratan de los hallazgos ultraestructurales en esta entidad y en nuestra experiencia, está presente con frecuencia y es más llamativo en los reticulocitos<sup>(14)</sup> (Figura 2 g). Es probable que los casos diagnosticados en la edad adulta contribuyan a este hallazgo. Otras entidades hereditarias en las que la anormal sobrecarga de hierro es característica como la anemia sideroblástica congénita o el síndrome de Pearson, afección congénita caracterizada por anemia sideroblástica y disfunción pancreática exocrina por deleciones en el ADN mitocondrial, no comparten las peculiares características nucleares y/o citoplásmicas de las ADC.

Serológicamente, el test de lisis en medio acidificado es negativo y la aglutinabilidad con anti-i es normal. En algunos casos, el nivel de HbA<sub>2</sub> está aumentado y en otros se han descrito desequilibrios en las cadenas de globina que no indican necesariamente coexistencia de β-talasemia.

El gen responsable de la ADC de tipo I fue mapeado en el cromosoma 15q15.1-q15.3 en 1998, e identificado y designado como *CDAN1* en 2002<sup>(17)</sup>. Codifica la proteína codanina-1 y está mutado en el 89% de los pacientes con ADC de tipo I, por lo que debe existir un *locus* genético alternativo<sup>(11)</sup>.

### Anemia diseritropoyética congénita de tipo II

El número de casos registrados y/o comunicados en el mundo es superior a 454. Es la más frecuente de las ADC, con una prevalencia global en Europa de 0,71 casos x 1.000.000 de nacimientos/año, muy variable entre los distintos países europeos, de 0,04 en Escandinavia a 2,49 en Italia, sobre todo en el Sur<sup>(15)</sup>. Se conoce también por el acrónimo HEMPAS, siglas que hacen referencia a la multinuclearidad y a la positividad del test de lisis en medio acidificado. Se hereda con carácter autosómico recesivo y afecta a la vía normal de diferenciación-proliferación de la línea eritroide<sup>(18)</sup>.

Los hallazgos clínicos incluyen anemia moderada, ictericia (90%), esplenomegalia (70%) o hepatomegalia (45%), también presentes en la esferocitosis hereditaria, entidad con la que se ha confundido con alguna frecuencia ya que, además, el test de fragilidad osmótica da resultados similares en ambas. El diagnóstico puede ser hecho a cualquier edad, y en la práctica clínica, se basa inicialmente en el estudio morfológico de la médula ósea. La anemia sólo suele requerir transfusión en un 10% de los pacientes<sup>(9,10)</sup> y el 7% son transfusión-dependientes<sup>(11)</sup>. La incidencia de manifestaciones clínicas de sobrecarga férrica incluso en pacientes no transfundidos es aproximadamente del 20%<sup>(10)</sup>.

### Hallazgos morfológicos a nivel óptico

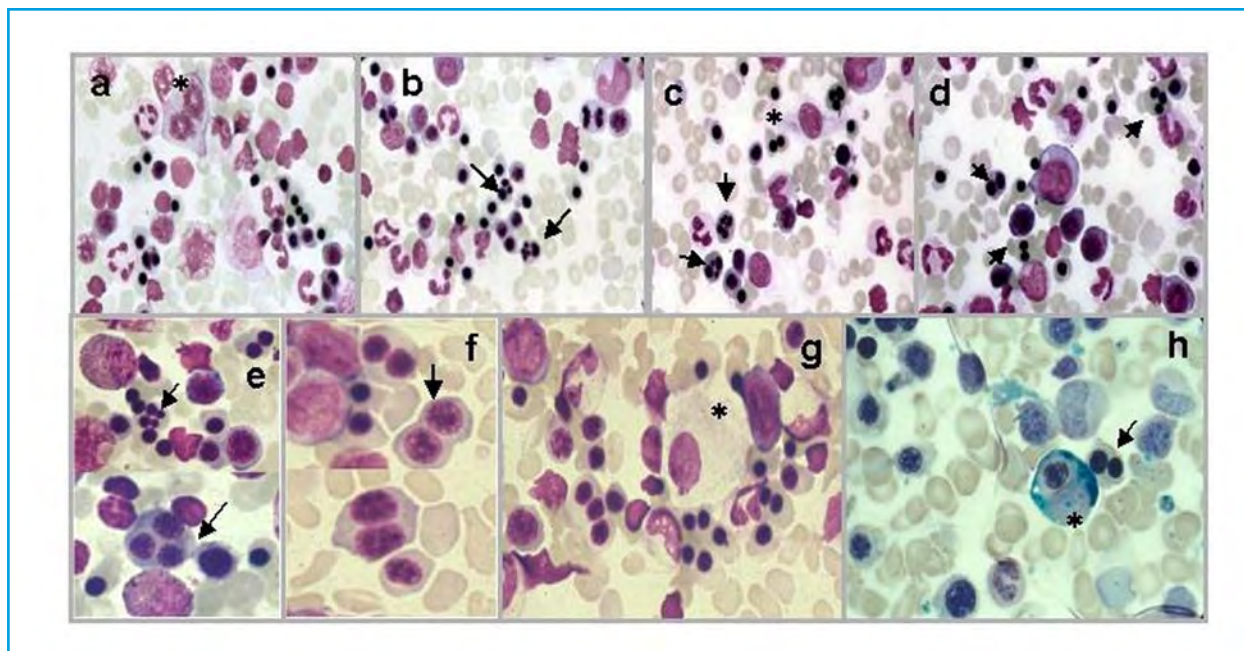
La anemia es habitualmente normocítica. Los pocos casos con microcitosis se han descrito en pacientes con ferropenia o talasemia heterocigota asociadas. El grado de anemia es muy variable, en general moderada, en torno a 80-100 g/L. La sangre periférica es muy poco específica. Suele haber discretas aniso- y poiquilocitosis, punteado basófilo ocasional y algún esferocito<sup>(1)</sup>. Habitualmente no hay eritroblastos circulantes y, cuando los hay, la característica binuclearidad sugiere el diagnóstico. La cifra de reticulocitos es variable, normal o ligeramente elevada, pero siempre inadecuada para el grado de anemia. Este dato es el más relevante para el diagnóstico diferencial con la esferocitosis hereditaria. En médula ósea, hay intensa hiperplasia eritroblástica, eritropoyesis ineficaz, multinuclearidad, sobre todo binuclearidad, de predominio ortocromático en el 10-50% de los eritroblastos y cariorrexis (Figura 3 a-h). Una pequeña proporción

de eritroblastos más precoces pueden ser binucleados. A partir de eritroblasto basófilo hay cierto grado de microcitosis, más llamativa en los eritroblastos binucleados más maduros (Figura 3 b). A veces, los eritroblastos dan la impresión de estar pegados unos a otros simulando células con cuatro núcleos (Figura 3 e)<sup>(14)</sup>. En cada célula, los núcleos suelen ser del mismo tamaño y forma, grado de madurez y contenido de ADN (Figura 3 a-h). Otros rasgos diseriropoyéticos incluyen cariorrexis y picnosis, núcleos irregulares en forma de trébol, puentes intercitoplasmáticos, punteado basófilo, cuerpos de Howell-Jolly (Figura 3 b-c). Los macrófagos “pseudo-Gaucher” con inclusiones birrefringentes en forma de aguja son frecuentes (Figura 3 g), pero pueden estar también presentes en ADC de tipo I<sup>(16)</sup>.

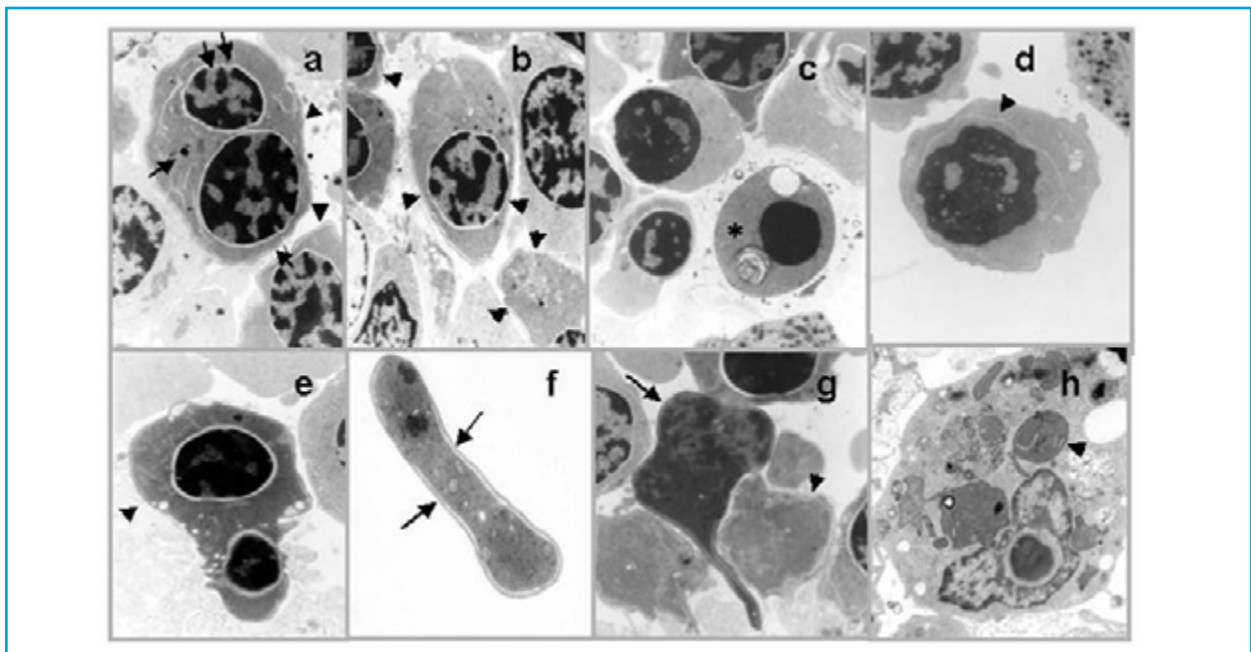
### Hallazgos ultraestructurales

Aunque a nivel óptico las anomalías predominantes son nucleares, en la ADC de tipo II, el estudio al microscopio electrónico de transmisión (MET) permite demostrar que las anomalías más llamativas y frecuentes son citoplasmáticas. La más característica es la presencia de un exceso de cisternas de retículo endoplásmico (RE) que, a modo de “dobles membranas”, se disponen paralelas a 40-70 nm alrededor de la membrana citoplasmática y confieren un aspecto típico a los eritroblastos y hematíes (Figura 4 a-h). En los proeritroblastos, se pueden ver algunos trazos de

lamelas de RE, pero se disponen al azar en trazos cortos discontinuos o en un polo de la célula. En los eritroblastos tardíos, en los que la multinuclearidad es más frecuente, las “dobles membranas” de retículo endoplásmico residual, lisas en su mayoría, aunque pueden tener algunos ribosomas en la cara situada frente al núcleo, se disponen alrededor de la membrana plasmática en su cara interna de forma continua o discontinua, ligadas en algunas células a la membrana nuclear (Figura 4 a). Además de esta localización típica, en algunos eritroblastos, varias lamelas de “doble membrana” enrolladas concéntricamente forman “bucles periféricos”. Para algunos autores<sup>(14)</sup>, la “doble membrana” continua impide la rofecitosis y la expulsión del núcleo y, como consecuencia, aparece la picnosis, pero para otros<sup>(19)</sup> ambas estructuras pueden coexistir y ésta es también nuestra experiencia, ya que hemos podido identificar invaginaciones y vesículas de rofecitosis entre ambas membranas e incluso *clusters* de ferritina por delante de la cisterna de retículo endoplásmico en la cara situada frente al núcleo, hallazgo que indica que la presencia de “doble membrana” continua no impide la rofecitosis o, al menos, no la impide completamente. A nivel nuclear, frecuente multinuclearidad con predominio de formas dobles en eritroblastos tardíos y cariorrexis (Figura 4 a, c y e). En las formas binucleadas, los núcleos suelen ser del mismo tamaño, forma y grado de madurez cromatínica. En ocasiones, hay aumento de los poros nucleares, si bien este hallazgo es mu-



**Figura 3.** ADC tipo II: a-h) Eritroblastos multinucleados, sobre todo binucleados, de predominio ortocromático. a,b) Mitosis bipolar. b-f) Eritroblastos bi- y trinucleados con núcleos, en general, del mismo tamaño y forma (flechas). c) Fragmentación nuclear (flechas). e) Dos eritroblastos binucleados adosados que semejan una célula con cuatro núcleos (flecha). g) Macrófago pseudo-Gaucher (\*). MGG. h) Eritrofagocitosis. Perls (\*).



**Figura 4.** ADC tipo II: a-g) Eritroblastos mono-binucleados, reticulocitos y hematíes con “dobles membranas” paralelas alrededor de la membrana citoplásmica continuas o discontinuas (flechas). a) Eritroblasto binucleado con aumento de poros nucleares y trazos discontinuos de “doble membrana” ligadas a la membrana nuclear. c) Eritroblasto con núcleo picnótico, vacuola y figura mielínica en el citoplasma (\*). h) Macrófago con eritrofagocitosis de un eritroblasto con núcleo picnótico y hematíes con restos de “doble membrana” (flecha). MET, doble contraste.

cho menos frecuente y llamativo que en la ADC de tipo I (Figura 4 a). No suele haber depósitos de micelas ferruginosas intramitocondriales<sup>(14)</sup>. Los macrófagos muestran sobrecarga férrica, figuras mielínicas, fenómenos de eritrofagocitosis de eritroblastos y hematíes con doble membrana e inclusiones que justifican el aspecto “pseudo-Gaucher” descrito a nivel óptico (Figura 4 h).

Tomadas en conjunto, bi- o multinuclearidad de eritroblastos tardíos, cariorrexis, presencia de lamelas de retículo endoplásmico liso y células pseudo-Gaucher sugieren un defecto de la citocinesis y del transporte vesicular.

La ADC de tipo II presenta hallazgos serológicos adicionales, como positividad para el test de lisis (o aglutinación) en suero acidificado con algunos sueros ABO compatibles. La reacción se debe a la presencia en el suero del 40-60% de adultos sanos, de un anticuerpo tipo IgM (anti-HEMPAS) que reconoce un antígeno presente en los hematíes de ADC de tipo II, pero no en los hematíes normales. La dificultad radica en el gran número de sueros habitualmente necesarios para demostrarla. Al contrario que en la hemoglobinuria paroxística nocturna, el test es negativo con suero autólogo y de heterocigotos. Hay elevada aglutinabilidad de los hematíes con suero anti-*i*<sup>(9)</sup>.

Hallazgos bioquímicos adicionales muy específicos que demuestran anomalías de la membrana del

eritrocito son: reducida glicosilación de la banda 3 y 4.5 y patrón característico de emigración de la banda 3, estrecha y de emigración rápida, en electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), que es clave para el diagnóstico y sugiere un defecto en el transporte vesicular. Iolascon *et al.*<sup>(11)</sup> proponen que los casos, excepcionales, en los que no es posible demostrar ese patrón de emigración deben ser considerados ADC de tipo II-like. Mediante Western blot, es posible demostrar la presencia de proteínas del retículo endoplásmico como GRP-78, calreticulina y disulfuro isomerasa (PDI) en la superficie celular y este hallazgo, unido a la existencia de “doble membrana”, sugiere que el defecto se localiza inmediatamente después de la producción de proteínas del retículo endoplásmico. Al fallar su procesamiento normal, aparecen en la superficie celular.

El gen *SEC23B*, responsable de la ADC de tipo II, fue mapeado en el cromosoma 20q11.2 en 1997, e identificado y designado como *CDAN2* en 2009. Codifica un componente central del complejo proteico de revestimiento COPII, que forma vesículas revestidas que participan en el transporte de proteínas del retículo endoplásmico al aparato de Golgi<sup>(20)</sup>. Se han descrito 60 mutaciones, que confirman su heterogeneidad genética. Estudios recientes investigan posibles asociaciones entre el tipo de mutación y distintos parámetros biológicos y clínicos<sup>(11)</sup>.

### Anemia diseritropoyética congénita de tipo III

Es la menos frecuente de los tres tipos clásicos. Se han descrito globalmente alrededor de 60 casos<sup>(11)</sup>. Se reconocen dos formas, una familiar autosómica dominante, y otra esporádica, por homocigosis para un gen recesivo o por una mutación espontánea de carácter dominante, la menos frecuente, con menos de 20 casos estudiados<sup>(6,9,10,21)</sup>. La ADC de tipo III se caracteriza por anemia hiporregenerativa, en general leve-moderada, que no suele requerir transfusión. Su curso relativamente benigno permite, en la mayoría de los casos, alcanzar la longevidad. Los casos esporádicos presentan grandes diferencias en su presentación clínica, lo que sugiere una alteración genética distinta, que podría justificar que los casos esporádicos no hayan sido incluidos en el tipo III de la clasificación propuesta por Iolascon *et al.*<sup>(11)</sup> a pesar de las evidentes coincidencias de las, por otro lado escasas, descripciones morfológicas sobre todo ultraestructurales<sup>(6,14,21)</sup>. La anemia es debida a eritropoyesis ineficaz y hemólisis intravascular con hemosiderinuria crónica<sup>(6)</sup>, que explica por qué en los pacientes afectos de la familia sueca no se ha demostrado sobrecarga férrica, a diferencia de lo que ocurre en ADC de tipos I y II. La haptoglobina está baja o ausente, y la LDH elevada. En la familia sueca, la timidina-cinasa sérica está muy elevada. Los estudios serológicos y bioquímicos muestran resultados variables, aunque es posible que la glicosilación de la banda 3 también sea anormal en ADC de tipo III.

#### Hallazgos morfológicos a nivel óptico

La mediana de Hb es de 118 g/L (rango: 80-143), el VCM normal o sólo ligeramente elevado, y la cifra de reticulocitos normal o ligeramente descendida. En el frotis de SP hay intensas anisopoiquilocitosis, megalocitos a veces gigantes, y punteado basófilo. El estudio de la médula ósea muestra hiperplasia eritroblástica con multinuclearidad (> 30%)<sup>(6,14)</sup>, gigantismo celular y anomalías inespecíficas de la estructura cromatínica nuclear, que son visibles, aunque con escasa frecuencia, también en los proeritroblastos que exhiben formas megaloblásticas bi- o multinucleadas e incompleta separación de los núcleos. Puede haber hasta 12 núcleos en una sola célula, y algunos elementos con 12 núcleos se ven desde el estadio basófilo, pero la proporción de elementos multinucleados, cuyos núcleos con frecuencia tienen diferente tamaño, forma y afinidad tintorial, aumenta con la maduración eritroblástica y en esos estadios puede haber también picnosis y fragmentación nuclear muy irregular. En conjunto, los elementos binucleados predominan en todos los estadios. La segunda característica celular más importante es el gigantismo, que

condiciona gran anisocitosis y macrocitosis entre los eritroblastos mono- y multinucleados. Como es lógico, el aumento de tamaño está ligado a la multinuclearidad. En las formas maduras, el citoplasma también puede ser amplio, lo que hace que en las células con un número elevado de núcleos el tamaño pueda alcanzar 100  $\mu$ . Otras anomalías incluyen mitosis multipolares y cariorrexis. La presencia de gigantismo y multinuclearidad es un hallazgo poco frecuente en las diseritropoyesis, excepto en la ADC de tipo III, en la que su hallazgo, constante, define las características morfológicas de la entidad y constituye la prueba diagnóstica<sup>(6,9-11)</sup>. Las anomalías de la estructura cromatínica pueden ser variables y sólo están presentes por debajo del estadio proeritroblasto-basófilo. Con la maduración algunos núcleos presentan anomalías semejantes a las observadas en el tipo I, bloques irregulares de cromatina densa separados por zonas claras de amplitud variable, aspecto picnótico en los núcleos de eritroblastos ortocromáticos, mientras que otros tienen, por el contrario, aspecto decolorado, apolillado. En el citoplasma las anomalías se suelen observar en las formas maduras, zonas decoloradas con punteado basófilo que ocupan una parte importante del citoplasma. Las anomalías morfológicas permanecen estables en afectados de la familia sueca que fueron reexaminados 10-25 años después del diagnóstico.

#### Hallazgos ultraestructurales

Los estudios ultraestructurales en ADC de tipo III son escasos y es posible que las anomalías presentes en este subtipo no hayan sido todavía completamente descritas<sup>(6,14,21)</sup>. Rasgos megaloblásticos, gigantismo y multinuclearidad están presentes desde el estadio de proeritroblasto, y varios centriolos pueden ser visibles en un área de Golgi muy desarrollada. Suele haber asincronías en el tamaño, forma, maduración y división de los distintos núcleos de una misma célula, lo que sugiere un defecto en la transmisión de información de un núcleo a otro<sup>(14)</sup>. En algunas células multinucleadas, dos o más trozos nucleares parecen adheridos, y la membrana nuclear puede estar rota en esa área. Otros hallazgos diseritropoyéticos, para unos autores característicos y para otros inespecíficos<sup>(6)</sup>, incluyen extensas hendiduras, grietas o *clefs* situadas cerca de la membrana nuclear interna y que aumentan con la maduración, lobulación del contorno nuclear, duplicación, pérdida o extensa mielinización de la membrana nuclear, y núcleos picnóticos muy lobulados en vías de autólisis que han perdido la membrana nuclear y presentan en el citoplasma grandes vacuolas autofágicas. Estas anomalías se observan tanto en células multinucleadas como monolobuladas. El citoplasma puede contener, además, siderosomas, *clusters* de ferritina,



figuras mielínicas, haces de microfilamentos, inclusiones que recuerdan precipitados de cadenas de globina y mitocondrias anormales con edema, vacuolización y rotura de las crestas, que no suelen contener micelas ferruginosas<sup>(6)</sup>. Los reticulocitos, a veces gigantes, pueden contener figuras mielínicas y vacuolas. También se han descrito, en escaso porcentaje de células, “cromatina en esponja” y trazos de “doble membrana” citoplasmática, características de ADC de tipos I y II. En el caso esporádico descrito por Sigler *et al.*<sup>(21)</sup>, el estudio ultraestructural demostró también hendiduras e hiperlobulación y, además, rotura de la membrana nuclear con derrame de material nuclear al citoplasma circundante.

Los estudios del contenido de ADN de los eritroblastos demuestran en las células eritroides mono- y multinucleadas, un elevado contenido de ADN de hasta 28n y 48n respecto al 2n normal, y que cuando los núcleos de una célula multinucleada son de diferente tamaño el contenido de ADN varía tanto más cuanto mayor es la diferencia<sup>(6,14)</sup>.

El gen *KIF23*, responsable de la ADC de tipo III, fue mapeado por Lind *et al.* en el cromosoma 15q21-q25 en 1995,<sup>(11)</sup> e identificado por Liljeholm *et al.*, en pacientes afectados de las familias sueca y americana en 2013<sup>(22)</sup>. Codifica una quinesina mitótica conservada, MKLP1, crucial para la citocinesis. La mutación que causa el fracaso de la citocinesis es consistente con la característica multinuclearidad que define las alteraciones morfológicas de ADC de tipo III.

#### Anemia diseritropoyética congénita de tipo IV

Desde que en 2010 se identificara una mutación dominante en el gen *KLF1* como causa de anemia diseritropoyética congénita<sup>(23)</sup>, diversos estudios analizan descripciones previas de ADC consideradas variantes<sup>(11)</sup>, a la vez que se publican nuevos casos<sup>(13,23)</sup> con características comunes, que de forma cada vez más homogénea, intentan avanzar en el conocimiento del perfil clínico, morfología, biología y genética de la ADC de tipo IV de la clasificación actual<sup>(11)</sup>.

Aunque se trata de unos pocos casos aislados<sup>(11,13)</sup>, los pacientes descritos, diagnosticados durante el periodo neonatal o en la infancia, presentan anemia hemolítica severa y diseritropoyesis asociada, que requiere transfusión en los primeros años de vida. La bilirrubina indirecta y la LDH están elevadas, y la haptoglobina es indetectable. En algún caso hay sobrecarga férrica no del todo justificada por la historia transfusional<sup>(13)</sup>.

#### Hallazgos morfológicos a nivel óptico

La cifra de Hb oscila entre 50 y 95 g/L; el VCM es normal; y la cifra de reticulocitos, normal o elevada. En el

frotis de SP se describe anisopoiquilocitosis, keratocitos, esquistocitos, esferocitos e intensa eritroblastosis, que puede superar el 200% y aumenta postesplenectomía, la mayoría ortocromáticos sólo aisladamente enucleados,<sup>(15)</sup> con rasgos displásicos. En médula ósea hay hiperplasia eritroblástica con rasgos diseritropoyéticos poco específicos, irregularidades del contorno nuclear, gemación o protrusión nuclear, cariorrexis, binuclearidad ocasional, punteado basófilo e inclusiones citoplasmáticas atípicas de color gris azulado pálido, con frecuencia asociadas a punteado basófilo, estas últimas, sólo en algún caso<sup>(12)</sup>.

#### Hallazgos ultraestructurales

Las aisladas descripciones ultraestructurales incluyen, junto a anomalías inespecíficas que afectan a eritroblastos tardíos, entre ellas, núcleos de contorno irregular, duplicación de la membrana nuclear o vacuolas autofágicas, algunos rasgos mixtos de ADC I y II, como invaginaciones de la membrana nuclear, alteraciones de la cromatina y “doble membrana” periférica, que no encajan en ninguno de los tipos clásicos de ADC. En el paciente de Taiwan<sup>(13)</sup>, se habla de un material precipitado intranuclear pero no se describe. Sólo en dos de los casos<sup>(12,13)</sup>, se señala como característica la presencia de inclusiones atípicas en eritroblastos tardíos y reticulocitos, que fueron descritas con todo detalle por Wickramasinghe en 1991<sup>(12)</sup>, como: a) agregados de material amorfo electrón-denso que pudiera corresponder a ribosomas o a precipitados de alfa-globina; b) inclusiones túbulosaculares redondas o en forma de donuts, que pudieran corresponder a lamelas de retículo endoplásmico liso y sáculos del Golgi, más o menos compactas, en ocasiones rodeadas por mitocondrias y que pueden estar conectadas a la membrana nuclear y/o plasmática; o c) inclusiones cilíndricas elongadas.

Hallazgos adicionales importantes en todos los casos son los niveles elevados de HbF (~ 40%) y la expresión reducida de acuaporina AQP1 y CD44. La deficiente expresión de AQP1 condiciona una reducida permeabilidad al agua, y la de CD44 en los hematíes y eritroblastos circulantes no se acompaña de cambios de su expresión en granulocitos y otros leucocitos. Ambas están reguladas por el gen *KLF1*, que también tiene un papel crítico en la regulación de los genes de la globina fetal.

Estudios *in vitro* de células CD34+ aisladas de la sangre periférica<sup>(1,3)</sup> muestran una proliferación y diferenciación eritroblástica normal, pero imperfecta capacidad de enucleación y, en alguno de los pacientes, persistencia de zeta-globina embrionaria y movilidad electroforética rápida de la banda 3.

El gen *KLF1*, también conocido como *EKLF* (factor eritroide Krüppel-like), mapeado en 19p13.2, codifica

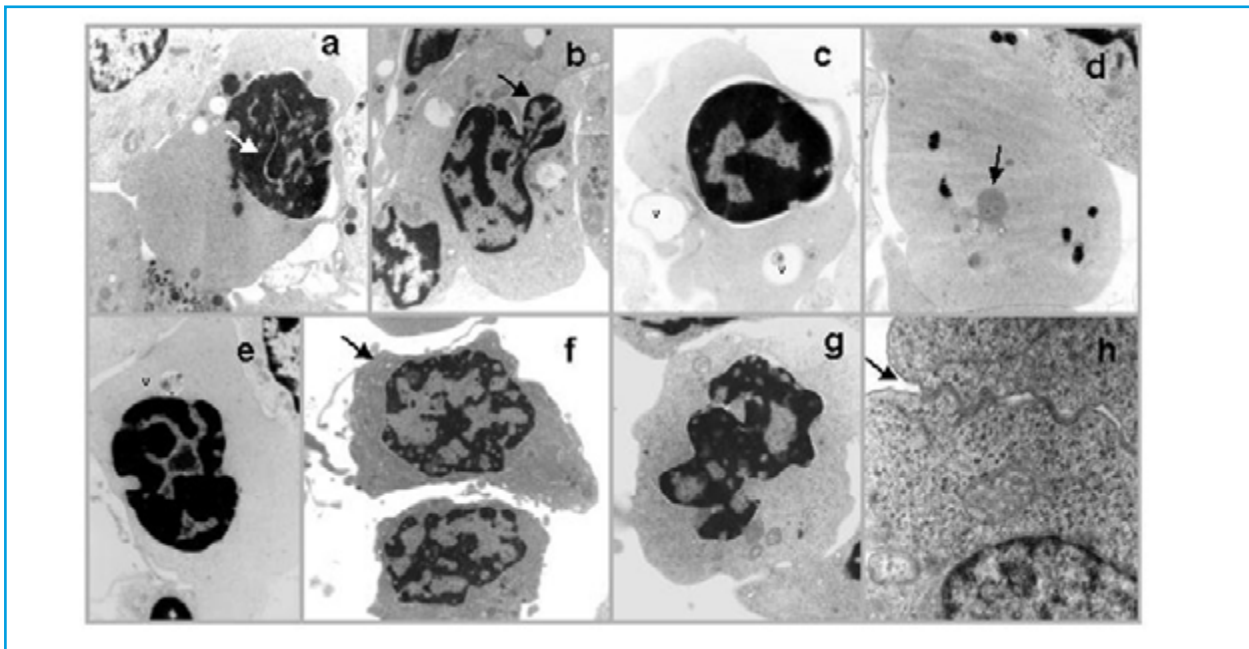
un factor de transcripción restringido a la eritropoyesis, y su mutación Glu235Arg, espontánea dominante, causa una forma severa de ADC, ahora conocida como ADC de tipo IV, con intensa eritroblastosis periférica, persistencia de hemoglobina fetal y ausencia de algunas proteínas de membrana<sup>(13,23)</sup>. Sus características morfológicas distintivas, si las tiene, están todavía por determinar, como también lo están los diferentes síndromes, benignos o no, que pueden originar distintas localizaciones de la mutación de *KLF1*.

### Anemias diseritropoyéticas congénitas variantes

Mutaciones específicas en el gen *GATA-1*, localizado en Xp11.23, que codifica el factor de transcripción GATA-1 y coordina el desarrollo de las líneas eritroide, megacariocítica, así como de eosinófilos y mastocitos, se han asociado a diseritropoyesis, distrombopoyesis y/u otras manifestaciones<sup>(11,24)</sup>. GATA-1 interactúa con una serie de factores de transcripción, por lo que distintas localizaciones de la mutación causan diferentes fenotipos, que se deben a defectos en la expresión de GATA-1 o a la producción de proteínas defectuosas. La mutación Val205Met produce anemia diseritropoyética y trombocitopenia ligada al cromosoma X (XDAT) y la mutación que resulta de

la sustitución en Gly208Arg anemia diseritropoyética y macrotrombocitopenia en varones. Otras mutaciones originan trombocitopenia ligada al cromosoma X (XLT), trombocitopenia con talasemia (XLTT), síndrome de plaquetas grises ligado al X, porfiria eritropoyética congénita, síndromes mieloproliferativos transitorios, leucemia aguda megacarioblástica con trisomía 21 y ADC asociada a la producción de la isoforma Gata-1s (*splicing*). Esta última se ha identificado en dos hermanas con anemia de Blackfan-Diamond (ABD) asociada a trombopenia, y para algunos<sup>(11)</sup> debe ser considerada ABD-like.

Las descripciones morfológicas de ADC/GATA-1 mutado son escasas<sup>(24)</sup>. En el caso de una familia alemana con mutación G208R, las manifestaciones que predominan desde las primeras semanas de vida son las hemorrágicas. En sangre periférica se describe anemia macrocítica moderada por eritropoyesis ineficaz y hemolisis, respuesta reticulocitaria inadecuada, severa macrotrombocitopenia, ocasionales eritroblastos displásicos, eosinopenia, anomalías esqueléticas y focos de hematopoyesis extramedular. En médula ósea postesplenectomía, hay hiperplasia eritroblástica con intensa diseritropoyesis sin rasgos morfológicos distintivos (Figura 5), sobrecarga de hierro con el 5% de sideroblastos anillados e hiperplasia megacariocítica con frecuentes megas hipolobulados.



**Figura 5.** Imágenes de diseritropoyesis. a) Eritroblasto con nuclear *clefts* (flecha), hiperlobulación y pérdida parcial de la membrana nuclear con salida de material nuclear al citoplasma. b) Núcleo con contorno irregular, *clefts* y un mamelón nuclear (flecha). Vacuolas citoplasmáticas. c) Despegamiento de la membrana y vacuolización (v) con una figura mielínica. d) Reticulocito con sideroacrestia y dos agregados citoplasmáticos de material electrón-denso de distinto tamaño (flecha). e) Eritroblasto con núcleo hiper cromático de contorno irregular. Vacuola con figura mielínica (v). f y g) Eritroblastos con núcleo hiper cromático de contorno irregular, hiperlobulado en g, con rasgos mixtos de ADC I, "cromatina en esponja" y II "dobles membranas". ADC y trombocitopenia. h) Sinartesis eritroblástica en ADC de tipo I. MET, doble contraste.

- Anemia diseritropoyética congénita como parte de otros síndromes hereditarios. En ellos, la anemia diseritropoyética es sólo un aspecto del problema. En el síndrome de Majeed el gen responsable es el *LPIN2* y la anemia aparece en el primer año de vida.
- Anemia diseritropoyética asociada a insuficiencia pancreática exocrina e hiperostosis craneal debida a mutaciones del gen *COX414*.
- Crioestomatocitosis hereditaria por mutación *de novo* de la proteína banda 3 asociada a diseritropoyesis, con características morfológicas mixtas de ADC de tipos I y II.
- Déficit de mevalonato cinasa con anomalías morfológicas en médula ósea similares a ADC de tipo II.

En todas ellas, el estudio morfológico de SP y MO permite confirmar el diagnóstico de anemia diseritropoyética asociada, pero las descripciones son poco detalladas y no permiten extraer conclusiones.

### Conclusiones

En la práctica clínica, el diagnóstico de ADC de tipo I puede ser sospechado con elevada fiabilidad en frotis de SP y MO analizados mediante microscopía óptica, si las alteraciones en los núcleos de los eritroblastos están presentes en más del 20% de las células, como aconsejan Heimpel *et al.*<sup>(16)</sup>. Cabe resaltar que, en ese estudio, pacientes con ADC de tipo I presentaban un conjunto de anomalías significativamente más elevado que los controles (26% vs. 6,9%;  $p < 0,0001$ ) y, aunque ninguna de ellas era en sí misma específica,

las diferencias cuantitativas fueron muy significativas en relación con la presencia de puentes internucleares ( $p < 0,001$ ), núcleos incompletamente divididos, binuclearidad y, sobre todo, anomalías de la estructura cromatínica ( $p < 0,0001$ ). La confirmación del diagnóstico requiere la demostración de mutación en el gen *CDAN1* y/o la demostración de las anomalías morfológicas ultraestructurales características, “cromatina en esponja” que confiere a los núcleos aspecto de “queso suizo”, anomalías de la membrana nuclear, de la forma del núcleo, y puentes internucleares.

El diagnóstico de ADC de tipo II se basa inicialmente en el estudio morfológico de médula ósea que muestra multinuclearidad, principalmente binuclearidad, en el 10-50% de los eritroblastos. En el análisis cuantitativo de las anomalías presentes en 36 casos de ADC de tipo II realizado por Heimpel *et al.*<sup>(16)</sup> tampoco se encontraron anomalías específicas, si bien el número de anomalías en conjunto fue significativamente mayor que el de los controles (22% vs. 6,9%;  $p < 0,0001$ ), siendo la más significativa la binuclearidad (> 10%), mayor si se consideran sólo los eritroblastos tardíos (IC 13-16%). La confirmación diagnóstica requiere demostrar la mutación del gen *SEC23B* y/o la presencia de “doble membrana” de retículo endoplásmico residual en eritroblastos tardíos y hematíes y/o el patrón de emigración característico de la proteína del eritrocito EA1 (transportador aniónico) o proteína de la banda 3 en SDS-PAGE.

La sospecha diagnóstica de ADC de tipo III se basa en la existencia de anemia macrocítica estable, con

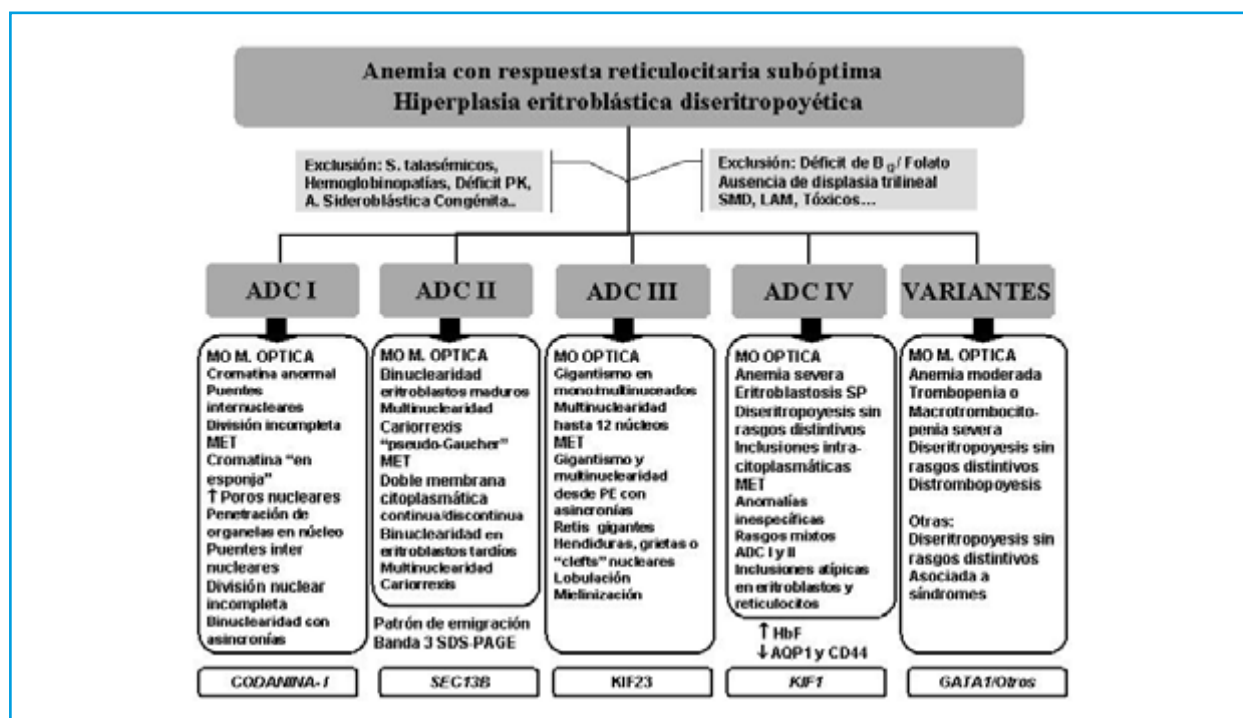


Figura 6. Anemia con respuesta reticulocitaria subóptima. Hiperplasia eritroblástica diseritropoyética.

datos bioquímicos de eritropoyesis y hemólisis asociadas. La confirmación diagnóstica se basaba hasta hace poco en la demostración morfológica de hiperplasia eritroblástica con gigantismo y multinuclearidad severa en, probablemente, > 30% de los eritroblastos, siendo los hallazgos ultraestructurales confirmatorios, con sólo algunos rasgos considerados más frecuentes pero inespecíficos<sup>(6)</sup>. Los pocos casos descritos, la mayoría *clusters* familiares, no han permitido un estudio que cuantifique el número y tipo de rasgos morfológicos. Algunos autores<sup>(22)</sup> consideran un parámetro importante para el diagnóstico diferencial los valores elevados de timidina cinasa sérica. La demostración de mutación del gen *KIF23* en casos familiares abre una vía fundamental diagnóstica que deberá ser confirmada en casos esporádicos.

La sospecha de ADC de tipo IV se basa en la existencia de anemia hemolítica severa, intensa eritroblastosis en sangre periférica e hiperplasia eritroblástica con diseritropoyesis en médula ósea, no encuadrable en los tipos clásicos. La presencia a nivel ultraestructural de inclusiones intracitoplasmáticas, podría sugerir el diagnóstico. Hallazgos complementarios que sí parecen distintivos son la deficiencia combinada en la expresión de acuaporina AQP1 y CD44 en los hematíes y la persistencia de Hb fetal. En esos casos y en otros que sugieran ADC de causa genética desconocida, el gen *KLF1* debe ser sistemáticamente secuenciado.

En el grupo heterogéneo de ADC variantes, la sospecha diagnóstica se basa en la existencia de anemia con respuesta reticulocitaria inadecuada y en los datos de eritropoyesis ineficaz y/o hemólisis. El estudio morfológico sólo permite establecer que existe diseritropoyesis, que debe ser analizada de forma integrada con otros datos clínicos, que deberán orientar el estudio genético.

A pesar de los recientes avances en la identificación de los genes responsables de un buen número de ADC, el estudio morfológico sigue siendo el primer paso para el diagnóstico y puede aportar un mejor conocimiento de estas entidades (Figura 6).

## Bibliografía

- Crookston JH, Crookston MC, Burnie KL, Francombe WH, Dacie JV, Davis JA, Lewis SM. Hereditary erythroblastic multinuclearity associated with a positive acidified serum test: a type of congenital dyserythropoietic anaemia. *Br J Haematol* 1969;17:11-26.
- Heimpel H, Wendt F. Congenital dyserythropoietic anemia with karyorrhexis and multinuclearity of erythroblasts. *Helv Med Acta* 1968;34:103-15.
- Bergström I, Jacobsson L. Hereditary benign erythroiderulosis. *Blood* 1962;19:296-303.
- Tanno T, Porayette P, Sripichai O, Noh S-J, Byrnes C, Bhupatiraju A et al. Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells. *Blood* 2009;114:181-6.
- Shalev H, Perez-Avraham G, Kapelushnik J, Levi I, Rabinovich A, Swinkels DW, Brasse-Lagnel C, Tamary H. High levels of soluble serum hemojuvelin in patients with congenital dyserythropoietic anemia type I. *Eur J Haematol* 2013;90:31-36.
- Sandström H, Wahlin A. Congenital dyserythropoietic anemia type III. *Haematologica* 2000;85:753-757.
- Boogaerts MA, Velwilghen RL. Variants of CDA: An update. *Haematologia* 1982;15:211-219.
- Wickramasinghe SN. Congenital dyserythropoietic anaemias: clinical features, haematological morphology and new biochemical data. *Blood Rev* 1998;12:178-200.
- Heimpel H. CDA: epidemiology, clinical significance, and progress in understanding their pathogenesis. *Ann Hematol* 2004;83:613-21.
- Wickramasinghe SN, Wood WG. Advances in the understanding of the CDA. *Br J Haematol* 2005; 131:431-446.
- Iolascon A, Esposito M, Russo R. Clinical aspects and pathogenesis of congenital dyserythropoietic anemias: from morphology to molecular approach. *Haematologica* 2012;97:1786-94.
- Wickramasinghe SN, Illum N, Wimberley PD. Congenital dyserythropoietic anaemia with novel intra-erythroblastic and intra-erythrocytic inclusions. *Br J Haematol* 1991;79:322-330.
- Jaffray JA, Mitchell WB, Gnanapragasam MN, Seshan SV, Guo X, Westhoff CM et al. Erythroid transcription factor EKLF/KLF1 mutation causing congenital dyserythropoietic anemia type IV in a patient of Taiwanese origin: Review of all reported cases and development of a clinical diagnostic paradigm. *Blood Cells Mol Dis* 2013; Mar 20, doi: 10.1016/j.bcmd.2013.02.006.
- Breton-Gorius J, Daniel MT, Cauvel JP, Dreyfus B. Anomalies ultrastructurales des érythroblastes et des érythrocytes dans six cas de dysérythropoièse congénitale. *Nouvelle Revue Française d'Hématologie* 1973;13:23-49.
- Heimpel H, Matuschek A, Ahmed M, Bader-Meunier B, Colita A, Delaunay J et al. Frequency of congenital dyserythropoietic anemias in Europe. *Eur J Haematol* 2010;85:20-5.
- Heimpel H, Kellermann K, Neuschwander N, Högel J, Schwarz K. The morphological diagnosis of congenital dyserythropoietic anemia: results of a quantitative analysis of peripheral blood and bone marrow cells. *Haematologica* 2010; 95:1034-1036.
- Dgany O, Avidan N, Delaunay J, Krasnov T, Shalmon L, Shalev H et al. Congenital dyserythropoietic anemia type I is caused by mutations in codanin-1. *Am J Hum Genet* 2002;71:1467-74.
- Florensa F, Woessner S, Besses C, Solé F, Sans-Sabrafen J. CDA type II: morphological characterization of the erythroid colonies (BFU-E) from the bone marrow and peripheral blood of two patients. *Ann Hematol* 1994; 69:57-59.
- Rozman C, Woessner S, Feliu E, Lafuente R, Berga LI. En: Ultraestructura celular en Hematología. Salvat ed., 1990:30-41.
- Khoriaty R, Vasievich MP, Ginsburg D. The COPII pathway and hematologic disease. *Blood* 2012;120:31-38.
- Sigler E, Shaft D, Shtalrid M, Shvidel L, Berrebi A, Resnitzky P. New sporadic case of CDA type III in an aged woman: Detailed description of ultrastructural findings. *Am J Hematol* 2002;70:72-76.
- Liljeholm M, Irvine AF, Vikberg AL, Norberg A, Month S, Sandström H et al. Congenital dyserythropoietic anemia type III (CDA III) is caused by a mutation in kinesin family member, KIF23. *Blood* 2013; doi:10.1182/blood-2012-10-461392.
- Arnaud L, Saison C, Helias V, Lucien N, Steschenko D, Giarratana MC, Prehu C et al. A dominant mutation in the gene encoding the erythroid transcription factor KLF1 causes a Congenital Dyserythropoietic Anemia. *Am J Hum Genet* 2010;87:721-727.
- Dührsen U, Kratz ChP, Flotho Ch, Lauenstein T, Bommer M, König E, et al. Long-term outcome of hemizygous and heterozygous carriers of a germline GATA1G208R mutation. *Ann Hematol* 2011; 90: 301-306.

## Novedades genéticas y moleculares en las anemias diseritropoyéticas congénitas

M. LETÍCIA RIBEIRO, TABITA MAGALHÃES MAIA  
Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (Portugal)

### Introducción

Las anemias diseritropoyéticas congénitas (CDA) pertenecen a un grupo muy heterogéneo de síndromes de fallo medular congénito del linaje eritropoyético. Con base en la morfología de los eritroblastos de la médula ósea, a finales de la década de los 60 las CDA fueron subdivididas en tipos I, II y III. Posteriormente han sido identificadas otras formas de CDA que no pueden ser incluidas en ninguno de los tres tipos canónicos, pero que presentan algunas características en común.

Las CDA son enfermedades raras; no obstante, su heterogeneidad clínica, dificultad diagnóstica, basada en la morfología de la médula ósea, y la ausencia de registros contribuyen a infravalorar su verdadera incidencia. Con base en casos publicados y registros realizados en diferentes países, Heimpel *et al.*<sup>(1)</sup> han estimado que la incidencia global de CDA en Europa sea de 0,5 casos/millón, teniendo la CDA II una incidencia de 0,71 casos/millón, y la CDA I 0,24 casos/millón (Iolascon *et al.*, 2012)<sup>(2)</sup>. La CDA II es más frecuente en el sur de Italia, donde se identifica un efecto fundador.

La anemia se detecta habitualmente en la primera década de vida, aunque su diagnóstico frecuentemente se retrasa, en especial en los casos más leves, o cuando se confunde con una anemia hemolítica de otra etiología<sup>(3)</sup>, concretamente con esferocitosis hereditaria (CDA II), talasemia intermedia, hemoglobinas inestables o anemia megaloblástica. La severidad del cuadro clínico es heterogénea, desde casos leves y asintomáticos a anemias severas desde el nacimiento o incluso hidropsia fetal. La sobrecarga de hierro es la complicación tardía más frecuente y necesita ser controlada para evitar las comorbilidades inherentes. Tamary *et al.*<sup>(4)</sup> han demostrado que los pacientes con CDA I tienen niveles elevados de GDF15 (factor 15 de crecimiento y diferenciación) que se correlacionan con los niveles de ferritina. Aun con niveles semejantes de sobrecarga de hierro, los pacientes con CDA II

tienen niveles de GDF15 significativamente menores que los pacientes con CDA I, lo que sugiere la existencia de otros factores que influyen en la expresión de la hepcidina y en la sobrecarga de hierro en las CDA II. La CDA de tipo III tiene niveles de ferritina normales.

Otras complicaciones son las habituales en las anemias hemolíticas crónicas, en especial la colelitiasis, la aplasia eritroide transitoria y las úlceras en miembros inferiores. En la mayoría de los casos, la CDA no tiene gran impacto en la esperanza de vida; sin embargo, puede disminuir significativamente la calidad de vida.

El diagnóstico asienta en criterios clínicos (ictericia y esplenomegalia), historia familiar y datos de laboratorio: anemia congénita, reticulocitosis, que suele ser inferior a lo esperado teniendo en cuenta la intensidad de la anemia, hiperbilirrubinemia no conjugada, evidencia de eritropoyesis ineficaz y la típica apariencia morfológica de los eritroblastos en la médula ósea<sup>(5)</sup>. El frotis de sangre periférica, en general, muestra anisopoiquilocitosis (ovalocitos, microesferocitos, dacriocitos) y punteado basófilo.

En el aspirado de médula ósea se pueden observar las anomalías morfológicas características en los eritroblastos que permiten, en la mayoría de los casos, sospechar el diagnóstico. En las CDA de tipo I y tipo II los eritroblastos, cuando son observados en microscopía electrónica, presentan alteraciones morfológicas específicas (Tabla 1).

Hasta el momento se conocen genes asociados a CDA de tipo I –*CDAN1* (15q15.1-15.3) y *C15ORF41* (15q14)–; CDA de tipo II –*SEC23B* (20p11.23-20p12.1)–; CDA de tipo III –*KIF23* (15q21-25)–. El enfoque en la investigación de mutaciones en genes que codifican factores de transcripción eritroide específicos ha conducido a la descripción de la CDA de tipo IV, resultante de mutaciones en el gen *KLF1* y a la identificación de mutaciones en el gen *GATA1* en anemias con diseritropoyesis y macrotrombocitopenia. Siguen existiendo casos raros de CDA en los cuales no se identifican mutaciones en estos genes.

**Tabla 1.** Características morfológicas de las CDA clásicas

	<b>CDA de tipo I</b>	<b>CDA de tipo II</b>	<b>CDA de tipo III</b>
<b>Frotis</b>	Anisopoiquilocitosis, con grandes macrocitos de diferentes tamaños, punteado basófilo	Anisopoiquilocitosis, esferocitos, punteado basófilo, eritroblastos maduros esporádicos	Anisopoiquilocitosis, macrocitos y punteado basófilo
<b>Morfología en la médula ósea</b>	Eritroblastos binucleados con núcleos de distintos tamaños. Alteraciones en la cromatina y puentes internucleares	> 10% de todos los precursores eritroides son eritroblastos maduros binucleados (con núcleos de igual tamaño); cariorrexis; macrófagos pseudo-Gaucher en algunos casos	Eritroblastos bi- o multinucleados (hasta 12 núcleos) y eritroblastos gigantes mononucleados
<b>Microscopía electrónica</b>	Heterocromatina de aspecto esponjoso, con apariencia de "queso suizo"	Eritroblastos con doble membrana	Hendiduras y vesículas

La identificación de los genes asociados a la fisiopatología de las CDA permite diagnósticos más precoces y más precisos, además de aportar nuevos datos para el conocimiento de la fisiología de la eritropoyesis y de abrir camino a la investigación científica y al desarrollo de nuevas opciones de tratamiento.

### CDA de tipo I

La CDA I es una patología muy rara, de herencia autosómica recesiva, identificada en varias poblaciones del mundo. Actualmente, en Europa existen aproximadamente 130 enfermos. En general, la CDA I se presenta en la primera década de la vida, con anemia (8-11 g/dL), ictericia intermitente, esplenomegalia y, en algunos casos, hepatomegalia. La severidad de la anemia es heterogénea, incluso entre los miembros de una misma familia, y puede ser más grave en los primeros años de vida, requiriendo soporte transfusional. Más tarde puede desarrollarse colelitiasis, sobrecarga de hierro (independiente de las transfusiones) y, en algunos pacientes, masas eritropoyéticas paravertebrales. Aproximadamente un tercio de los pacientes asocian alteraciones anatómicas que afectan, fundamentalmente, a los dedos de las manos y los pies<sup>(6)</sup>.

La anemia es macrocítica y en el frotis de sangre periférico se observan macrocitos de diferentes tamaños, anisopoiquilocitosis y puede visualizarse punteado basófilo. El aspirado de médula ósea muestra hiperplasia eritroide con maduración megaloblástica, eritroblastos binucleados (< 10%), ocasionalmente tri- o tetranucleados, con núcleos de diferentes tamaños, cariorrexis, cromatina con estructura anormal y puentes internucleares. Las alteraciones de la cromatina y los puentes internucleares entre eritroblastos policromáticos son las características más específicas de la CDA I. Al microscopio electrónico los eritroblastos tienen una apariencia típica de "queso suizo" –con heterocromatina de aspecto esponjoso<sup>(6)</sup>–.

En cerca del 50% de los pacientes/familias con CDA I se han encontrado mutaciones, en homocigotía o heterocigotía compuesta, en el gen *CDAN1* (15q15.1-15.3) que codifica la codanina-1. Esta proteína tiene expresión ubicua y parece tener una función reguladora en el ciclo celular, durante la fase S7. No se han observado casos en que los 2 alelos tengan mutaciones que anulen la síntesis de la codanina-1, lo que sugiere que su ausencia no es compatible con la vida. En el 30% de los enfermos/familias solamente han sido identificadas mutaciones *CDAN1* en uno de los dos alelos. Muy recientemente ha sido identificado, también en el cromosoma 15 (15q14), otro gen, *C15ORF41*, asociado a CDA I<sup>(6)</sup>. Este gen tiene una significativa expresión en los linfoblastos B, las células CD34+, los cardiomiocitos y el hígado fetal. En un porcentaje importante de pacientes con CDA I no se identificaron mutaciones en estos dos genes, lo que sugiere la existencia de alteraciones en otro u otros genes aún no identificados.

La evolución clínica de los pacientes con CDA I es favorable en la mayoría de los casos. Esporádicamente puede ser necesario soporte transfusional o, en situaciones muy raras, transfusiones intrauterinas. La esplenectomía no se recomienda por su dudosa eficacia. La sobrecarga de hierro, incluso en pacientes no transfundidos, necesita ser controlada con flebotomías o quelantes del hierro. Empíricamente, el tratamiento con interferón- $\alpha$  ha demostrado ser eficaz a largo plazo para controlar la anemia y la sobrecarga de hierro<sup>(7)</sup>.

### CDA de tipo II

La anemia diseritropoyética congénita de tipo II, también referida como HEMPAS (anemia eritroblástica multinuclear hereditaria asociada con prueba de Ham en suero acidificado positiva) es la forma más frecuente de CDA y tiene herencia

autosómica recesiva. Actualmente están identificadas más de 300 familias con la enfermedad, la mayoría con origen en el sur de Italia. Los principales hallazgos son: anemia (8,5-9,5 g/dL) normocrómica/normocítica, ictericia y esplenomegalia (50-60% de los casos)<sup>(8)</sup>. Una característica importante de la CDA II es que el número de reticulocitos es más bajo que lo esperado para el grado de anemia.

El frotis de sangre periférica muestra anisopoikilocitosis y puede presentar anisocromia, esferocitos, punteado basófilo y algunos eritroblastos maduros. En la médula ósea los hallazgos más frecuentes son los eritroblastos con dos núcleos de tamaño similar, que en general representan más del 10% de todos los precursores eritroides, y cariorrexis<sup>(9)</sup>. En la mayoría de los casos se observan macrófagos pseudo-Gaucher que contienen “agujas” birrefringentes. En microscopía electrónica se identifica una doble membrana en los eritroblastos.

El test de Ham es positivo y hay una expresión aumentada del antígeno i. La glicosilación de la proteína banda 3 de la membrana del eritrocito está disminuida, lo que puede ser evidenciado en electroforesis en SDS-PAGE<sup>(10)</sup> como una banda 3 más estrecha y que migra más rápido.

La CDA II se puede confundir con esferocitosis hereditaria; sin embargo, para los mismos niveles de hemoglobina, el número de reticulocitos es menor en la CDA II que en la esferocitosis hereditaria y las características de la banda 3 en SDS-PAGE permiten el diagnóstico diferencial.

Mutaciones en el gen *SEC23B* (20p11.23-20p12.1), que codifica la proteína SEC23B, que forma parte del complejo COP II (*coat protein II*), son responsables de la gran mayoría de las CDA II. La fisiopatología subyacente no está todavía completamente esclarecida. Las mutaciones encontradas, *missense* y *nonsense*, se distribuyen por todo el gen, y en más del 50% de los alelos *SEC23B* mutados se encuentra una de las cuatro mutaciones más frecuentes. No se conocen pacientes con homocigosis para mutaciones *SEC23B* de tipo *nonsense*, lo que sugiere que es incompatible con la vida<sup>(11,12)</sup>.

Las complicaciones más comunes en la CDA II son los cálculos biliares y la sobrecarga de hierro hepática, aun en pacientes no trasfundidos. La mayoría de los pacientes con CDA II no requieren transfusiones regulares, aunque algunos pacientes son dependientes de transfusiones. Han sido descritos algunos casos de *hidropsia fetal*.

El tratamiento de la CDA II es de soporte. La eficiencia de la esplenectomía no está esclarecida. Algunos pacientes pueden beneficiarse de trasplante de médula ósea<sup>(3)</sup>.

## CDA de tipo III

La CDA III es extremadamente rara. Se conocen casos familiares descritos en Suecia y Estados Unidos, con herencia autosómica dominante. Otros casos esporádicos descritos en la literatura sugieren transmisión autosómica recesiva o la existencia de mutaciones *de novo*.

La mayoría de los datos clínicos y morfológicos de CDA III provienen de una familia con 5 generaciones (37 miembros afectados) del norte de Suecia. Los pacientes refieren síntomas generales de fatiga, más intensa en el contexto de infecciones o gestación, sin esplenomegalia. Algunos enfermos presentan anomalías oculares (líneas angioides con degeneración macular) y tendencia aumentada para gammapatías monoclonales y mieloma múltiple<sup>(13)</sup>.

La anemia es de ligera a moderada, con volumen corpuscular medio normal o discretamente elevado, reticulocitos en número normal, anisopoikilocitosis, macrocitos y punteado basófilo. La anemia es consecuencia de eritropoyesis ineficaz y de hemólisis intravascular, evidenciada por hemosiderinuria y niveles de ferritina normales, al revés de los otros tipos de CDA, que presentan sobrecarga de hierro. En la médula ósea se observa hiperplasia eritroide, con eritroblastos bi- o multinucleados y algunos eritroblastos policromatófilos gigantes. Los eritroblastos multinucleados, que pueden contener hasta 12 núcleos de varios tamaños y diferentes estadios madurativos, son los más típicos de la CDA III<sup>(13)</sup>.

Estudios muy recientes con tecnología NGS (*next generation sequencing*) han identificado una mutación *frameshift* c.2747C>G (p.P916R) en el gen *KIF23* (15q21-25) en las dos familias de Suecia y América. Este gen codifica una proteína mitótica *kinesin-like* (MKLP1)<sup>(23)</sup>, esencial para la división celular.

La existencia de pacientes con características morfológicas típicas de CDA III pero con cuadro clínico heterogéneo y transmisión autosómica no dominante sugiere la existencia de diferentes alteraciones genéticas subyacentes.

## CDA de tipo IV: CDA con mutación *KLF1* Glu235Arg

La CDA de tipo IV, anteriormente considerada como una variante de CDA, tiene características intermedias entre la CDA de tipo II y la de tipo III, el test de HAM es negativo, y en la médula ósea se observan eritroblastos multinucleados. Se presenta habitualmente en la primera década de vida con anemia de severidad variable, en algunos casos con anemia severa dependiente de transfusiones desde el nacimiento.

*KLF1* (*Krüpper like factor 1*) es un factor de transcripción eritroide esencial para la expresión de genes ne-

cesarios en la eritropoyesis, en especial para el control del *switching* de los genes de las cadenas globínicas a lo largo de la vida. *KLF1* promueve la síntesis de cadenas globínicas  $\beta$  y de la proteína BCL11A, inhibidora de la expresión del gen  $\gamma^{(14)}$ . Mutaciones en el gen *KLF1* causan disminución de la síntesis de cadenas  $\beta$  y de BCL11A, con el consecuente aumento de síntesis de cadenas  $\gamma$  y de la ratio de cadenas globínicas  $\gamma/\beta$ . Arnaud *et al.*<sup>(15)</sup> identificaron por primera vez la mutación *KLF1* Glu325Lys en heterocigotía en dos enfermos con formas severas de CDA, uno de origen danés y otro francés. Esta mutación tiene un efecto negativo en la actividad transcripcional del *KLF1* y neutraliza la expresión de acuaporina-1 (AQP1) y de la molécula de adhesión CD44. Estos datos son muy relevantes para determinar la función del KLF1 en la eritropoyesis. Esta forma de CDA cursa con elevación de los niveles de hemoglobina embrionaria y fetal y con reducción de CD44 y acuaporina-1.

### CDA asociada a mutaciones en el gen GATA1

En algunos pacientes con anemia diseritropoyética han sido identificadas mutaciones en el gen *GATA1* (Xp11.23) que codifica el factor de transcripción GATA1, esencial para el desarrollo de los linajes eritroide y megacariocítico. Los pacientes suelen presentar anemia diseritropoyética con macrotrombocitopenia, de severidad variable, o trombocitopenia con  $\beta$ -talasemia<sup>(16)</sup> La herencia es ligada al X. Mutaciones en este gen, dependiendo de su localización, pueden originar una variedad de síndromes distintos<sup>(15)</sup>.

### Otros síndromes que cursan con anemia diseritropoyética

- La estomatocitosis hereditaria con diseritropoyesis es una nueva variante de estomatocitosis asociada a la mutación p. G796R en el gen *AE1*, que codifica la banda 3, una proteína eritrocitaria transmembrana. La paciente descrita por Yolascon *et al.*<sup>(17)</sup> presenta anemia hemolítica moderada, con estomatocitos en sangre periférica y signos de diseritropoyesis en médula ósea, similar a CDA I y II. La mutación p. G796R - band3 CEINGE, altera la función de intercambio aniónico para transporte de cationes, modifica el perfil de fosforilación de la tirosina y, probablemente, contribuye a la diseritropoyesis.
- El síndrome de Majjed<sup>(18)</sup> es una enfermedad muy rara, con herencia autosómica recesiva. La sintomatología tiene inicio en la infancia con osteomielitis recurrente multifocal crónica (CRMO), anemia diseritropoyética congénita (CDA), con anemia hipocrómica y microcítica, y dermatosis inflamatoria transitoria. La anemia se desarrolla en el primer año de vida y puede ser de moderada a transfusión-de-

pendiente. El diagnóstico se fundamenta en los datos clínicos, hematológicos y en el estudio del gen *LPIN2* (18p11.31), que codifica la lipina 2<sup>(19)</sup>.

- En cuatro pacientes con anemia diseritropoyética congénita e insuficiencia pancreática exocrina asociada a hiperostosis craneal, E. Shteyer *et al.*<sup>(20)</sup> identificaron una mutación en el gen *COX4I2*, que codifica la proteína COX4, esencial en la formación del complejo citocromo c oxidasa. El gen *COX4I2* es altamente expresado en la médula ósea.
- El déficit de mevalonato cinasa es una enfermedad metabólica rara causada por mutaciones en el gen *MVK*. Samkari *et al.*<sup>(21)</sup> han descrito un caso clínico que asocia anemia diseritropoyética congénita con anomalías morfológicas en la médula ósea similares a CDA II. No se han encontrado mutaciones en el gen *SEC23B*. El tratamiento con corticosteroides y colchicina, para controlar el proceso inflamatorio, ha mejorado la anemia.

### Perspectivas futuras

En la última década la investigación molecular de las CDA ha permitido una mejor definición de la enfermedad y la elucidación de algunos de los mecanismos fisiopatológicos asociados a los estadios finales de la diferenciación eritroide. Actualmente las investigaciones se centran en identificar, sobre todo, la función de las proteínas involucradas, como la codanina-1, el mecanismo de acción del interferón- $\alpha$ , otros genes asociados a CDA y los mecanismos que desregulan el metabolismo del hierro en estas patologías.

### Bibliografía

1. Heimpel H, Matuschek A, Ahmed M, Bader-Meunier B, Colita A, Delaunay J, Garcon L, Gilsanz F, Goede J, Högel J, Kohne E, Leichtle R, Munoz J, Perrotta S, Piscopo C, Renella R, Schwarz K, Smolenska-Sym G, Wickramasinghe S, Zanello A, Iolascon A. Frequency of congenital dyserythropoietic anemias in Europe. *Eur J Haematol.* 2010; 85:20-5.
2. Iolascon A, Esposito MR, Russo R and Roberta Russo. Clinical aspects and pathogenesis of congenital dyserythropoietic anemias: from morphology to molecular approach. *Haematologica* 2012; 97(12) 1786-1794.
3. Iolascon A, Russo R, Delaunay J. Congenital dyserythropoietic anemias. *Current Opinion in Hematology* 2011, 18:146-151.
4. Tamary H, Shalev H, Perez-Avraham G, Zoldan M, Levi I, Swinkels DW, et al. Elevated growth differentiation factor 15 expression in patients with congenital dyserythropoietic anemia type I. *Blood* 2008;112:5241-4.
5. Heimpel H, Kellermann K, Neuschwander N, Högel J, and Schwarz K. The morphological diagnosis of congenital dyserythropoietic anemia: results of a quantitative analysis of peripheral blood and bone marrow cells. *Haematologica* 2010; 95: 1034-1035.
6. Babbs C, Roberts NA, Sanchez-Pulido L, McGowan SJ, Ahmed MR, Brown JM, Sabry MA, Bentley DR, McVean GA, Donnelly P, Gileadi O, Ponting CP, Higgs DR, and Buckle VJ. Homozygous mutations in a predicted endonuclease



- cause Congenital Dyserythropoietic Anemia Type I. *Haematologica*. 2013; 98.
7. Heimpel H, Anselstetter V, Chrobak L, et al. Congenital dyserythropoietic anemia type II: epidemiology, clinical appearance, and prognosis based on long-term observation. *Blood* 2003; 102:4576–4581.
  8. Noy-Lotan S, Dgany O, Lahmi R, et al. Codanin-1, the protein encoded by the gene mutated in congenital dyserythropoietic anemia type I (CDAN1), is cell cycle regulated. *Haematologica* 2009; 94:629–637.
  9. Iolascon A, Russo R, Esposito MR, et al. Congenital dyserythropoietic anaemias: new acquisitions. *Blood Transfus* 2011;9:278-280.
  10. Iolascon A, Delaunay J, Wickramasinghe SN, et al. Natural history of congenital dyserythropoietic anemia (CDA II). *Blood* 2001; 98:1258–1260.
  11. Bianchi P, Fermo E, Vercellati C, et al. Congenital dyserythropoietic anemia type II (CDA II) is caused by mutations in the SEC23B gene. *Hum Mut* 2009; 30:1292–1298.
  12. Iolascon A, Russo R, Esposito MR, et al. Molecular analysis of forty two CDA II patients: new mutations in the SEC23B gene. Search for a genotype-phenotype relationship. *Haematologica* 2010; 95:708–715.
  13. Herbert Sandström, Anders Wahlin. Congenital dyserythropoietic anemia type III. *Haematologica* 2000; 85:753-757.
  14. Zhou D, Liu K, Sun CW, et al. KLF1 regulates BCL11A expression and gamma- to beta-globin gene switching. *Nat Genet* 2010; 42:742–744.
  15. Arnaud L, Saison C, Helias V, et al. A dominant mutation in the gene encoding the erythroid transcription factor KLF1 causes a congenital dyserythropoietic anemia. *Am J Hum Genet* 2010; 87:721–727.
  16. Freson K, Matthijs G, Thys C, Mariën P, Hoylaerts MF, Vermylen J and Van Geet C. Different substitutions at residue D218 of the X-linked transcription factor GATA1 lead to altered clinical severity of macrothrombocytopenia and anemia and are associated with variable skewed X inactivation. *Hum. Mol. Genet.* 2002; 11:147-152.
  17. Iolascon A, De Falco L, Borgese F, et al. A novel erythroid anion exchange variant (Gly796Arg) of hereditary stomatocytosis associated with dyserythroipoiesis. *Haematologica* 2009; 94:1049–1059.
  18. Majeed HA, Kalaawi M, Mohanty D, Teebi AS, Tunjekar MF, al-Gharbawy F, Majeed SA, al-Gazzar AH. Congenital dyserythropoietic anemia and chronic recurrent multifocal osteomyelitis in three related children and the association with Sweet syndrome in two siblings. *J Pediatr.* 1989 Nov;115(5 Pt 1):730–734.
  19. Ferguson PJ, Chen S, Tayeh MK, et al. Homozygous mutations in LPIN2 are responsible for the syndrome of chronic recurrent multifocal osteomyelitis and congenital dyserythropoietic anaemia (Majeed syndrome). *J Med Genet* 2005; 42:551–557.
  20. Shteyer E, Saada A, Shaag A, et al. Exocrine pancreatic insufficient, dyserythropoietic anemia, and calvarial hyperostosis are caused by a mutation in COX4I2 gene. *Am J Hum Genet* 2009; 84:412–417.
  21. Samkari A, Borzutzky A, Fermo E, et al. A novel missense mutation in MVK associated with MK deficiency and dyserythropoietic anemia. *Pediatrics* 2010; 125:e964–e968.
  22. Dgany O, Avidan N, Delaunay J, et al. Congenital dyserythropoietic anemia type I is caused by mutations in codanin-1. *Am J Hum Genet* 2002; 71:1467–1474.
  23. Liljeholm M., Irvine A., Vikberg A. et al. Congenital dyserythropoietic anemia type III (CDA III) is caused by a mutation in kinesin family member, KIF23. *Blood*, June 2013; 121: 23. 1790-1799.

## Estrategias en el manejo de las anemias diseritropoyéticas congénitas

CRISTINA DÍAZ DE HEREDIA RUBIO

*Servicio de Oncología y Hematología Pediátricas. Hospital Universitario Vall d'Hebron. Barcelona*

### Introducción

Las anemias diseritropoyéticas congénitas (ADC) constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades hereditarias consecuencia de alteraciones de la maduración de los precursores eritroides durante la eritropoyesis y un aumento de la fagocitosis y destrucción de éstos en la médula ósea, cuyo resultado es una producción insuficiente de reticulocitos, que contrasta con la hiperplasia de médula ósea (eritropoyesis ineficaz).

Las ADC se caracterizan por alteraciones morfológicas de los eritroblastos, y su clasificación está basada en éstas. Clásicamente se distinguen 3 tipos principales de ADC: tipo I, II y III, cada uno de ellos con características morfológicas particulares (Tabla 1). Sin embargo, se han descrito casos atípicos (ADC IV a VIII) y variantes, que no encuadran en los 3 tipos morfológicos principales. Recientemente se han podido identificar algunos de los genes implicados en los tres tipos principales de ADC (Tabla 1), e incluso se ha intentado establecer una asociación entre el genotipo y el fenotipo en los pacientes con ADC de tipo II.

Las ADC son enfermedades raras. No se conoce exactamente su frecuencia. Según los casos reportados en la literatura, en Europa se estima una incidencia de 1 caso por cada millón de habitantes, aunque esta estimación es probablemente inferior a la real al ser una enfermedad en la que hay pocos registros y dada la dificultad en el diagnóstico. Esta dificultad es la que ha llevado a que muchos pacientes fuesen diagnosticados durante muchos años de esferocitosis hereditaria, anemia hemolítica, talasemia, hemocromatosis, anemia ferropénica o síndrome mielodisplásico. La clave para el diagnóstico correcto es la asociación de anemia congénita, respuesta reticulocitaria insuficiente al grado de anemia y alteraciones morfológicas de los precursores eritroides en la médula ósea.

Las principales manifestaciones clínicas de la enfermedad son la anemia, la ictericia, la hepatoesplenomegalia, la colelitiasis, la hematopoyesis extramedular y la sobrecarga férrica (Tabla 1).

Actualmente se sabe que el principal mecanismo de la anemia en la ADC de tipo I es la eritropoyesis ineficaz: apoptosis intensa de los precursores eritroides con disminución marcada de la producción de glóbulos rojos en la médula ósea. En cambio, en la ADC de tipo II, existen dos mecanismos que cooperan para producir la anemia: la eritropoyesis ineficaz y la hemólisis periférica. Esta diferencia en la fisiopatología de los dos tipos de ADC es la que explica la diferente respuesta que presentan los pacientes a la esplenectomía.

La sobrecarga férrica es la principal complicación a largo plazo de los pacientes con ADC. Conduce a una disfunción orgánica secundaria: cirrosis hepática, fallo cardíaco e insuficiencia de las glándulas endocrinas (diabetes, hipotiroidismo e hipogonadismo). La sobrecarga férrica es debida a las transfusiones que pueden recibir los pacientes y fundamentalmente a un aumento muy importante de la absorción intestinal de hierro. Ésta es consecuencia de unos niveles inapropiadamente bajos de hepcidina, secundarios a la sobreexpresión de GDF15 en los pacientes con eritropoyesis ineficaz. Este aumento de la absorción intestinal de hierro explica la sobrecarga férrica que presentan los pacientes con anemia leve o moderada que no han recibido transfusiones.

El manejo de los pacientes dependerá de su edad, del tipo de ADC, de la intensidad de la expresión clínica de la enfermedad y de las comorbilidades del paciente. Los dos tipos de ADC I y II comparten el manejo de las principales manifestaciones clínicas; sin embargo, existen algunas particularidades que se deben tener en cuenta.

Aunque el único tratamiento curativo de la enfermedad es el trasplante de progenitores hematopoyéticos, en la mayoría de los casos, el manejo de la enfermedad es principalmente de soporte y está dirigido a evitar las consecuencias de la anemia y de la sobrecarga férrica.

**Tabla 1. Principales características clínicas y morfológicas de las ADC I, II y III**

Tipo	Herencia	Gen afecto	Edad de presentación	Alteraciones morfológicas en médula ósea	Signos y síntomas
I	AR	CDAN1	In utero Neonatal Infancia Adolescencia Adulto joven	MO: Binuclearidad asimétrica (3-7%) Puentes cromatina internucleares (1-3%) Núcleos irregulares (1-5%) ME: Patrón de cromatina en “queso Gruyère”	Anemia macrocítica Hidrops fetal Ictericia HEM Colelitiasis Sobrecarga férrica Raramente: Hiperplasia hueso frontal Alteraciones esqueléticas, ungueales y de la pigmentación cutánea
II	AR	SEC23B	La mayoría entre los 5 y los 30 años	MO: Binuclearidad simétrica (10-35%) Macrófagos pseudo-Gaucher ME: Doble membrana	Anemia normocítica Test de Ham + SDS-PAGE: migración anormal de la banda 3 Ictericia HEM Colelitiasis Sobrecarga férrica Raramente: Hidrops fetal Hematopoyesis extramedular paravertebral
III	AD	KIF23	?	MO: Multinuclearidad (hasta 12 núcleos/célula) ME: Múltiples hendiduras en los eritroblastos Precipitados intracitoplasmáticos de cadenas de β-globina	?

MO: microscopio óptico; ME: microscopio electrónico; HEM: hepatoesplenomegalia

## Manejo de la anemia

### Pacientes con ADC de tipo I

La mayoría presenta anemia durante la infancia, adolescencia o edad adulta joven, pero hay algunas formas de presentación *in utero* y durante el periodo neonatal y otras en la edad adulta más tardía. La anemia es, en la mayoría de los casos (70%), macrocítica (VCM de entre 100 y 120 fL), pero puede ser normocítica en niños.

Cuando la anemia se presenta *in utero*, los fetos suelen requerir transfusiones intrauterinas para evitar el hidrops. Asimismo, los niños en los que la anemia aparece en el periodo neonatal requieren transfusiones durante ese periodo e incluso durante los primeros años de vida. Sin embargo, menos de un 10% de los pacientes con ADC de tipo I quedan dependientes de transfusiones a largo plazo. La mayoría de los pacientes presentan una anemia moderada a lo largo de su vida y en la mayoría de ellos las necesidades transfusionales coinciden con infecciones, intervenciones quirúrgicas o con el embarazo.

El interferón α (IFN-α) ha demostrado tener un papel en el manejo de la ADC de tipo I. El efecto del IFN-α se puso de manifiesto cuando, tratando una hepatitis C a un paciente afecto de ADC de tipo I, Lavabre-Bertrand *et al.* observaron un aumento progresivo de los niveles de Hb del paciente. En el seguimiento a largo plazo se observó una disminución de los niveles de ferritina inversamente correlacionados con los niveles de Hb y una disminución del hierro hepático medido en la biopsia. El IFN-α a razón de 10<sup>6</sup> unidades tres veces a la semana o 2 x 10<sup>6</sup> unidades dos veces a la semana y el peginterferón-α<sub>2b</sub> administrado a 30 µg una vez a la semana incrementan los niveles de Hb y disminuyen la sobrecarga férrica en la mayoría de los pacientes, aunque sólo un número limitado de pacientes, incluidos los lactantes, han sido tratados. En estos últimos se ha descrito algún caso de neurotoxicidad con el tratamiento con IFN.

El papel de la esplenectomía en los pacientes afectados de ADC I es muy controvertido. Se han reportado en la literatura casos de no respuesta, probablemente debidos a que en la patogenia de este tipo de ADC no existe destrucción periférica de hematíes.

### Pacientes con ADC de tipo II

El diagnóstico de la ADC de tipo II es generalmente más tardío que el de la ADC de tipo I porque las manifestaciones clínicas son un poco más leves en general. Los signos y síntomas que llevan al diagnóstico de la enfermedad son la anemia principalmente, pero también la ictericia (90%), la esplenomegalia (70%) y la hepatomegalia (45%). La mayoría de los pacientes presentan una anemia normocítica leve/moderada. Pueden requerir una transfusión ante una infección, una intervención quirúrgica, durante el embarazo o durante las crisis aplásicas producidas por la infección por parvovirus B19.

En este tipo de ADC no se ha demostrado un papel terapéutico del IFN- $\alpha$ .

La esplenectomía puede aumentar los niveles de Hb y disminuir los requerimientos transfusionales, pero no previene la sobrecarga férrica. Únicamente está indicada en los pacientes en los que la hemólisis periférica es intensa, con el objetivo de aumentar los niveles de Hb y disminuir los requerimientos transfusionales si los tienen. No existen guías para este procedimiento en los pacientes con ADC de tipo II, por lo que los expertos recomiendan basar las indicaciones, el tipo de procedimiento, la profilaxis antiinfecciosa y los cuidados de la esplenectomía en las guías de tratamiento de la esferocitosis hereditaria (Bolton-Maggs, *Br J Haematol* 2011).

Posteriormente a la esplenectomía se deben tener en cuenta las posibles complicaciones tromboticas, aunque la esplenectomía por sí misma no es indicación de administrar una profilaxis antitrombótica.

La administración de eritropoyetina en los diversos tipos de ADC no ha conseguido incrementar los niveles de Hb.

### Manejo de la hiperplasia eritroide

Se utilizan fundamentalmente suplementos de ácido fólico y de vitamina B<sub>12</sub>, pero no existe ninguna evidencia de su eficacia.

### Manejo de la colelitiasis

En los casos de colelitiasis está indicada la colecistectomía. Dado que tampoco existen guías para el abordaje de esta complicación de las ADC, los expertos también recomiendan seguir las recomendaciones de las guías de manejo de la esferocitosis hereditaria (Bolton-Maggs, *Br J Haematol* 2011).

### Manejo de la sobrecarga férrica

Tampoco existen actualmente guías de manejo de la sobrecarga férrica en los pacientes con ADC, por lo que se recomienda seguir las guías para el manejo de

la sobrecarga férrica en los pacientes con talasemia (Angelucci E, *Haematologica* 2008).

A todos los pacientes, incluidos los pacientes con anemia leve que no requieren transfusiones, se les debe monitorizar regularmente la sobrecarga férrica. Se deben determinar periódicamente los niveles de ferritina así como medir la concentración de hierro hepático. Aunque la medición del hierro por biopsia continúa siendo el *gold standard*, actualmente ya se dispone de suficiente evidencia de la precisión de la determinación del hierro hepático por métodos no invasivos de resonancia magnética nuclear (RMN). La correlación entre el hierro hepático medido por RMN y por biopsia hace que ya se pueda recomendar la RMN como una alternativa a la biopsia.

Los pacientes que presentan ferritina > 1.000 ng/mL, concentración de hierro hepático por encima de los valores normales o han recibido más de 10 transfusiones deben recibir un tratamiento para quelar el hierro. Los pacientes que no presentan anemia son candidatos a las flebotomías, aunque algunos las toleran mal. Los pacientes anémicos y los que no toleran las flebotomías deben recibir tratamiento farmacológico. Aunque la deferoxamina continúa siendo un quelante muy efectivo y del que disponemos de más información, la opción de un tratamiento quelante oral es muy atractiva. El deferasirox a la dosis de entre 10 y 30 mg/kg/día sería una opción.

A todos los pacientes que reciben un tratamiento quelante se les deben monitorizar regularmente los niveles de ferritina para evitar infra- o sobretratarlos. Asimismo, se recomienda monitorizar y cuantificar el hierro hepático por RMN una vez al año. A los pacientes que no se quelan adecuadamente se les debe monitorizar el hierro cardiaco por RMN T2\*.

### Trasplante de progenitores hematopoyéticos

El trasplante de progenitores hematopoyéticos es el único tratamiento curativo de la enfermedad; sin embargo, la experiencia con este procedimiento es muy escasa. Los pacientes candidatos a trasplante son los pacientes dependientes de transfusiones y resistentes a IFN (ADC de tipo I).

Se han publicado 7 casos en la literatura, 6 de médula ósea de donante hermano HLA idéntico y uno de médula ósea de donante no emparentado. Todos los pacientes presentaban formas graves de ADC dependientes de transfusiones. Seis eran niños, uno de ellos tenía antecedentes de hidrops fetal y de transfusiones intrauterinas. Un paciente afecto de ADC de tipo II y rasgo  $\beta$ -talasémico, dependiente de transfusiones, fue transplantado de adulto. El tratamiento de acondicionamiento fue variado, aunque en la mayoría de los casos se realizó siguiendo las recomendaciones del grupo italiano para acondicionar a

los pacientes con talasemia mayor. Todos los pacientes injertaron, aunque un paciente requirió un segundo trasplante por un fallo de injerto secundario. En el momento de la publicación, todos los pacientes estaban libres de transfusiones (Tabla 3).

De forma similar a los pacientes con talasemia mayor, se aconseja valorar la sobrecarga férrica de los pacientes antes del trasplante y estratificarlos en grupos de riesgo (clases I, II y III) siguiendo los criterios de Pesaro. Estos criterios clasifican a los pacientes talasémicos con el objetivo de ajustar el tratamiento de acondicionamiento al riesgo y conseguir los mejores resultados del trasplante.

Dado que en el postrasplante los pacientes todavía persisten con sobrecarga férrica, se aconseja tratarla hasta conseguir niveles de ferritina < 500 ng/mL y la normalización del hierro hepático. En esta fase las flebotomías pueden ser una opción.

### Conclusión

Las ADC son un grupo heterogéneo de enfermedades hereditarias caracterizadas por eritropoyesis ineficaz y sobrecarga férrica. Hasta la actualidad el único tratamiento curativo es el trasplante de progenitores hematopoyéticos, pero es un procedimiento con riesgo de morbimortalidad, por lo que únicamente está indicado en los pacientes que presentan manifestaciones clínicas graves y son dependientes de transfusiones. El manejo de estas enfermedades es de soporte, encaminado a evitar las consecuencias de la anemia y de la sobrecarga férrica. El IFN- $\alpha$  aumenta

los niveles de Hb y disminuye la sobrecarga férrica en los pacientes con ADC de tipo I. La esplenectomía aumenta los niveles de Hb y reduce las necesidades transfusionales en los pacientes con ADC de tipo II. A todos los pacientes, independientemente del grado de anemia que presenten, se les debe monitorizar la sobrecarga férrica mediante mediciones periódicas de ferritina y cuantificando el hierro hepático. Los pacientes con sobrecarga férrica deben recibir un tratamiento quelante para evitar la disfunción orgánica secundaria a ésta.

### Bibliografía

1. Renella R, Wood WG. The congenital dyserythropoietic anemias. *Hematol Oncol Clin N Am*, 2009; 283-306.
2. Iolascon A, Esposito MR, Russo R. Clinical aspects and pathogenesis of congenital dyserythropoietic anemias: from morphology to molecular approach. *Haematologica* 2012; 97: 1786-1794.

Tabla 2. Tratamiento específico de las ADC

Tipo de ADC	Tratamiento específico
I	IFN- $\alpha$ TPH
II	Esplenectomía TPH
III	? TPH

Tabla 3. ADC. Casos publicados, tratados con TPH

Autor	Tipo de ADC	Manifestaciones clínicas pretrasplante	Edad al trasplante	Donante	Acondicionamiento	Injerto días > 500 PMN	Independencia transfusional postrasplante
Iolascon, 2001	ADC II y rasgo $\beta$ -talasémico	Dependencia transfusional Sobrecarga férrica No respuesta a esplenectomía	Adulta	Hermano HLA idéntico	BU + FLU + TT	+ 14	Sí
Ayas, 2002 n = 3	ADC I ADC I ADC I	Dependencia transfusional y sobrecarga férrica	1,8 años 10 años 4,4 años	Hermano HLA idéntico	BU + CY + ATG	+20 +22 +16	Sí
Remacha, 2002	ADC	Hidrops fetal Transfusiones intrauterinas Dependencia transfusional	13 meses	Hermano HLA idéntico	BU + CY	+12	Sí
Ariffin, 1996	ADC	Dependencia transfusional	5 años	Hermano HLA idéntico	BU + CY	Fallo de injerto secundario 2.º trasplante	Sí
Buchbinder 2012	ADC II	Dependencia transfusional Sobrecarga férrica grave	5 años	Donante no emparentado	BU + CY + FLU + TT (+ azatioprina)	+17	Sí

BU: busulfan; FLU: fludarabina; TT: tiotepa; CY: ciclofosfamida; ATG: globulina antitumoral

3. Heimpel H, Matuschek A, Ahmed M, Bader-Meunier B, Colita A, Delaunay J et al. Frequency of congenital dyserythropoietic anemias in Europe. *Eur J Haematol* 2010; 85: 20-25.
4. Heimpel H, Schwarz K, Ebnöther M, Goede JS, Hedydrich D, Kamp T et al. Congenital dyserythropoietic anemia type I (CDA I): molecular genetics, clinical appearance, and prognosis based on long-term observation. *Blood* 2006; 107: 334-340.
5. Heimpel H, Anselletter V, Chrobak L, Denecke J, Einsiedler B, Gallmeier K et al. Congenital dyserythropoietic anemia type II: epidemiology, clinical appearance, and prognosis bases on long-term observation. *Blood* 2003; 102: 45.
6. Iolascon A, Russo R, Espasito MR, Asci R, Piscopo C, Perrotta S et al. Molecular analysis of 42 patients with congenital dyserythropoietic anemia type II. New mutations in the SEC23B gene and a search for genotype-phenotype relationship. *Haematologica* 2010; 95: 708-715.
7. Lavabre-Bertrand T, Ramos J, Delfour C, Henry L, Guiraud I, Carillo S et al. Long-Term alpha interferon treatment is effective on anaemia and significantly reduces iron overload in congenital dyserythropoiesis type I. *Eur J Haematol* 2004; 73: 420-423.
8. Perez N, Dommergues M, Zupan V, Chambost H, Fieschi JB, Delaunay J et al. Severe congenital dyserythropoietic anaemia type I: prenatal management, transfusion support and alpha-interferon therapy. *Br J Haematol* 2000; 110: 420-423.
9. Bolton-Maggs PHB, Langer JC, Iolascon A, Tittensor P, King M-J. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis – 2011 update. *Br J Haematol* 2011; 156: 37-49.
10. Angelucci E, Barosi G, Camaschella CL, Caappellini MD, Cazzola M, Galanello R et al. Italian Society of Hematology practice guidelines for the management of iron overload in Thalassemia major and related disorders. *Haematologica* 2008; 93: 741-752.
11. Ariffin WA, Karnaneedi S, Choo KE. Congenital dyserythropoietic anaemia: Report of three cases *J Paediatr Child Health* 1996; 32: 191.
12. Iolascon A, Sobato V, De Mattia D, Locatelli F. Bone marrow transplantation in a case of severe type II congenital dyserythropoietic anaemia (CDA II). *Bone Marrow Transplant* 2001; 27: 213-215.
13. Ayas M, Al-Jefri A, Baothman A, Al-Mahr M, Mustafa MM, Khalil S et al. Transfusion-dependent congenital dyserythropoietic anaemia type I successfully treated with allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002; 29: 681-682.
14. Remacha AF, Badell I, Pujol-Moix N, Parra J, Muñoz-díaz E, Guinovart G. Hydrops fetalis-associated congenital dyserythropoietic anaemia treated with intra-uterine transfusions and bone marrow transplantation. *Blood* 2002; 100: 356-358.
15. Buchbinder D, Nugent D, Vu D, Soni A, Stites J, Hsieh L et al. Unrelated hematopoietic stem cell transplantation in a patient with congenital dyserythropoietic anemia and iron overload. *Pediatr Transplantation* 2012; 16: E69-E73.
16. Lucarelli G, Galimberti M, Polchi P, Angelucci E, Baronciani D, Giardini C et al. Bone Marrow Transplant in patients with thalassemia. *N Eng J Med* 1990; 32: 417-421.
17. La Nasa G, Argioli F, Giardini C, Pession A, Fagioli F, Caocei G et al. Unrelated bone marrow transplantation for Beta-thalassaemia patients: The experience of the Italian Bone Marrow Transplantation Group. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1054: 186-195.

## Anemia diseritropoyética congénita de tipo III: nuevo caso esporádico con algunas peculiaridades citomorfológicas

R. MORALES<sup>1</sup>, I. PÉREZ DE SOTO<sup>1,2</sup>, J. SÁNCHEZ<sup>3</sup>, R. FERNÁNDEZ<sup>3</sup>, C. PRATS<sup>1</sup>, J. DE BLAS<sup>1</sup>, T. CABALLERO<sup>1</sup>, A. HERRERA<sup>1</sup>, E. CARRILLO<sup>1</sup>, C. CALDERÓN<sup>1</sup>, R. BERNAL<sup>1</sup>, A. MARTÍN-NOYA<sup>1</sup>, J.A. PÉREZ-SIMÓN<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Diagnóstico Citológico. UGC Hematología y Hemoterapia.

Hospitales Universitarios Virgen del Rocío (HHUUVR). Sevilla

<sup>2</sup> Hematología Pediátrica. UGC HH. HHUUVR. Sevilla

<sup>3</sup> UGC Genética, Reproducción y Medicina Fetal. HHUUVR. Sevilla

### Motivo de estudio y presentación del caso

Recién nacido con anemia severa y plaquetopenia.

### Historia clínica

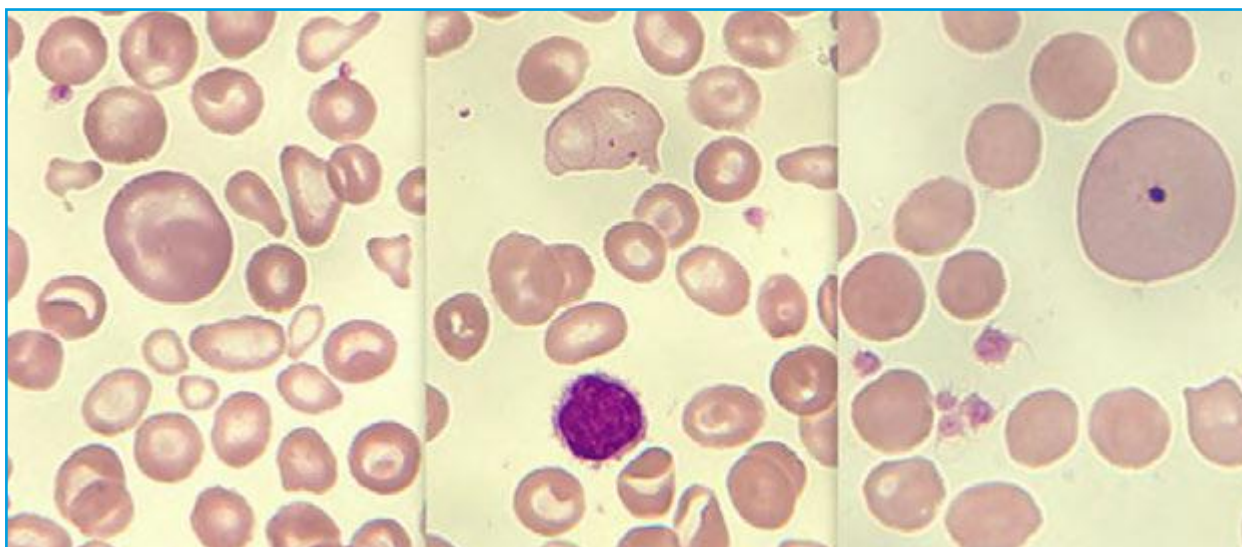
Varón que, tras gestación y parto sin incidencias, y sin antecedentes familiares de interés (no consanguinidad en los progenitores, hermana sana), ingresa con una hora de vida en la UCI-Neonatal con afectación de su estado general, hepatomegalia de 5 cm bajo el reborde costal y esplenomegalia de 4 cm, y sospecha de sepsis sin otros hallazgos. En las pruebas analíticas presenta una hemoglobina 67 g/L, hematocrito 0,214 L/L, hematíes  $1,6 \times 10^{12}/L$ , VCM 126 fL, HCM 39 pg, CHCM 31 g/dL, leucocitos  $20,6 \times 10^9/L$  (neutrófilos segmentados 24%, cayados 2%), eritroblastos 28/100 leucocitos, plaquetas  $56 \times 10^9/L$ , bilirrubina total 14,2 mg/dL, bilirrubina directa 10,02 mg/dL; resto sin alteraciones relevantes (serologías negativas a CMV, PV B19, VHB y VHC). Ingresa durante un mes hasta su recuperación, con una evolución tórpida, incluyendo una sepsis tardía por *E. coli*, recibiendo concentrados de hematíes en tres ocasiones.

Con 3 meses de vida mantiene una hemoglobina de 76 g/L, VCM 84 fL, HCM 30,4 pg, CHCM 38, reticulocitos  $21 \times 10^9/L$ , leucocitos  $4,84 \times 10^9/L$  (con recuento diferencial normal), y plaquetas  $294 \times 10^9/L$ . Se practica un examen morfológico de la sangre periférica que muestra numerosas anomalías eritrocitarias, como anisopoiquilocitosis severa, formas macrocíticas, anisocromía, punteado basófilo, cuerpos de Howell-Jolly, anillos de Cabot y cuerpos de Pappenheimer (Figura 1), y eritroblastos (1/100 leucocitos), por lo que se procede a realizar un aspirado de médula ósea. El mielograma es hiper celular a expensas de una hiperplasia eritroide (53%), conservándose la granulopoyesis (32%) y las restantes series; relación eritro/mieloide invertida, 1,65; llama la atención las numerosas e importantes anoma-

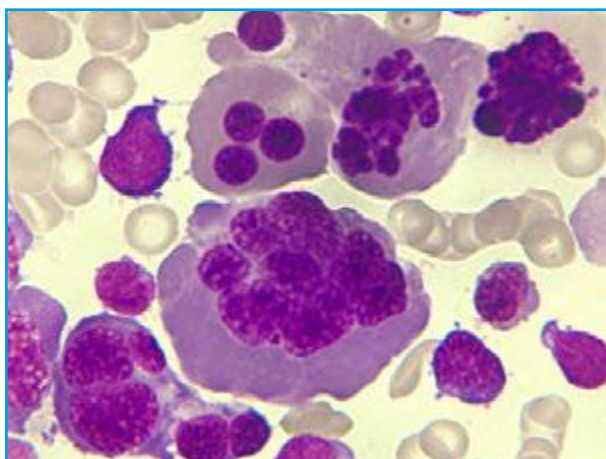
lías morfológicas en todas las etapas madurativas de la eritropoyesis (71%, en una evaluación de 500 eritroblastos); granulopoyesis normal; megacariopoyesis con un 45% de formas pequeñas y en general plaquetógenas. En la serie roja destaca una acentuada multinucleación (de 100 elementos dismórficos, 26 presentan 3 o más núcleos, y 15 son binucleados) con lóbulos de tamaños uniformes o dispares, gigantismo y cambios megaloblásticos (Figuras 2 y 3), pérdidas de material nuclear, cariorrexis (Figura 4), mitosis complejas muy patológicas (Figura 5), punteado basófilo prominente y a menudo grosero (Figura 6), imágenes de extrusión nuclear (Figura 7), hematíes gigantes (Figura 8) y puentes internucleares (Figura 9); hierro hemosiderínico en los macrófagos aumentado (3+/4+), sideroblastos normales 39%, patológicos 23%, en anillo 8%; no se observa positividad de la reacción del PAS en los eritroblastos. El estudio citomorfológico es consistente con el diagnóstico de diseritropoyesis congénita de tipo III. En las pruebas complementarias se constata una sideremia de 166 mg/dL, capacidad de fijación 181  $\mu\text{g}/\text{dL}$ , índice de saturación 96%, ferritina 547  $\mu\text{g}/\text{dL}$ , y haptoglobina 7 mg/dL; son normales o negativas las determinaciones de vitamina B<sub>12</sub>, ácido fólico, y electroforesis de hemoglobinas. Coombs directo y el test de Ham; serologías negativa a parvovirus B19, CMV-IgM, y VHB; cariotipo en médula ósea: 46,XY.

### Evolución

Transcurre clínicamente sin incidencias relevantes y sin nuevas demandas transfusionales. A los 18 meses de vida se aprecia un crecimiento asimétrico de los huesos frontales y hundimiento de la fontanela correspondiente, radiológicamente con cráneo "en cepillo", y en TAC un ensanchamiento del díploe. Se procede a una reevaluación hematológica en la que se encuentra una morfología de la sangre periférica parecida a la primera, con eritroblastos



**Figura 1.** Sangre periférica (MGG, x 1.000). A la izquierda, anisopoikilocitosis, anisocromía. En el centro, un gran eritrocito con un anillo de Cabot y cuerpos de Pappenheimer. A la derecha, un macroovalocito con un cuerpo de Howell-Jolly.



**Figura 2.** Médula ósea (MGG, x 1.000). Hiperplasia de la serie roja, con numerosos fenómenos de gigantismo y multinuclearidad, que se produce en diversas fases de la maduración eritroide.

1/100 leucocitos, y un mielograma también similar al previo; LDH 1.410 UI/dL, haptoglobina 0 mg/dL, sideremia 98 mg/dL, transferrina 168 mg/dL, ferritina 94 µg/dL, y eritropoyetina 117 mU/L (normal 4-30 mU/L); son normales el test de Ham y la determinación de G-6PD.

Actualmente el niño tiene 10 años, con una estabilización media de las cifras de hemoglobina en torno a 106 g/L (± 5), con índices eritrocitarios normales, reticulocitos  $71 \times 10^9/L$  (± 31), sin nuevos requerimientos transfusionales; bilirrubina total 2 mg/dL (± 0,5), LDH 962 U/L (± 39), ferritina 59 µg/L (± 19), y presencia de hemosiderinuria. Hemoglobina F 2,9%. Se mantiene clínicamente asintomático, sin esplenomegalia (verificada ecográficamente) y sin signos de litiasis biliar; presenta una

columna recta con tendencia a cifosis y un genu valgo bilateral funcional (marcha normal), con rodillas y ejes conservados; no tiene trastornos oftalmológicos.

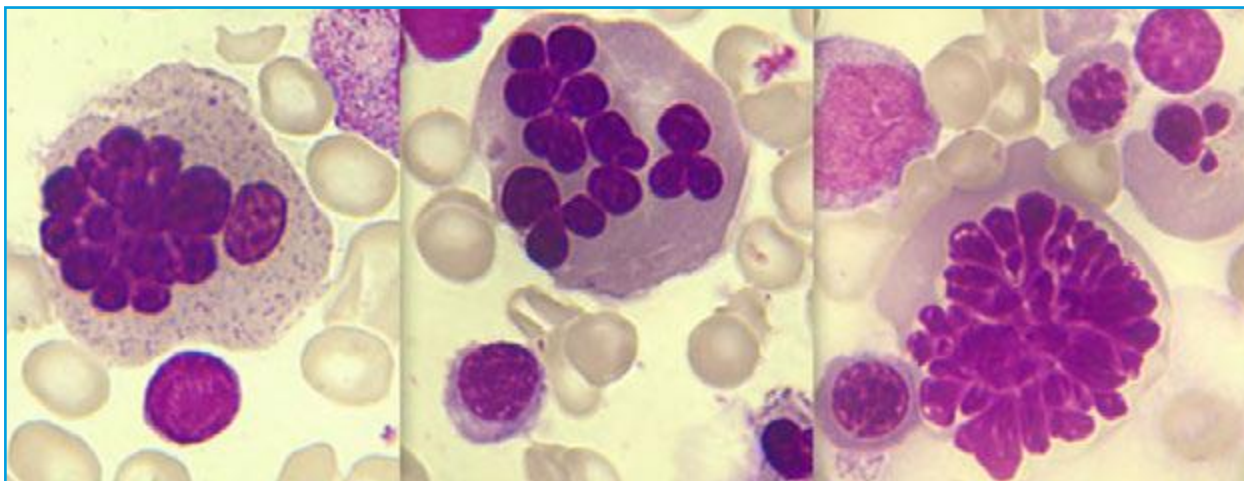
El análisis citogenético de la familia (paciente, padres y una hermana menor) en linfocitos estimulados de sangre periférica es normal. El estudio mediante hibridación *in situ* fluorescente con las sondas CEP15/SNRPN/PML localizadas en 15p11.2, 15q11.1-q13 y 15q22.1-q22.3 es compatible con una dotación y localización normal en ambos cromosomas homólogos en todos los miembros de la familia.

## Discusión

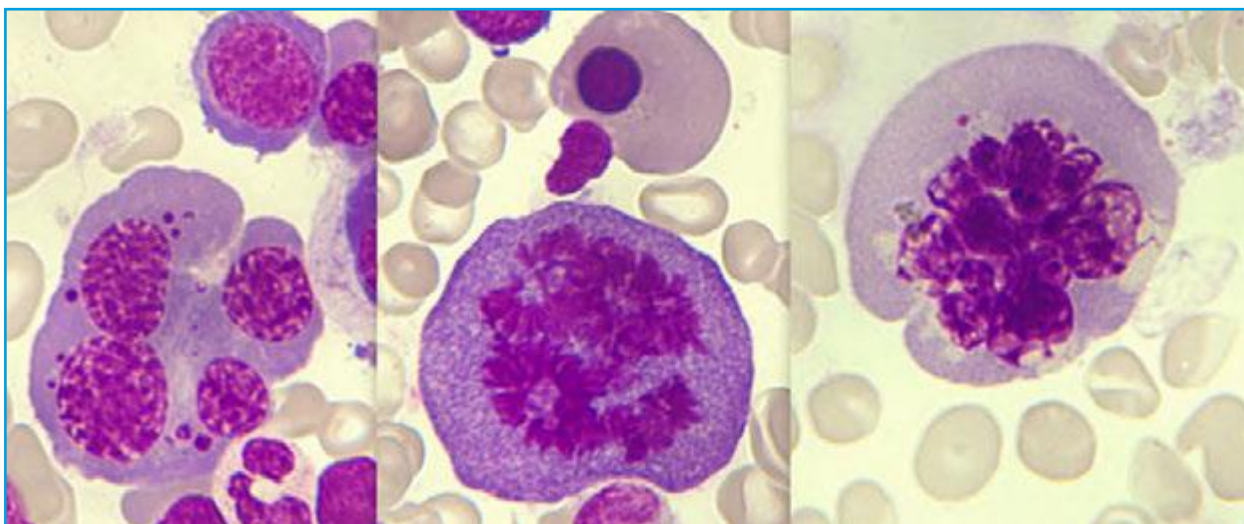
La anemia diseritropoyética congénita de tipo III (ADC III) es una enfermedad rara pero bien definida morfológicamente por el fenotipo celular, en particular por la multinuclearidad y displasia de los precursores eritroides en la médula ósea, siendo habitualmente normales la granulopoyesis y la megacariopoyesis<sup>(1-3)</sup>. Se incluye en un grupo complejo de entidades congénitas caracterizadas por anemia hemolítica crónica, y eritropoyesis ineficaz, cuya clasificación aún no está bien establecida debido a la diversidad de la herencia genética y de los genes involucrados, a la heterogeneidad de la diseritropoyesis y de los requerimientos terapéuticos<sup>(4-6)</sup>.

La ADC III es la variedad menos común de las clásicamente reconocidas, y entre sus peculiaridades destaca en la mayoría de los pacientes la ausencia de hemosiderosis significativa, conservando niveles normales de ferritina, debido a la hemosi-





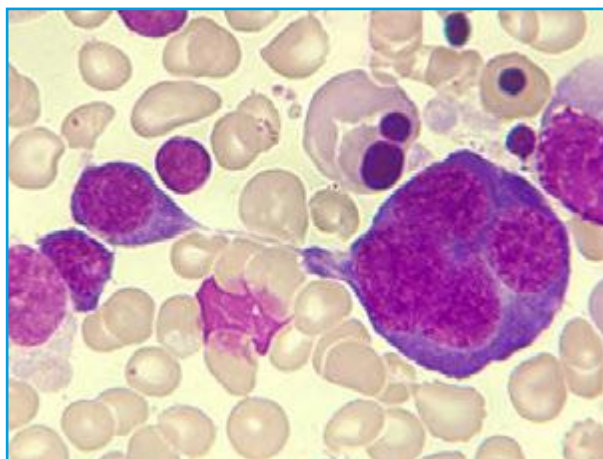
**Figura 3.** Médula ósea (MGG, x 1.000). Eritroblastos con más de 12 núcleos (izquierda y centro). A la derecha, elemento hiperlobulado.



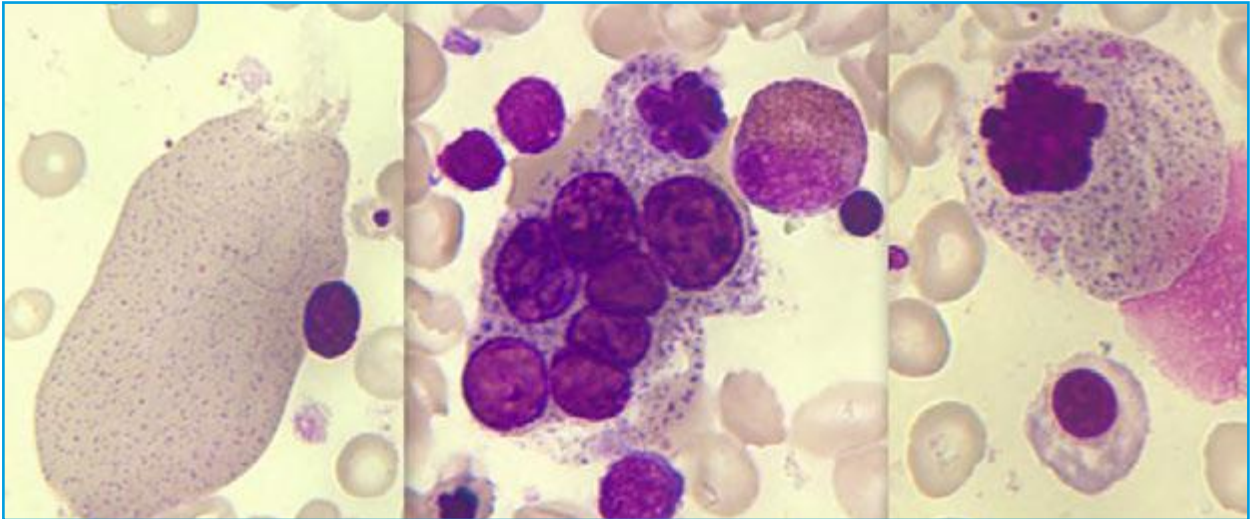
**Figura 4.** Médula ósea (MGG, x 1.000). Eritroblasto con cuatro núcleos y restos cromatínicos (izquierda). Imagen de mitosis multipolar (centro). Forma eritroide multinucleada en cariorrexis (derecha).

derinuria que sufren como consecuencia de hemólisis preferentemente intravascular<sup>(10)</sup>. A diferencia de esta situación, en algunos casos esporádicos no se constata hemosiderina en el sedimento de orina, produciéndose en ellos una sobrecarga férrica y sus consecuencias clínicas<sup>(9)</sup>. En todos los enfermos se describe un incremento de hierro en los macrófagos medulares y presencia de escasos sideroblastos en anillo.

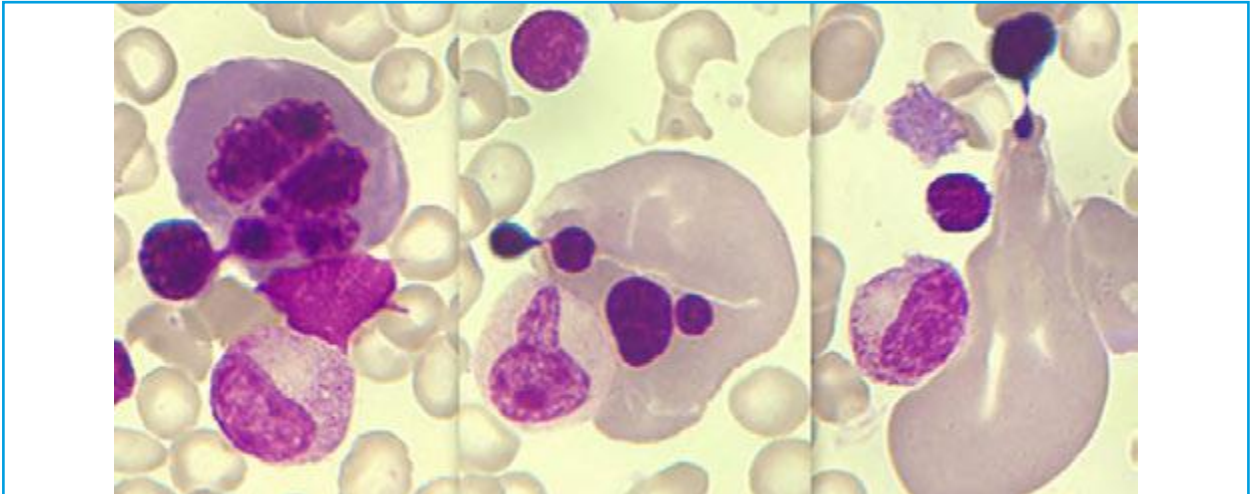
Contrasta la severidad de la displasia eritroide con la moderación de la anemia y la benignidad del curso clínico. Algunas investigaciones sugieren que el gigantismo y la multinuclearidad de los eritroblastos es consecuencia de fallos en la fase G2 del ciclo celular y en las mitosis, más que en una síntesis anormal del ADN<sup>(1)</sup>. Se señala en algunas familias cierta prevalencia de gammopatías monoclonales, y desarrollos puntuales de neoplasias linfoprolife-



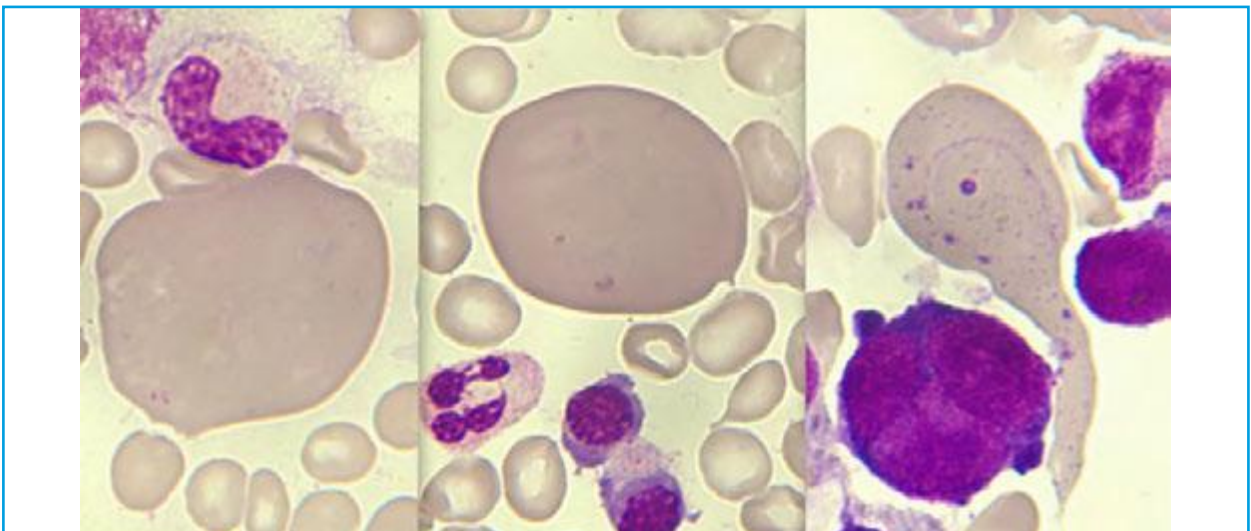
**Figura 5.** Médula ósea (MGG, x 1.000). Mitosis asimétrica: de una parte, un eritroblasto basófilo mononucleado, y en el otro extremo del puente intercitoplásmico, un elemento con cuatro lóbulos nucleares.



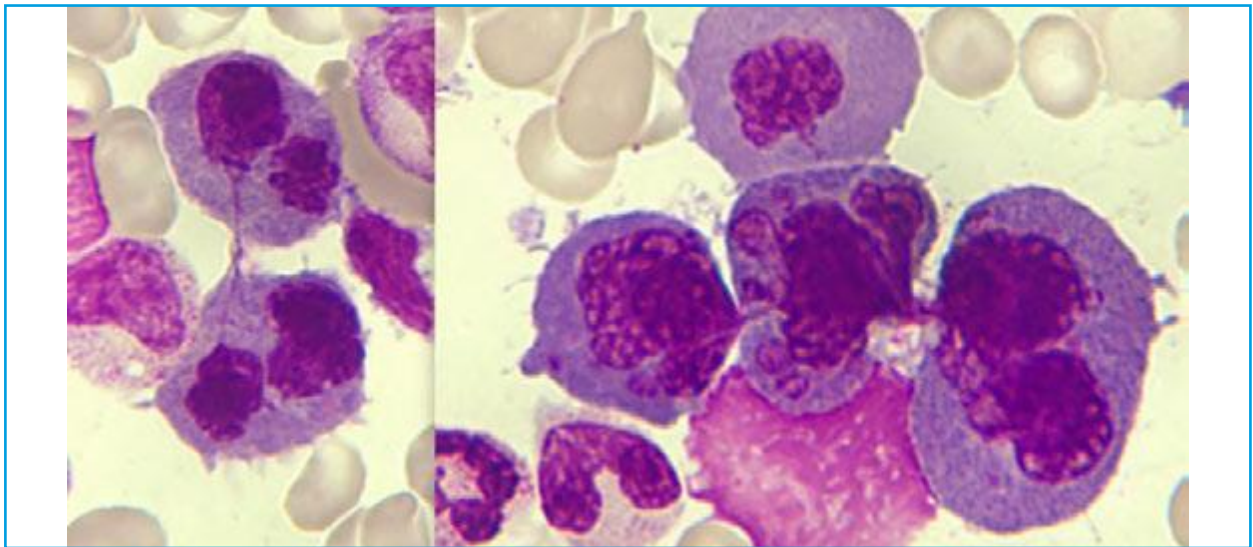
**Figura 6.** Médula ósea (MGG, x 1.000). Punteado basófilo prominente en un eritrocito gigante que acaba de perder su núcleo (izquierda) y en distintos precursores de la eritropoyesis (centro y derecha).



**Figura 7.** Médula ósea (MGG, x 1.000). Imágenes de extrusión nuclear.



**Figura 8.** Médula ósea (MGG, x 1.000). Eritrocitos gigantes. A la derecha, un hematíe grande y deforme muestra un anillo de Cabot, punteado basófilo y probables restos cromatinicos.



**Figura 9.** Médula ósea (MGG, x 1.000). Eritroblastos en mitosis con puentes internucleares manifiestamente patológicos, especialmente en la imagen derecha.

rativas<sup>(7,8)</sup>. Excepcionalmente se comunican focos de hematopoyesis extramedular<sup>(9)</sup>. Su herencia, autosómica, se define unas veces como dominante y otras como recesiva, con casos familiares y esporádicos, respectivamente. Estos últimos podrían deberse además a mutaciones *de novo*. El defecto genético se localiza en el cromosoma 15q22, sin que se conozca actualmente el gen causal<sup>(10,11)</sup>. En algunos casos familiares se describe la incidencia de degeneración macular en la retina y estrías vasculares, por lo que se debe programar en estos enfermos la revisión del fondo de ojo<sup>(12)</sup>. El diagnóstico diferencial se plantea con otros tipos de ADC<sup>(6)</sup>, y con diversos procesos congénitos que se acompañan de diseritropoyesis, como talasemias, anemias sideroblásticas congénitas, determinadas hemoglobinopatías, y trastornos de las vías metabólicas de la vitamina B<sub>12</sub> y de los folatos. El tratamiento suele ser simple, y limitado a la reposición de folatos (aproximadamente 5 mg a la semana) que determina la permanente hiperplasia de la eritropoyesis, los requerimientos transfusionales son excepcionales, y habitualmente no se precisa control terapéutico sobre las reservas de hierro.

Aportamos un nuevo caso de ADC III, con un seguimiento clínico durante 10 años sin incidencias relevantes, una leve anemia con hemólisis crónica, hemosiderinuria, y sin esplenomegalia. Con el microscopio óptico las dismorfias de la eritropoyesis son similares a las mencionadas en otros enfermos de ADC III, afectando todas las anomalías a las distintas formas evolutivas, desde eritroblastos basófilos a ortocromáticos. No obstante, destacamos la observación inusual de eritroblastos patológicos con más de 12 núcleos o lóbulos nucleares

(Figura 3). Asimismo cabe resaltar el gigantismo de muchos eritrocitos, de un tamaño muy superior al de los circulantes (Figura 7), de frecuentes divisiones celulares de asimetría aberrante (Figuras 5 y 9-derecha), la observación relativamente común de fenómenos de extrusión nuclear (Figura 7) y el hallazgo de puentes internucleares (Figura 9). La granulopoyesis puede considerarse normal, tanto morfológicamente como en su cuantía. En cambio, aun siendo la cifra de plaquetas normal, de 30 megacariocitos 14 son pequeños y formadores de plaquetas en su mayoría (Figura 10).

#### A recordar

- La ADC III es una enfermedad rara que puede manifestarse como caso aislado (esporádico) o en un contexto familiar. Se debe sospechar en pacientes con anemia leve-moderada, no carencial, con actividad hemolítica, no inmune, intravascular con hemosiderinuria. La sangre periférica presenta importantes alteraciones eritrocitarias, especialmente anisocitosis, anisocromía, formas macrocíticas, y hallazgo de eritroblastos.
- En su diagnóstico, es clave el fenotipo celular de la diseritropoyesis medular, marcado por el gigantismo y la multinuclearidad de los eritroblastos.
- Los requerimientos terapéuticos suelen limitarse a suplementos de ácido fólico oral, siendo excepcional la demanda hemoterápica. Es conveniente una revisión oftalmológica del fondo de ojo en previsión del desarrollo de lesiones retinianas.

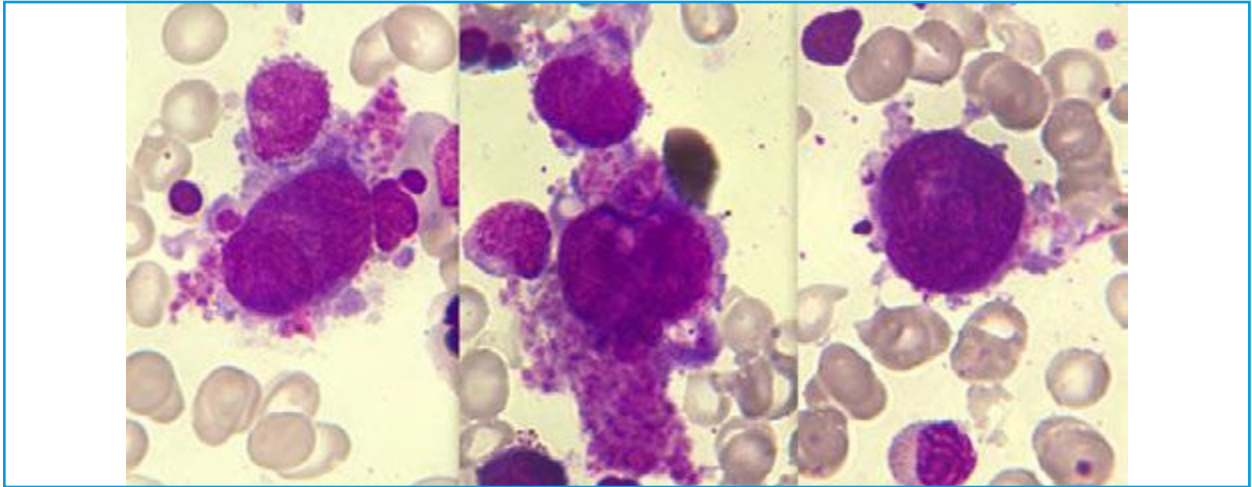


Figura 10. Médula ósea (MGG, x 1.000). Megacariocitos pequeños, formadores de plaquetas.

### Bibliografía

1. Wickramasinghe S.N., Parry T.E., Willians C., Bond A.N., Hughes M., Crook S. A new case of congenital dyserythropoietic anaemia, type III: studies of the cell cycle distribution and ultrastructure of erythroblasts and of nucleic acid synthesis in marrow cells. *J Clin Pathol* 1982; 35:1103-1109.
2. Sandström H., Wahlin A. Congenital dyserythropoietic anemia type III. *Haematologica* 2000; 85:753-757.
3. Sigler E., Shaft D., Shtalrid M., Shvidel L., Berrebi A., Resnitzky P. New sporadic case of congenital dyserythropoietic anemia type III in an aged woman: detailed description of ultrastructural findings. *Am J Hematol* 06/2002; 70(1):72-6.
4. Heimpel H. Congenital dyserythropoietic anemias: epidemiology, clinical significance, and progress in understanding their pathogenesis. *Ann Hematol* (2004) 83: 613-621.
5. Wickramasinghe S.N., Wood W.G. Advances in the understanding of the congenital dyserythropoietic anaemias. *Br J Haematol* 2005; 131, 431-446.
6. Iolascon A., Esposito M.R., and Russo R. Clinical aspects and pathogenesis of congenital dyserythropoietic anemias: from morphology to molecular approach. *Haematologica* 2012; 97(12): 1786-1794.
7. Sandström H., Wahlin A., Eriksson M., Bergström I, Wickramasinghe S.N. Intravascular haemolysis and increased prevalence of myeloma and monoclonal gammopathy in congenital dyserythropoietic anaemia, type III. *Eur J Haematol* 1994; 52(1): 42-46.
8. McCluggage W.G., Mayne E., Bharucha H., Wickramasinghe S.N. Malignant lymphoma in congenital dyserythropoietic anaemia type III. *J Clin Pathol* 1996; 49:599-602.
9. Krouwels, F.H., Bresser, P. von dem Borne A.E.G.K. Extramedullary Hematopoiesis: Breathtaking and Hair-Raising. *N Engl J Med* 1999; 341:1702-1704.
10. Ribeiro M.L., Magalhaes Maia T. Anemias Diseritropoyéticas Congénitas. Programa educacional. LIV Reunión Nacional de la SEHH 2012.
11. Lind L., Sandström H., Wahlin A., Eriksson M., Nilsson-Sojka B., Sikström C., Holmgren G. Localization of the gene for congenital dyserythropoietic anemia type III, CDAN3, to chromosome 15q21-q25. *Hum Mol Genet* 1995; 4:109-112.
12. Sandström H., Wahlin A., Eriksson M., Holmgren G, Lind L., Sandgren O. Angioid streaks are part of a familial syndrome of dyserythropoietic anaemia type III. *Br J Haematol* 1997; 98, 845-849.

## La célula stem y el microambiente: de la fisiopatología a la terapia celular

COORDINADORES: M.<sup>a</sup> CONCEPCIÓN HERRERA ARROYO. *Unidad de Terapia Celular. Hospital Universitario Reina Sofía. Madrid*  
FERMÍN SÁNCHEZ-GUIJO MARTÍN. *Servicio de Hematología. Hospital Clínico Universitario de Salamanca*

El desarrollo del concepto de célula *stem* a partir de los trabajos de Till y McCulloch a principios de los años 60 permitió no sólo profundizar en el conocimiento de la hematopoyesis sino apoyar la utilización de estas células con fines terapéuticos en el contexto del trasplante de progenitores hematopoyéticos. A partir del año 2000 comenzaron las primeras demostraciones experimentales de que células progenitoras hematopoyéticas procedentes de la médula ósea en distintos modelos de daño tisular acudían a la región alterada y contribuían al proceso de reparación tisular. Estos datos sentaron las bases para el desarrollo de un número exponencial de estudios experimentales y ensayos clínicos que están evaluando la función reparadora de estas células en diferentes contextos clínicos, lo que ha llevado a un desarrollo de un nuevo campo científico que hoy conocemos como terapia celular, donde la célula hematopoyética sigue siendo protagonista.

Los conocimientos generados a partir de los estudios de la célula *stem* hematopoyética normal y su funcionamiento han contribuido al mejor conocimiento de su contrapartida tumoral en las diversas hemopatías malignas, y el estudio de las células *stem* leucémicas y sus mecanismos de resistencia son un campo enormemente activo de la investigación en hematología.

Sin embargo, los progenitores hematopoyéticos no están solos en la médula ósea. De la visión inicial del nicho hematopoyético medular como un mero elemento de soporte hemos pasado a una visión funcional del mismo en la que existen numerosos tipos celulares que intervienen en la regulación hematopoyética, tanto en condiciones normales como en las hemopatías malignas. Además, existen en el nicho diversos tipos celulares no hematopoyéticos con características de célula *stem* y también con propiedades reparadoras de tejidos no hematopoyéticos.

En el presente simposio se pretende dar una visión integradora de todos estos aspectos relacionados con el papel de la célula *stem* y del nicho hematopoyético, desde su contribución clave en el desarrollo de las hemopatías malignas a su aplicación con fines terapéuticos.

Para ello, el Dr. Raaijmakers, uno de los primeros autores en resaltar cómo una alteración exclusiva del nicho medular es capaz de inducir el desarrollo de una hemopatía, nos mostrará los principales mecanismos por los que el nicho leucémico contribuye al desarrollo y mantenimiento de las hemopatías, y cómo este conocimiento contribuye al diseño de nuevas dianas terapéuticas.

El Dr. Prósper nos dará una visión de los diferentes tipos celulares con capacidad reparadora que existen en la médula ósea, entre los que se incluyen tanto los progenitores hematopoyéticos como los progenitores mesenquimales, cuyo potencial regenerativo e inmunomodulador amplía notablemente las posibilidades terapéuticas.

Finalmente, cerrará el simposio el Dr. García, que revisará el estado actual de las distintas posibilidades terapéuticas de las células procedentes del sistema linfoide, tanto en las aplicaciones inmunoterapéuticas antileucémicas como antiinfecciosas.

Con todo ello se pretende, como ya se ha indicado, que el simposio permita revisar dos aspectos opuestos de todos estos tipos celulares: por un lado, sus implicaciones en el desarrollo y mantenimiento de las hemopatías y, por otro, su potencial terapéutico en diferentes contextos clínicos.

## Deconstructing niche contributions to oncogenesis in the hematopoietic system: progress and challenges

MARC H.G.P. RAAIJMAKERS, M.D, PH.D

*Department of Hematology and Erasmus Stem Cell Institute. Erasmus University Medical Center. Rotterdam, The Netherlands*

The early events driving the initiation and malignant evolution of pre-malignant states remain largely unknown but increasing evidence supports a role for the tissue microenvironment. In the hematopoietic system, this view is fueled by several intriguing observations that have long been at odds with the notion of a predominantly hematopoietic cell autonomous genesis of malignant transformation. These include the well described, albeit rare, phenomenon of donor cell-derived hematopoietic neoplasm, defined as oncogenic transformation of apparently normal donor hematopoietic cells in the transplant recipient (but not the donor). Also, the inability to propagate certain leukemias, derived from humans or mice, in (immunodeficient) mice appears to be incongruent with the view of hematopoietic cell autonomous exertion of all cancer cell characteristics. Albeit infrequent, these observations defy the dogma that the events that initiate cancer, or its defining characteristics, are under all circumstances and completely cancer cell autonomous.

Hematopoietic cells live in a complex mesenchymal environment, characterized by heterotypic signaling between ancillary cells and hematopoietic elements. This signaling is considered instrumental in the regulation of the behavior of HSPC. Cell types that, to date, have been implicated in this regulatory environment include (overlapping) mesenchymal cell populations such as osteolineage cells, *Cxcl12*-expressing reticular cells, osteo(adipo) progenitor cells, *Nestin*-expressing cells and perivascular cells.

How, in principle, can such ancillary tissue cells play a role in oncogenesis? Experimental data support several views. First, tumour cells can usurp existing HSC niches and take advantage of niche specific signalling for their maintenance and survival. This can be achieved through competition for niches with normal tissue residents, particularly stem and progenitor cells, or by actively repressing normal hematopoiesis or 'hijacking' these niches. Secondly, tumour cells may manipulate their environment in

such a way that the environment becomes a facilitator of promoting tumour progression and metastasis. Thirdly, it is conceivable that disruption of heterotypic signalling between HSCs and their niches contributes to cancer initiation. Recent observations in 'stem cell niches' of murine disease models have added credibility to these concepts of niche-facilitated/driven oncogenesis. Nevertheless, the mechanisms driving niche contributions to the disruption of hematopoiesis, as well as their relevance to human disease states remain largely unexplored. It is conceivable that such mechanisms are relevant in specific disease context, in particular MDS/MPN, congenital bone marrow failure and secondary leukemias.

In this presentation, recent progress in providing experimental support for these concepts, their relevance for treating hematopoietic neoplasms in humans, as well as remaining uncertainties and challenges will be discussed.

---

### Suggested reading

- Scadden DT. Rethinking stroma: lessons from the blood. *Cell Stem Cell*. 2012 Jun 14;10(6):648-9.
- Bissell MJ, Hines WC. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat Med*. 2011;17(3):320-9.
- Hu B, Castillo E, Harewood L, Ostano P, Reymond A, Dummer R, Raffoul W, Hoetzenecker W, Hofbauer GF, Dotto GP. Multifocal epithelial tumors and field cancerization from loss of mesenchymal CSL signalling. *Cell*. 2012 Jun 8;149(6):1207-20.
- Lutzny G, Kocher T, Schmidt-Supprian M, Rudelius M, Klein-Hitpass L, Finch AJ, Dürig J, Wagner M, Haferlach C, Kohlmann A, Schnittger S, Seifert M, Wanninger S, Zaborsky N, Oostendorp R, Ruland J, Leitges M, Kuhnt T, Schäfer Y, Lampl B, Peschel C, Egle A, Ringshausen I. Protein kinase c- $\beta$ -dependent activation of NF- $\kappa$ B in stromal cells is indispensable for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells in vivo. *Cancer Cell*. 2013 Jan 14;23(1):77-92. doi: 10.1016/j.ccr.2012.12.003.
- Raaijmakers MHGP. Niche contribution to oncogenesis: evolving concepts and implications for the hematopoietic system. *Haematologica* 2011 96:1041-82011.
- Sala Torra O, Loeb KR. Donor cell-derived leukemia and myelodysplastic neoplasm: unique forms of leukemia. *Am J Clin Pathol*. 2011;135(4):501-4.

## El sistema linfoide como fuente terapéutica

JOAN GARCÍA LÓPEZ

Director de XCELIA. División de Terapias Avanzadas. Banc de Sang i Teixits. Barcelona

### Introducción

Los leucocitos de linaje mieloide y linfoide, generados y diferenciados a partir de las células madre hematopoyéticas (HSC) de la médula ósea, son las células efectoras clave tanto del sistema inmune innato como del adaptativo.

En los órganos linfoides tienen lugar la mayor parte de los procesos adaptativos y reactivos en respuesta a los estímulos inmunológicos de cualquier signo sometidos a una exquisita regulación, en la que participan multitud de actores, a fin de mantener la homeostasis del individuo.

Durante las últimas décadas se ha asistido a un progreso espectacular en el conocimiento de la regulación de la respuesta inmune. Gracias, en gran parte, a la investigación bioclínica y molecular llevada a cabo en el trasplante hemopoyético y al mayor conocimiento y desarrollo de procesos de estimulación y producción celular *ex vivo* se está generando un arsenal terapéutico de posibilidades todavía poco conocidas.

De manera muy simplificada, este arsenal está formado por componentes celulares que contribuyen a una doble respuesta: la generada ante las células malignas y antígenos externos (infecciones) y, en sentido opuesto, el reconocimiento de lo propio/no propio y la inducción de tolerancia.

El presente resumen se centrará en las estrategias dirigidas a la promoción de la respuesta inmune ante antígenos tumorales e infecciosos.

### Inmunoterapia antineoplásica y antiinfecciosa

El trasplante alogénico de progenitores hemopoyéticos, paradigma de las reacciones inmunitarias, ha sido durante décadas un detonante de la investigación inmunoterapéutica; por ello, es un hilo conductor inestimable en la exposición del potencial terapéutico de las células linfoides.

Uno de los desafíos constantes en este tipo de trasplante ha sido la búsqueda del equilibrio entre la excesiva alorreactividad de las poblaciones linfoides del donante frente a las células diana del receptor, en forma de enfermedad del injerto contra el huésped (EICH), y el mantenimiento de la capacidad de implante y erradicación de las poblaciones neoplásicas residuales (*graft versus leukemia* [GVL]) en el receptor y de respuesta ante las infecciones. En este sentido, las estrategias que actualmente se están desarrollando son múltiples:

#### Infusión de linfocitos del donante

La infusión de linfocitos no seleccionados del donante (DLI) está siendo ampliamente aplicada para prevenir o tratar la enfermedad neoplásica residual o recurrente.

La aplicación precoz (antes de 3 meses postrasplante) de estas células a dosis tan reducidas como  $0,1 \times 10^6$  células T/kg frecuentemente induce EICH de grado III/IV, mientras que la aplicación diferida (después del 6.º mes postrasplante) a dosis de 10 a 50 veces superiores es una estrategia eficaz que se asocia con un riesgo razonable de EICH.

Esta menor incidencia de EICH es explicable por la ausencia de señales de daño tisular y del ambiente proinflamatorio generado por el tratamiento de acondicionamiento además de la sustitución de las células presentadoras de antígeno (APC) del receptor por las propias del donante. Las únicas células generadoras de respuesta inmune por parte de las células del donante son las células neoplásicas circulantes, lo que provoca una respuesta relativamente específica.

La leucemia mieloide crónica es la enfermedad que más se ha beneficiado de esta estrategia terapéutica, mientras que en enfermedades con menor capacidad de reconocimiento por las APC (mieloma múltiple o linfomas) o mayor agresividad (leucemia aguda mieloblástica) las respuestas son menos frecuentes (10-40%).

Para mejorar el balance terapéutico de esta aproximación se están diseñando estrategias encaminadas a seleccionar poblaciones celulares con efecto GVL específico o incluso poblaciones capaces de luchar contra infecciones.

### **Immunoterapia antineoplásica**

En el contexto de las hemopatías malignas, la aplicación de la DLI, como se ha mencionado, presenta limitaciones relevantes en el caso de las neoplasias linfoides, motivadas, probablemente, por su menor expresión antigénica. Para soslayar esta limitación se han propuesto diferentes estrategias. Entre ellas se incluyen: a) la estimulación con interferón alfa o anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, con el objetivo de obtener una activación/expansión policlonal; b) la vacunación *in vitro* por medio de la estimulación con antígenos tumorales o proteínas idiotípicas, frecuentemente mediados por la activación de células dendríticas; c) la generación de células T específicas ante el tumor mediante la exposición a antígenos tumorales del paciente y selección de clones específicos; o d) la redirección de la reactividad de las células T mediante transferencia genética de antígenos quiméricos.

Una alternativa, elegante pero difícil de asumir en la práctica general, es la administración de linfocitos T policlonales transducidos con genes suicidas, capaces de generar un potente efecto GVL manteniendo la capacidad de control de la EICH.

La mayor parte de estas aproximaciones están en fases incipientes de evaluación clínica, por lo que, a pesar de ofrecer algunos datos positivos, merecen ser interpretadas con prudencia.

### **Immunoterapia antiinfecciosa**

La inmunidad específica basada en los linfocitos T (TC) es crucial en la protección ante las infecciones víricas. Los TC son capaces de reconocer péptidos derivados de las proteínas virales que son presentados por las moléculas HLA de las células infectadas. En la primoinfección, la respuesta inmune es generada por los antígenos presentados por las APC, que activan y generan la expansión de las células T específicas que, eventualmente, controlarán la infección. Después de esta fase las TC de memoria serán las encargadas de responder ante nuevos estímulos infecciosos similares.

Esta respuesta está mediada tanto por linfocitos CD4 como CD8. Estos últimos poseen la capacidad de lisar las células infectadas, mediada frecuentemente por la producción de citocinas proinflamatorias. La función de los linfocitos CD4 es eminentemente *helper* promoviendo la síntesis de anticuerpos y la expansión y migración de los linfocitos CD8.

Las infecciones virales son la mayor causa de morbilidad después de un trasplante alogénico de PH, incluyendo aquellas generadas por citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr (EBV), varicela (VZV) y adenovirus (ADV). En los dos primeros, el estado inmunitario previo al trasplante marca diferencias de pronóstico, siendo el más favorable cuando donante y receptor son seronegativos y el más desfavorable cuando el receptor es seropositivo y recibe un producto seronegativo deplecionado de linfocitos T. En general, las reactivaciones víricas son tratadas con fármacos antivirales pero solamente hasta que se adquiere cierta inmunidad antiviral los pacientes permanecen en la fase de riesgo de reactivación.

Para mejorar la recuperación de la inmunidad antiviral específica, especialmente en pacientes seronegativos, se están desarrollando diferentes estrategias basadas en la transferencia de células específicas del donante que, a diferencia de la infusión policlonal de las DLI, no generan un aumento de riesgo de la EICH.

Algunos grupos ya han obtenido resultados positivos en esta aproximación y, concretamente, nuestro grupo ya ha desarrollado la tecnología GMP de proceso celular y ha obtenido la aprobación para la fabricación y la realización de un ensayo clínico de fase I/II para el tratamiento de las infecciones por CMV.

En general, la metodología consiste en la activación de linfocitos de sangre periférica con antígenos virales (pp50, pp65) y más recientemente péptidos sintéticos seguida de: a) la expansión clonal *ex vivo*, que no ha demostrado añadir más eficacia al proceso; o b) la selección de los clones específicos, ya sea mediante péptidos de HLA multiméricos unidos a fluorocromos o partículas magnéticas o, también, mediante la selección magnética de las células activadas/secretores de interferón.

La experiencia acumulada en diversos estudios, administrando estos productos de manera profiláctica o terapéutica, frecuentemente demuestra la expansión clonal de células T CMV específicas que tiende a coincidir con la reducción de la carga viral y la mejoría clínica. Hasta ahora no se han detectado efectos indeseables.

Estrategias similares se han aplicado en las infecciones por EBV, ADV y *Aspergillus*:

En el primer caso, para prevenir los síndromes linfoproliferativos asociados al EBV, donde ya se han reportado un número interesante de respuestas clínicas.

En las infecciones por ADV, esencialmente pediátricas, se han podido observar respuestas valoradas por la expansión clonal de las células T específicas y reducción de la carga viral.

Las estrategias futuras en esta dirección apuntan al desarrollo de productos celulares que estén dirigidos a dianas múltiples: CMV, EBV, ADV o, incluso, *Aspergillus* y VZV, que podrán ser derivados de células del do-



nante o de donantes genéricos como productos listos para su uso inmediato, aunque cabe también mencionar el desarrollo de protocolos de inmunización y expansión *ex vivo* a partir de productos que no hayan estado expuestos a los antígenos víricos o fúngicos.

## Bibliografía

1. Little MT, Storb R. History of haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat.Rev.Cancer* 2002;2:231-238.
2. Blazar BR, Murphy WJ, Abedi M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat.Rev.Immunol.* 2012;12:443-458.
3. Kolb HJ. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood* 2008;112:4371-4383.
4. Porter DL, Levine BL, Bunin N et al. A phase 1 trial of donor lymphocyte infusions expanded and activated *ex vivo* via CD3/CD28 costimulation. *Blood* 2006;107:1325-1331.
5. Jedema I, Meij P, Steeneveld E et al. Early detection and rapid isolation of leukemia-reactive donor T cells for adoptive transfer using the IFN-gamma secretion assay. *Clin.Cancer Res.* 2007;13:636-643.
6. Falkenburg JHF, Wafelman AR, Joosten P et al. Complete remission of accelerated phase chronic myeloid leukemia by treatment with leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 1999;94:1201-1208.
7. Warren EH, Fujii N, Akatsuka Y et al. Therapy of relapsed leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplant with T cells specific for minor histocompatibility antigens. *Blood* 2010.
8. Heemskerk MH, Hoogbeem M, Hagedoorn R et al. Reprogramming of virus-specific T cells into leukemia-reactive T cells using T cell receptor gene transfer. *J.Exp.Med.* 2004;199:885-894.
9. Sadelain M, Brentjens R, Riviere I. The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors. *Curr.Opin.Immunol.* 2009;21:215-223.
10. Ciceri F, Bonini C, Stanghellini MT et al. Infusion of suicide-gene-engineered donor lymphocytes after family haploidentical haemopoietic stem-cell transplantation for leukaemia (the TK007 trial): a non-randomised phase I-II study. *Lancet Oncol.* 2009;10:489-500.
11. Grupp SA, Kalos M, Barrett D et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N.Engl.J.Med.* 2013;368:1509-1518.
12. Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ et al. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N.Engl.J.Med.* 1995;333:1038-1044.
13. Meij P, Jedema I, Zandvliet ML et al. Effective treatment of refractory CMV reactivation after allogeneic stem cell transplantation with *in vitro*-generated CMV pp65-specific CD8+ T-cell lines. *J.Immunother.* 2012;35:621-628.
14. Einsele H, Roosnek E, Rufer N et al. Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood* 2002;99:3916-3922.
15. Bollard CM, Aguilar L, Straathof KC et al. Cytotoxic T lymphocyte therapy for Epstein-Barr virus+ Hodgkin's disease. *J.Exp.Med.* 2004;200:1623-1633.
16. Hanley PJ, Cruz CR, Savoldo B et al. Functionally active virus-specific T cells that target CMV, adenovirus, and EBV can be expanded from naive T-cell populations in cord blood and will target a range of viral epitopes. *Blood* 2009;114:1958-1967.

## Hospitales comarcales: asistencia integrada del enfermo hematológico

COORDINADORES: GUILLERMO MARTÍN NÚÑEZ. *Servicio de Hematología. Hospital Virgen del Puerto. Plasencia (Cáceres)*  
MANUEL GONZÁLEZ SILVA. *Servicio de Hematología. Hospital de la Línea. La Línea de la Concepción (Cádiz)*

Una característica del trabajo en los hospitales pequeños y periféricos, también llamados comarcales, es el acercamiento al medio social de nuestros pacientes, lo que nos permite conocer algunas realidades que tal vez estén más difusas en los grandes centros. Los problemas sociales de personas muy mayores con dificultades para comprender la medicación, los traslados y su soledad hacen que nos planteemos la necesidad de una atención más cercana a los mismos. Se hacen necesarias nuevas formas de asistencia en estos casos. La hospitalización domiciliaria, también en el medio rural, puede ser una forma de atender a nuestros pacientes que debiera ser explorada. Para ello, el Dr. Pedro Sanroma, del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla de Santander, nos aportará su experiencia en la atención domiciliaria a pacientes hematológicos, con la seguridad de que nos generará ideas para ponerlas en práctica en nuestro medio.

En los centros pequeños, donde la especialidad se ejerce de una forma integral en todas sus ramas, tenemos la necesidad de estar al día en temas sencillos de la práctica diaria. La hematimetría es un pilar básico de nuestro trabajo diario que todavía no hemos perdido en estos centros. Los nuevos contadores aportan una serie de parámetros, que ya casi pueden considerarse clásicos, que nos fueron ofertados como grandes avances en el diagnóstico y que probablemente no sean tanto como se esperaba. La amplia experiencia del Dr. Jesús Villarrubia del Hospital Ramón y Cajal de Madrid nos aclarará cuáles de ellos son realmente útiles y debemos considerarlos en la práctica diaria y cuáles todavía no aportan nada reseñable o deben ser ignorados.

Finalmente, en estos hospitales pequeños no queremos renunciar a colaborar en un pilar que contribuye a mejorar la labor asistencial, como es la investigación clínica, una actividad nunca fácil en cualquier nivel y probablemente más menos en nuestro medio, donde la labor asistencial consume la mayor parte del tiempo. Hoy día no hay justificación para no hacerla; depende del interés personal. El mejor acceso a la información y la facilidad de contacto con grandes centros con los que colaborar hacen que esta actividad deba ser irrenunciable para nosotros. Evitará también nuestro aislamiento e incrementará la calidad asistencial. La Dra. Emilia Pardal del Hospital Virgen del Puerto de Plasencia, con amplia experiencia en superar estas dificultades, hará una revisión de la situación de nuestros hospitales en España y cuál debe ser nuestra actitud para superar los obstáculos y no perder interés en esta faceta de nuestro trabajo.

En conjunto, esperamos que los temas a tratar nos aporten ideas y nos aclaren otras que nos mantengan al día, activos e ilusionados en nuestra actividad diaria mejorando la asistencia que prestamos en los hospitales de nuestro nivel.

## La hospitalización domiciliaria en la atención a los enfermos hematológicos

PEDRO SANROMA MENDIZÁBAL

Coordinador de la Unidad de Hospitalización a Domicilio.  
Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander

### Introducción

La Unidad de de Hospitalización a Domicilio (HaD) del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV) cuenta con un equipo formado por 7 médicos, 18 enfermeras, 8 auxiliares de enfermería y 2 administrativos. Con una capacidad actual de 60 pacientes/día, presta asistencia 24 horas al día, durante los 365 días del año. Desde su creación en octubre de 1984 hemos tenido una estrecha relación con el Servicio de Hematología, adquiriendo una amplia experiencia en el manejo de pacientes con pancitopenia tras trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (auto-TPH) y en hemoterapia domiciliaria. Presentamos los resultados clínicos y la demanda asistencial de 49 pacientes seguidos en el domicilio durante la fase de pancitopenia tras ser sometidos a auto-TPH y nuestra experiencia en 1.518 procesos transfusionales.

### Seguimiento de la pancitopenia tras auto-TPH

#### Criterios de inclusión

Los pacientes debían cumplir los criterios habituales para seguimiento domiciliario, tener un ECOG < 3, no tener comorbilidad grave ni ser refractarios a las transfusiones plaquetarias.

#### Criterios de reingreso

Shock séptico, distrés respiratorio, neumonía grave y sangrado mayor.

#### Procedimientos protocolizados

Aislamiento protector, mucositis, cuidado del catéter, hemoterapia y administración de NPT.

Se han atendido 49 pacientes, 32 hombres y 17 mujeres, con una mediana de edad de 54 años (extremos: 18-74). La enfermedad hematológica era linfoma (29 pacientes), mieloma (10 pacientes), LMA (7

pacientes), LLA (2 pacientes) y amiloidosis primaria (1 paciente) y 20 pacientes estaban en remisión completa. La mediana de ECOG era 1 (extremos: 1-3). Cuarenta y seis pacientes recibieron acondicionamiento basado en quimioterapia y 3 en irradiación corporal total. La profilaxis infecciosa se realizó en general con quinolonas, aciclovir y fluconazol. Once pacientes recibieron nutrición parenteral total durante una mediana de 5 días (extremos 2-10).

#### Complicaciones infecciosas

Cuarenta y un pacientes (84%) presentaron fiebre. La antibioterapia empírica se realizó con cefalosporinas (25 casos) o carbapenems (14 casos), asociándose teicoplanina en 34, debiendo hacerse cambios posteriores en 11 casos. Se extrajeron un total de 88 tandas de hemocultivos, con una mediana de 2 por paciente (extremos: 0-7). El episodio febril se documentó clínicamente y microbiológicamente en 20 pacientes (bacteriemia: 14; orina: 3; heces: 2; esputo: 1) y sólo clínicamente en 19 (siendo la mucositis el foco en 14 pacientes). Catorce pacientes tuvieron hemocultivos positivos, siendo el *Staphylococcus epidermidis* el germen más frecuentemente aislado (50%), mientras que fueron los gérmenes Gram-negativos en las otras localizaciones. Gérmenes nosocomiales se aislaron solamente en 3 pacientes, multitratados y con frecuentes ingresos previos.

#### Recuperación hematopoyética y necesidades transfusionales

La mediana de estancia en nuestra unidad fue de 17 días (extremos: 7-34), con una mediana de 6 días (2-16) con < 100 PMN/mm<sup>3</sup>, y 8 días con < 500 PMN (4-32). Treinta y siete pacientes precisaron transfusión de concentrados de hemáties, transfundiéndose un total de 102 concentrados con una mediana de 2 por paciente (extremos: 0-8) y 45 pacientes precisaron transfusión de plaquetas, transfundiéndose un

total de 105 *pools* con una mediana de 2 por paciente (extremos: 0-11).

### **Carga asistencial y colaboración familiar**

Se realizaron un total de 1.780 visitas de enfermería con una mediana de 33 por paciente (extremos: 24-81), 40 de ellas nocturnas, con una mediana de 1 visita nocturna por paciente (extremos: 0-3). Los médicos realizaron un total de 834 visitas, con una mediana de 17 visitas por paciente (extremos: 10-34), 22 de ellas nocturnas. Se recibieron un total de 110 llamadas urgentes, siendo el 71% por fiebre. El 96% de los pacientes completaron la fase de aplasia en el domicilio. Seis pacientes precisaron traslado al hospital para realización de exploraciones de imagen o cambio de acceso venoso. Dos pacientes precisaron reingreso de corta duración, regresando al domicilio a las 48 y 72 horas. Sólo un paciente no regresó al domicilio por presentar una neumonía por *Aspergillus*. La colaboración familiar fue buena o muy buena en 45 casos. En 4 familias se detectaron dificultades para el cumplimiento de las normas pero en ningún caso quisieron reingresar en el hospital.

### **Transfusión domiciliaria**

#### **Transfusiones de hematíes (número: 1.136)**

La mediana de edad fue de 65 años (extremos: 6-98), y el 52% eran hombres. El 63% padecía un proceso oncológico y el 47% hematológico (LMA, SMD y linfoma los más frecuentes). El 52% se realizaron en pacientes politransfundidos, y el 86% de los pacientes tenían factores de riesgo transfusional (cardiopatía: 13%; reacción transfusional previa: 23%). En 969 ocasiones los concentrados fueron radiados y en 1.057 desleucocitados. En 765 transfusiones se utilizó un acceso venoso periférico y en 358 central. En el 49% de las transfusiones se usó premedicación (corticoides: 13%; antihistamínicos: 8%; diuréticos: 25%). Se observó reacción transfusional en 46 transfusiones (4,9%), en general de carácter leve y que respondieron a las medidas habituales, siendo la fiebre y los escalofríos las más frecuentes (36 casos). Solamente fue necesario interrumpir la transfusión en 10 ocasiones. Se realizaron 14 tandas de hemocultivos y 5 estudios de reacción transfusional.

#### **Transfusiones de plaquetas (número: 382)**

La mediana de edad fue de 49 años (extremos: 6-80), siendo el 65% hombres y el 94% padecía un proce-

so hematológico. La administración de plaquetas se realizó de forma profiláctica en el 83% de los casos. El 32,7% eran pacientes politransfundidos. Un 30% de las plaquetas transfundidas procedían de aféresis, mientras que el 70% procedía de donantes no seleccionados. Las plaquetas fueron radiadas en 267 transfusiones y en 316 se utilizaron filtros desleucotizados. Se premedicaron el 86% de las transfusiones. Se objetivó reacción transfusional en 13 ocasiones, también de carácter leve en general y con respuesta a las medidas habituales, siendo la fiebre y la reacción cutánea las más frecuentes (10 casos). Solamente fue necesario interrumpir la transfusión en 2 casos. Se realizaron tres tandas de hemocultivos. Ningún paciente precisó traslado al hospital.

Creemos que con una dotación y estructura organizativa como la de nuestra Unidad de HaD el seguimiento de la fase de aplasia tras el auto-TPH y la hemoterapia domiciliaria son factibles de ser realizadas con seguridad y eficacia. Las unidades que opten por este tipo de asistencia deben tener la capacidad de ofrecer una intensa vigilancia del paciente durante las 24 horas del día los 7 días de la semana, ser unidades polivalentes y desarrollar un equipo coordinado entre la HaD y el Servicio de Hematología, manejando procedimientos protocolizados.

### **Bibliografía**

1. Sanroma P, Yáñez L, Aguilera A, et al. Hospitalización Domiciliaria: Recomendaciones clínicas y procedimientos. Sanroma P, Sampredo I, González CR, Baños MT. (Eds). 1ª edición. Santander, 2010: Ed Fundación Marqués de Valdecilla. Pag: 765-784.
2. Tomblyn M, Chiller T, Einselle H, et al. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;15:1143-238.
3. Freifeld AG, Bow EJ, Sepkowitz KA, et al. Clinical guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2011;52 :e56.
4. Tamayo B, Sanroma P, García-Berasaluze A, et al. Hospitalización Domiciliaria: Recomendaciones clínicas y procedimientos. Sanroma P, Sampredo I, González CR, Baños MT. (Eds). 1ª edición. Santander, 2010: Fundación Marqués de Valdecilla. Pag: 1297-1315.
5. Ademokun A, Kaznica S, Deas S. Home blood transfusion: a necessary service development. *Transfus Med.* 2005;15:219-22.
6. Niscola P, de Fabritiis P, Cartoni C, et al. Home care management of patients affected by hematologic malignancies: a review. *Haematologica* 2006;91:1523-9.
7. Gay V, Prévôt G, Amico I, Bonnet B, Mansard MO. Home blood transfusion. *Transfus Clin Biol.* 2010;17:349-52.
8. Remonnay R, Devaux Y, Morelle M, Kante V, Havet N, Carrière MO. Blood transfusions at home or in the hospital? The preferences of cancer patients. *Bull Cancer.* 2008;95:1039-45.
9. Fridey JL, Silvergleid AJ. General principles of home blood transfusion UPTODATE.

## Docencia e investigación en un hospital comarcal. Comunicación y colaboración con los hospitales de referencia

EMILIA PARDAL DE LA MANO

*Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Virgen del Puerto. Plasencia (Cáceres)*

### Introducción

En la actualidad, la investigación y la docencia están estrechamente ligadas tanto a la actividad médica asistencial realizada en los hospitales como a la actividad sanitaria en su conjunto (Figura 1).

Los cambios que la medicina clínica ha experimentado desde la mitad del siglo pasado (irrupción del empirismo, revolución autonomista de los pacientes, integración de la ética en las prácticas médicas, acceso global a las nuevas tecnologías, envejecimiento de la población, presiones sociales y de los profesionales de la salud en demanda de mejores servicios y crecientes expectativas...), así como la incertidumbre ligada a su práctica, han impulsado a los profesionales médicos hacia una mayor implicación en la investigación, entendida como el único camino que permite mejorar la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades. Además, la constante justificación requerida de los actos médicos hoy sólo puede formularse científicamente.

El paso de la clínica experiencialista a la experimentalista no ha sido fácil. Sin el método científico y la epidemiología hoy no podríamos hablar de Medicina Basada en la Evidencia pero, sin el concurso de los conocimientos aportados por la biotecnología, la estadística, y las nuevas aplicaciones de registro, información y comunicación, la investigación biomédica no podría contestar las preguntas formuladas, inimaginables, por otra parte, hace unos años.

En este cambio de actitud y aptitud los hospitales han sido determinantes, ya que de alguna manera han conseguido aunar los múltiples recursos humanos y técnicos con estructuras y organización adaptadas a las nuevas circunstancias. Es necesario no olvidar que históricamente ha habido clínicos que han hecho investigación.

Sir William Osler, autor de *The Principles and Practice of Medicine*, afirmó que “estudiar los fenómenos de la enfermedad sin libros es cruzar el mar sin cartas de navegación, mientras que estudiar libros sin pacientes, no es ni tan siquiera embarcar”. Manifestando

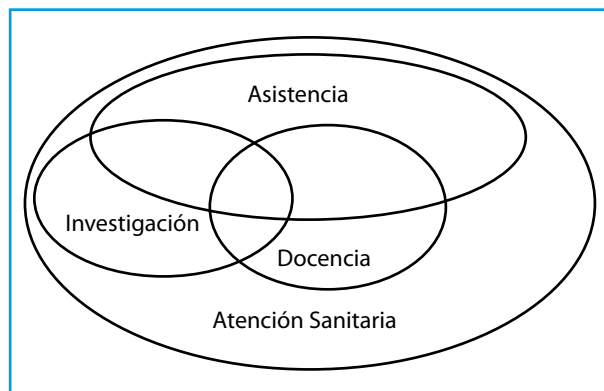


Figura 1. Interrelaciones entre los grandes pilares de la Atención Sanitaria.

que la asistencia, investigación y docencia son parte de un mismo proceso. Los fundamentos académicos resultan necesarios como criterio previo a todo conocimiento científico, pero en el caso de los estudios de medicina resultará insuficiente si no van acompañados de una didáctica orientada a la praxis. Por su parte, Derek Bok, Rector de la Universidad de Harvard, dijo: "Si usted cree que la educación es cara, intente la ignorancia"<sup>(1)</sup>. Ser ignorantes en servicios de salud resulta muy caro a la sociedad, tanto en términos económicos como de bienestar general. Las organizaciones sanitarias están dirigidas a procurar la salud del individuo y, por ende, de la sociedad y sólo desde el conocimiento podemos valorar las decisiones clínicas o estratégicas, la efectividad de los procedimientos, y comprender la naturaleza y organización del sistema sanitario.

En todos los casos los procesos implicados en la investigación y docencia sanitarias se han mostrado eficientes y suponen para las instituciones responsables una excelente "tarjeta de visita"; sin embargo, por razones económicas, sociales o políticas, estos procesos son percibidos como tangenciales a la asistencia médica y en algunos casos no son bien ponderados, provocando una difícil conciliación con la práctica clínica habitual.

## Investigación y docencia en Hematología y Hemoterapia

En España la estrategia científica sanitaria, aunque previamente esbozada, se inició de forma decisiva hace más de 20 años en el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). La creación de los Centros Nacionales de Investigación Oncológica, Cardiovascular y de Enfermedades Neurológicas (CNIO, CNIC y CIEN), de programas científicos como RETIC (Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud), CIBER (Centros de Investigación Biomédica en Red) y actualmente los IIS (Institutos de Investigación Sanitaria)<sup>(2,3)</sup> son un claro exponente del compromiso con la investigación biomédica y la docencia acompañante.

Además, con las responsabilidades sanitarias transferidas a las comunidades autónomas (CC. AA.), todas las Consejerías de Sanidad han desarrollado planes con mejor o peor fortuna orientados al mismo fin. Asimismo, las sociedades científicas son un pilar fundamental en el desarrollo de la investigación, sobre todo integrando grupos cooperativos. Un buen ejemplo es la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia, con múltiples grupos activos y ensayos clínicos en marcha.

Según reporta Valdivieso<sup>(4)</sup>, en un análisis de producción de artículos en revistas de investigación entre los años 1996 y 2004, de los 40.061 artículos el 47% procedían exclusivamente del sector sanitario, un 37% tanto del sector sanitario como del universitario, por lo que parece claro que son las instituciones sanitarias las grandes investigadoras en España. En la misma línea, y atendiendo a casos concretos, los Dres. Rozman y Rodés<sup>(5,6)</sup> publicaron la experiencia del Hospital Clínic de Barcelona. Esta institución reformuló toda su estructura, y dentro de sus principales objetivos de gestión se encontraba la investigación. Crearon un centro (IDI-BAPS) que incrementó la producción científica en cantidad y calidad (más de 500 artículos originales en el año 2005 y con factor de impacto 2.242).

Lo que parece claro es que el paradigma científico-docente, aunque cada día más presente, y según las referencias anteriores mejorando, aún no está implantado por completo en los hospitales españoles<sup>(7,8)</sup>; sin embargo, la mayoría de los profesionales sanitarios consideran que la investigación biomédica mejora su capacidad asistencial y es imprescindible para la toma de decisiones presentes y futuras.

La docencia formal de la Medicina está reglada, y los hospitales junto a las universidades son los lugares adecuados para ello; sin embargo, la complejidad y singularidad del proceso educativo, la gran cantidad de profesionales implicados y las enormes repercusiones que el mismo tiene son las que van a determinar el marco docente de un hospital. El carácter universitario de un hospital no es un problema de de-

nomiación, sino de estilo. Actualmente existen en casi todas las CC. AA. convenios-marco entre las Consejerías de Salud y de Educación para la utilización de las instituciones sanitarias en la investigación y la docencia, todos ellos basados en el RD por el que se establecen las bases generales de concertos entre instituciones sanitarias y universidad<sup>(9)</sup> con sus modificaciones, de tal forma que los hospitales con inquietudes docentes pueden acceder a ser “hospitales asociados” a la universidad.

## ¿Y qué hay de todo esto en los hospitales comarcales?

Si es difícil valorar en sí mismo el concepto de hospital comarcal (HC)<sup>(10)</sup>, lo es más aún definir cuál es su capacidad investigadora y docente. Un HC no posee la misma infraestructura que los grandes hospitales ni en recursos humanos ni tecnológicos; por otra parte, la población atendida (entre 50.000 y 200.000 habitantes) en muchos casos contrasta con los requerimientos mínimos para los grandes ensayos clínicos. Esto, unido a las peculiaridades locales, hace que la investigación y docencia presenten inconvenientes para su implantación y desarrollo.

Apoyándonos en el Catálogo Nacional de Hospitales 2012 (Tabla 1), la definición de “Comarcal” la realizamos por exclusión de categorías: no mayor de 300 camas, no provinciales, no monográficos, no complejos asistenciales, titularidad no privada (benéfica o no). Podrán ser rurales o urbanos, tener docencia acreditada, ser universitarios y por supuesto, con Servicio de Hematología (Tabla 2). A pesar de que la variabilidad de los Servicios de Hematología en estos hospitales es alta en cuanto a número de hematólogos, dependencia funcional, etc., consideramos que el siguiente análisis se ajusta, salvo excepciones, a la realidad.

Para intentar conocer la situación investigadora en los HC, y a sabiendas de que el concepto “Investigación” engloba mucho más, hemos analizado las publicaciones indexadas, conscientes de que “son todas las que están pero no están todas las que son”. Hemos aplicado los mismos criterios de búsqueda en todas las bases consultadas (PUBMED, Scholar Google y Bases de Datos en Español como Dialnet, Índice Médico Español y Medes) entre los años 2002 y 2012. Hemos observado que como “primeros autores” de artículos los hematólogos de los HC hemos publicado poco (Figura 2), la situación mejora cuando investigamos asociados a otros autores, formando parte de grupos multicéntricos (Figura 3), pero en general nuestra producción investigadora es escasa. A las dificultades comentadas previamente como la excesiva labor asistencial, falta de infraestructuras, etc., añadimos que en nuestra especialidad la investigación básica (biología molecular, genética, etc.) es fundamental y en un HC no disponemos

Tabla 1. CNH102, distribución de hospitales por número de camas y por CC. AA.

HOSPITALES Y CAMAS POR COMUNIDAD AUTÓNOMA SEGÚN SU TAMAÑO										
Comunidad Autónoma	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ANDALUCÍA	50	2056	23	3048	18	4887	14	12240	105	22231
ARAGÓN	11	477	10	1406	6	1485	2	2097	29	5445
PRINCIPADO DE ASTURIAS	8	396	5	656	8	1805	1	1289	20	4146
ILLES BALEARS	8	424	3	1360	4	1063	1	822	22	3589
CANARIAS	16	1052	13	2068	4	998	4	3479	37	7597
CANTABRIA	1	30	5	469	2	692	1	851	8	2042
CASTILLA-LA MANCHA	14	576	10	1385	5	1749	3	2073	32	5783
CASTILLA Y LEÓN	14	864	10	1253	7	2649	6	4920	37	9683
CATALUÑA	84	4494	68	9409	38	12105	11	8571	211	34579
COMUNIDAD VALENCIANA	21	1100	15	2067	20	8005	7	5078	63	14248
EXTREMADURA	7	275	3	335	6	1981	2	1522	16	4113
GALICIA	21	1198	8	582	3	836	7	7200	39	13218
MADRID	25	1923	27	4059	17	5400	12	10755	81	22137
REGIÓN DE MURCIA	9	514	12	1620	3	1025	2	1488	26	4847
C. FORAL DE NAVARRA	4	147	5	822	1	350	1	1095	11	2414
PAÍS VASCO	20	1116	14	1764	7	2485	3	2869	44	8236
LA RIOJA	3	211	1	140	0	0	1	577	5	928
CEUTA	0	0	0	0	1	252	0	0	1	252
MELILLA	0	0	1	170	0	0	0	0	1	170
Total Nacional	326	16855	238	33013	148	45746	78	66924	790	162538

Los Complejos Hospitalarios se contabilizan como un solo hospital

Tabla 2. Hospitales comarcales, según la selección del texto, por CC. AA. y % de camas respecto al número total

Comunidad autónoma	N.º camas comarcal	N.º camas total	% comarcal/total
ANDALUCÍA	2.615	22.231	12
ARAGÓN	408	5.445	7
PRINCIPADO DE ASTURIAS	720	4.146	17
ISLAS BALEARES	397	3.669	10
CANARIAS	700	7.597	9
CANTABRIA	411	2.042	20
CASTILLA-LA MANCHA	1.556	5.783	27
CASTILLA Y LEÓN	356	9.683	4
CATALUÑA	3.928	34.579	11
COMUNIDAD VALENCIANA	3.691	14.248	26
EXTREMADURA	436	4.113	11
GALICIA	714	10.218	7
MADRID	1.338	22.137	6
REGIÓN DE MURCIA	648	4.647	14
COMUNIDAD F. DE NAVARRA	278	2.414	11
PAÍS VASCO	549	8.236	7
LA RIOJA	87	928	9
<b>TOTAL</b>	<b>18.832</b>	<b>162.116</b>	<b>Media 12%</b>

de estos recursos tecnológicos, aunque hoy en día esto puede ser subsanado con la facilidad para el envío de muestras. La producción de artículos de Hematología y Hemoterapia en general en España<sup>(11)</sup> representa el 5% del total de los producidos por los hospitales. Si la comparamos con la producción de los HC estamos por debajo de ese índice (Figuras 2 y 3). La mayoría de los HC

tienen acreditación docente MIR (Medicina Familiar y Comunitaria y Medicina Interna fundamentalmente) pero esto no se correlaciona adecuadamente con la producción científica publicada, así como tampoco se relaciona el número de camas ni la CC. AA.

Podemos inferir el grado de desarrollo de la investigación en los HC, pero conocer la situación de la do-

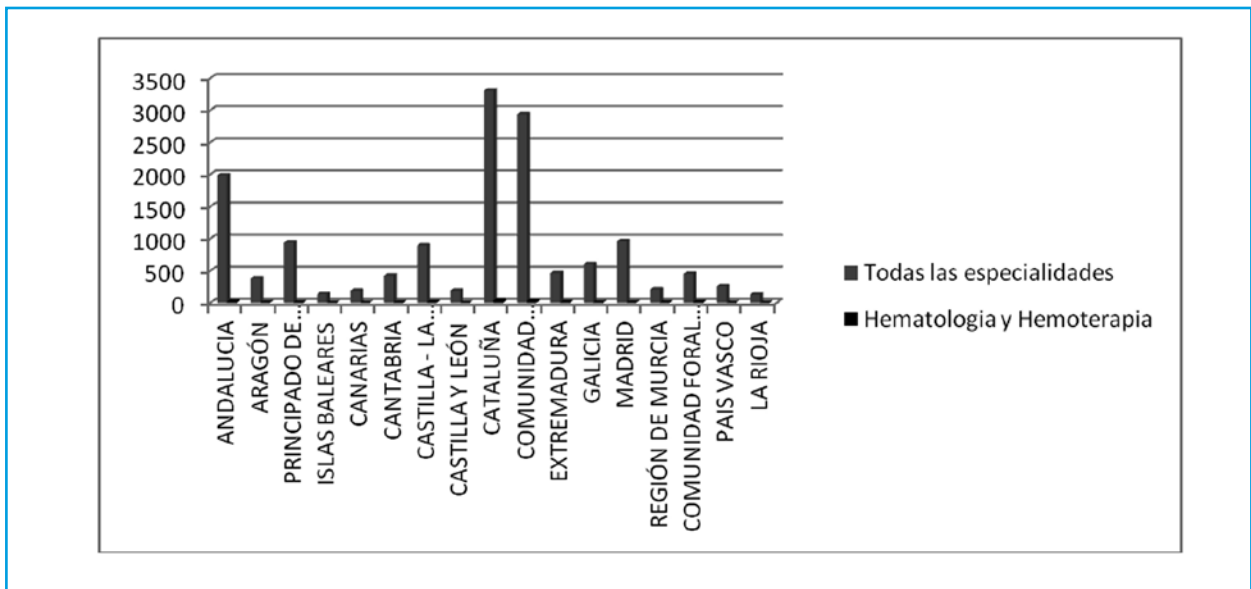


Figura 2. Publicaciones registradas en PubMed de los servicios de hematología y hemoterapia de los hospitales comarcales (primer autor) en relación con el resto de especialidades de los mismos hospitales.

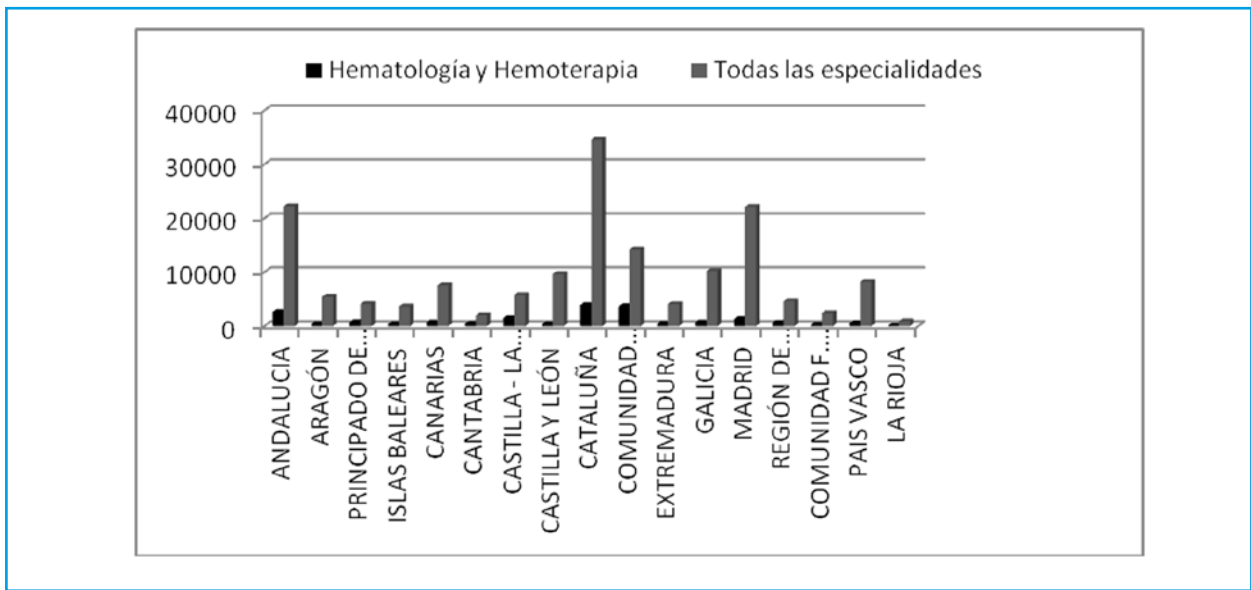


Figura 3. Publicaciones registradas en bases de datos españolas de los servicios de hematología y hemoterapia de los hospitales comarcales (no primer autor) en relación con el resto de especialidades de los mismos hospitales.

encia es tarea más difícil pues nos faltan registros de conciertos con las instituciones docentes y de la formación continuada realizada.

### Lo que nos queda por hacer

Es simple: casi todo. Para alcanzar “la excelencia” quizá debamos reinventarnos, y estos momentos de crisis y pérdida de inversión en I + D no parecen ser el mejor entorno para alcanzarla<sup>(12,13)</sup>.

Tenemos puntos fuertes que nuestros hermanos mayores, los hospitales de referencia, dejan de lado

y es la conexión cotidiana con Atención Primaria y la información contenida en las Bases de Datos de las poblaciones atendidas. Como ejemplo de esta utilización y economía de recursos, cabe citar a J. Expósito y J.A. Rodríguez<sup>(14,15)</sup>. La epidemiología y la salud pública siempre han sido una fuente de conocimiento médico y es en estos campos donde podremos desarrollar nuestras capacidades. Por otra parte, el acceso a la información y la comunicación y la posibilidad de incorporarse a grupos de trabajo nacionales ya establecidos permiten llevar a cabo la realización de estudios postautorización<sup>(16)</sup>, análisis farmacoeconómicos



o investigación en el área de la calidad asistencial. En todos estos casos no son necesarias grandes infraestructuras, y el límite en la mayoría de los casos lo ponen los propios profesionales.

La integración entre niveles asistenciales (asignatura pendiente del sistema sanitario) será beneficiosa para la producción investigadora y mejora docente<sup>(17)</sup>: el envío de muestras y la remisión de pacientes a los hospitales de referencia, la permeabilidad de los residentes de hematología entre los diferentes niveles, la formación continuada, hoy más fácil con las nuevas tecnologías, nos permitirán mejorar en todos los campos.

## Conclusiones

- La escasez de publicaciones puede reflejar el gran desequilibrio hacia la asistencia en detrimento de la investigación y la docencia por parte de los hematólogos en los HC.
- Los HC debemos asociarnos tanto con los hospitales de nivel superior (investigación clínica y básica) como con la atención primaria (estudios epidemiológicos y de salud pública) para crear redes de trabajo interactivas.
- Facilitar la convergencia entre la enseñanza médica y la investigación, con la actividad asistencial, por parte de las autoridades sanitarias es esencial como manifestación de una mejora continua de la calidad.
- La investigación científica y la docencia son los mejores instrumentos para aumentar la mejora en la asistencia, aunque probablemente sin calidad asistencial es imposible que se genere investigación científica, y para ello los hematólogos de los HC tenemos que manifestar nuestro entero compromiso, puesto que el interés personal sigue siendo el principal requisito para la realización de cualquier tipo de investigación: “no hay cuestiones agotadas sino hombres agotados en determinadas cuestiones”<sup>(18)</sup>.

## Bibliografía

1. Mansfield E. The nature of microeconomics. Microeconomics: theory and applications. Sixth edition. New York: Norton & Company, Inc. 1988:1-18.
2. Font D, Gomis R, Trilla A, Bigorra J, Piqué JM, Rodés J. Organización y modelo de funcionamiento de las estructuras de investigación biomédica. Situación y retos de futuro. *Med Clin (Barc)* 2008; 130 (13):510-6
3. Real Decreto 379/2004 de febrero sobre acreditación de Institutos de Investigación Sanitaria. BOE num 063, de 13 de marzo de 2004; 11409—12.
4. Valdivieso P, Aris CG, Chaparro MAS. ¿Qué aporta la Universidad a la investigación en los hospitales? *CardiCore* 2011; 46 (4): 127-130
5. Rozman C, Rodés J. Métodos para promover la investigación biomédica en los hospitales universitarios. *Med Clin (Barc)* 2001; 117:460-462.
6. Rodés J. La experiencia del Hospital Clínico de Barcelona: integración Facultad de Medicina -IDIBAPS- Hospital Universitario. *Educ méd.* 2007; 10 (4):202-8
7. Puerta JL, Martín-Moreno JM, Bravo S, Gutiérrez-Fuente JM. Valoración de la investigación que se realiza en los hospitales españoles. *Rev Clin Esp.* 2011; 211:169—78.
8. Soriguer F. El fracaso de la investigación clínica en España. *Med Clin (Barc)* 2009:132 (6); 219-21
9. RD 1558/1986, De 28 de Junio, por el que se establecen las bases generales del régimen de concertos entre las Universidades y las Instituciones Sanitarias (BOE de 31 de julio).
10. Borrego D, Martín Núñez G, Palomera L, Salinas Argente R, La hematología y la hemoterapia en los hospitales “comarcas”: pasado, presente y futuro. LIV Reunión Nacional de la SEHH. Simposios. Salamanca, 18-20 octubre 2012
11. Libro blanco de la Hematología y hemoterapia en España. Coordinación C. Burgaleta Alonso de Ozalla. Editores Médicos Sa (EDIMSA). ISBN -13: 978-84-7714-376-5.
12. Villar J. Futuro de la formación científica de los profesionales sanitarios en los hospitales del Sistema Nacional de Salud. *Med Clin (Barc)* 2003:120(18):70710
13. Cubero J. Optimización de la investigación clínica, Jornadas Fundación Ramón Areces, Fundación Pfizer. Madrid 16 de Abril de 2013
14. Expósito J, Johnson AP. Una experiencia interesante en el uso de la información y de las bases de datos. *Rev Calid Asist.* 2012; 27 (5):288-294
15. Rodríguez-García JA, Ramos F. High incidence of acute leukemia in the proximity of some industrial facilities in El Bierzo, Northwestern Spain. *International Journal of occupational Medicine and Environmental health* 2012; 25 (1): 22-30.
16. Calvo-Villas JM, Martín A, Conde E, Pascual A, Heras I, Varela R, de la Rubia J, Ramirez MJ, Díez-Martín JL, Panizo C, Rodríguez-Salazar MJ, Pascual MJ, Donato EM, González-Barca E, Caballero MD; Grupo Español de Linfomas/Trasplante Autólogo de Médula Osea (GEL/TAMO cooperative group) Effect of addition of rituximab to salvage chemotherapy on outcome of patients with diffuse large B-cell lymphoma relapsing after an autologous stem-cell transplantation. *Ann Oncol.* 2010 Sep;21(9):1891-7. doi: 10.1093/annonc/mdq035
17. Cases Langhoff C. Colaboración entre atención primaria de salud y hospitales terciarios: un modelo rentable de investigación integral. *Med Clin (Barc)* 2012;138 (11):480-82
18. Ramon y Cajal S. Reglas y consejos sobre investigación biológica 1918, pag 35

## Aportación de los analizadores automáticos al diagnóstico hematológico

JESÚS VILLARRUBIA<sup>1,2</sup>, DIEGO VELASCO<sup>2</sup>, JUAN MANUEL ALONSO<sup>2</sup>,  
JUAN DIEGO RODRÍGUEZ-GAMBARTE<sup>1</sup>, ANA VALLÉS<sup>1</sup>, JAVIER ALEXANDER FONSECA<sup>1</sup>,  
MARÍA TENORIO<sup>1</sup>, FERNANDO ATAÚLFO GONZÁLEZ<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Servicio de Hematología. Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid

<sup>2</sup> Sección de Hematología. Laboratorio Unificado de la Comunidad de Madrid-BRSalud

<sup>3</sup> Servicio de Hematología. Hospital Clínico San Carlos. Madrid

### Introducción

El laboratorio clínico contribuye en un 70% al diagnóstico médico, siendo esta aportación aún mayor en el laboratorio de hematología<sup>(1)</sup>. La disponibilidad de unos datos de laboratorio exactos y rápidos ayudan a un tratamiento temprano y eficaz. Durante los últimos 20 años, los contadores hematológicos han sufrido una enorme evolución tecnológica aumentando considerablemente la información que proporcionan<sup>(2)</sup>. Además de los resultados tradicionales del hemograma de 9 parámetros y el diferencial leucocitario, hoy en día nos proporcionan nuevos valores, tanto cuantitativos como cualitativos, muchos de ellos de gran ayuda en el diagnóstico clínico. Esto hace que cada vez sea necesaria una mayor preparación para su conocimiento y correcta interpretación y evitar así la petición de pruebas innecesarias o, lo que es peor, un diagnóstico tardío o equivocado.

La interpretación del hemograma debe hacerse siempre en el contexto clínico del paciente. Es fundamental saber tanto los antecedentes como el cuadro clínico actual, además de cualquier otra circunstancia que pueda modificar los resultados analíticos, tales como ciertos hábitos (alcohol, tabaco, medicación, etc.). También es de suma importancia conocer los resultados de otros laboratorios y pruebas complementarias y, si éstas son necesarias para el diagnóstico y no se han realizado, sugerir al médico su solicitud. En todos aquellos casos en que sea necesario, el hemograma se deberá complementar con un frotis de sangre periférica, que deberá ser interpretado junto con el hemograma. Al final, siempre que se precise, deberemos dar un informe con un diagnóstico final, si es posible, o con una orientación diagnóstica, y no dar una serie de datos aislados que, en muchos de los casos, el clínico no es capaz de interpretar.

Aunque la interpretación del hemograma debe hacerse de forma global, haremos una descripción separada de lo que aportan cada una de las series hematópoyéticas, centrándonos especialmente en los nuevos parámetros incorporados a los analizadores automáticos y cómo contribuyen al diagnóstico hematológico.

### Serie eritroide

Al empezar a estudiar una anemia desde el punto de vista analítico, lo primero que tenemos que hacer es clasificarla según el volumen y la concentración de hemoglobina de los hematíes y según la cifra de reticulocitos<sup>(3)</sup>. Los analizadores hematológicos, en general, miden de forma directa el número de hematíes, su volumen, su ancho de distribución y la hemoglobina, siendo el resto de parámetros eritrocitarios, calculados (hematocrito, hemoglobina corpuscular media y concentración de hemoglobina corpuscular media (Tabla 1). Esto nos permite clasificar las anemias según su volumen como microcíticas, normocíticas y macrocíticas, y según la concentración de hemoglobina en hipocrómicas, normocrómicas e hiperocrómicas. Según la cifra de reticulocitos, las anemias se clasifican en regenerativas y arregenerativas. La combinación de estos parámetros nos permite diagnosticar la mayoría de las anemias y, cuando esto no es posible, nos orienta en las determinaciones analíticas que tenemos que solicitar<sup>(4)</sup>. En el estudio de microcitosis, aunque sea sin anemia, es fundamental la orientación diagnóstica de posibles talasemias ya que en estos casos el consejo genético es crucial. Cuando se observe una

Tabla 1. Índices eritrocitarios calculados

Índices eritrocitarios	
Hematocrito = VCM x eritrocitos (10 <sup>12</sup> /L) = L/L	
	emoglobina (g/L)
HCM = $\frac{\text{emoglobina (g/L)}}{\text{Eritrocitos (10}^{12}\text{/L)}}$	= picogramos
	(hemoglobina corpuscular media)
	Hemoglobina (g/L)
CHCM = $\frac{\text{Hemoglobina (g/L)}}{\text{Hematocrito (L/L)}}$	= g/L
	(concentración de hemoglobina corpuscular media)

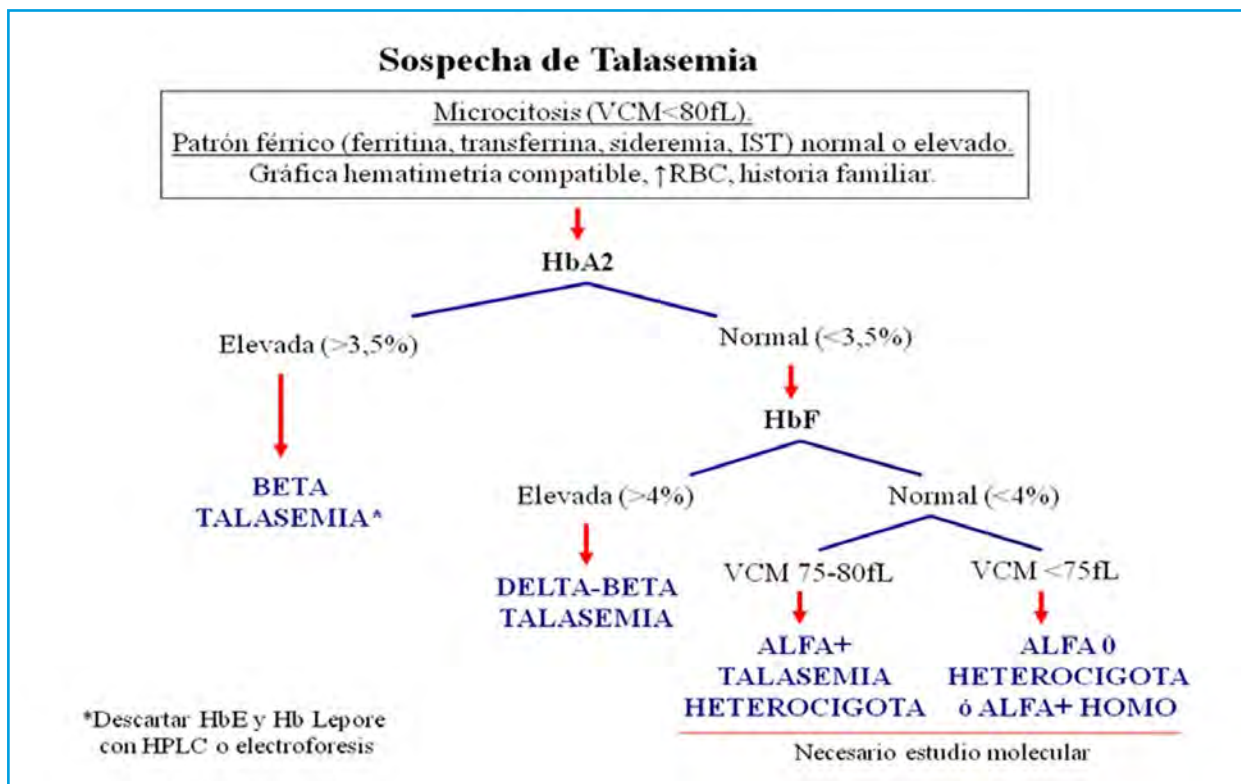


Tabla 2. Algoritmo diagnóstico de las microcitosis para el estudio de talasemias.

microcitosis o una hemoglobina corpuscular media (CHM) disminuida, sugestiva de talasemia, se deberá comunicar la posible hemoglobinopatía, ya que frecuentemente se desconoce, y se deberá iniciar el estudio correspondiente<sup>(5)</sup> (Tabla 2).

A partir de 1990, con la incorporación de nuevas tecnologías en los analizadores hematológicos, empiezan a aparecer nuevos parámetros que mejoran el diagnóstico de forma considerable.

### 1. Eritroblastos

Su presencia indica una eritropoyesis muy aumentada o daño u ocupación medular, y su presencia, salvo en los primeros días de vida, siempre es patológica. Los analizadores hematológicos que los cuentan suelen marcar su núcleo después de lisarlos para poder separarlos de los leucocitos. Su presencia nos orienta en el diagnóstico, y su recuento automático es mucho más exacto que el manual, dato que en ciertas circunstancias es importante, como en los pacientes con síndromes talasémicos, en los que para valorar la eficacia de las transfusiones se recomienda tener una cifra de eritroblastos menor de 5 por cada 100 leucocitos<sup>(6)</sup>. Pueden dar lugar a falsas linfocitosis si no son identificados correctamente. Además de eritroblastos, determinados analizadores hematológicos son capaces de identificar la presencia de cuerpos de Howell-Jolly (Figura 1).

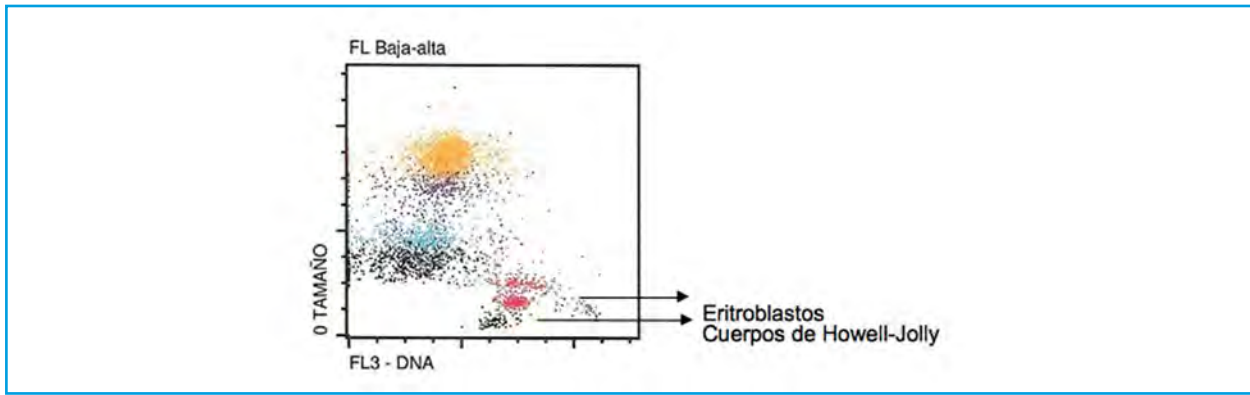
### 2. Fracción de reticulocitos inmaduros (FRI)

Son los reticulocitos que contienen mayor cantidad de ácido ribonucleico (ARN) y, por lo tanto, los más jóvenes. Su aumento predice la recuperación eritropoyética medular hasta 2 o 3 días antes que el aumento de reticulocitos absolutos, siendo de gran utilidad para valorar la recuperación después de quimioterapia y en anemias carenciales<sup>(7)</sup>.

### 3. Contenido de hemoglobina reticulocitaria media (CHr)

Sería una medida indirecta del hierro funcional disponible para la producción de hematíes en los últimos 3-4 días. Es de gran utilidad para los estudios de anemia ferropénica y anemia de los trastornos crónicos, así como para valorar el estado férrico de los pacientes en tratamiento con eritropoyetina<sup>(8)</sup> (Figura 2).

Algunos analizadores hematológicos han desarrollado parámetros parecidos a CHr basándose en el volumen y en el contenido de hemoglobina de los reticulocitos (cuantos más inmaduros, mayor volumen y menor contenido en hemoglobina), pero no están estandarizados, por lo que sus resultados no son comparables entre distintas tecnologías, aunque pueden ser de gran utilidad dentro de cada laboratorio. Entre ellos destacan la *hemoglobina reticulocitaria* (Ret-He) y el contenido de *hemoglobina celular media reticulocitaria* (MCHr).



**Figura 1.** Identificación de eritroblastos y cuerpos de Howell-Jolly en un analizador hematológico Cell-Dyn Sapphire. La identificación se realiza al marcar los núcleos de los eritroblastos y los cuerpos de Howell-Jolly con yoduro de propicio, que se une a los ácidos nucleicos. El caso corresponde a una drepanocitosis.

#### 4. Porcentaje de hematíes hipocromos e hiperchromos

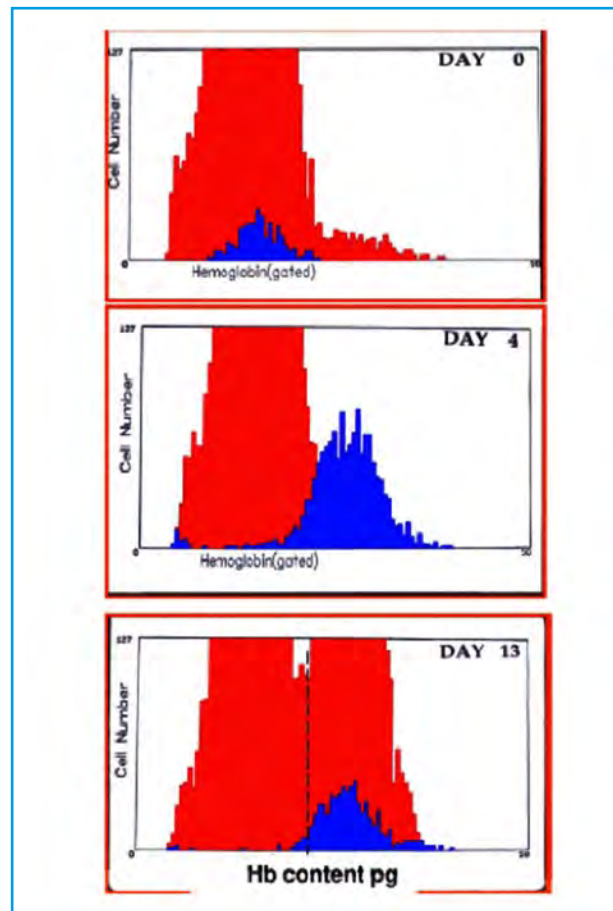
La posibilidad de medir de forma directa el contenido de hemoglobina de los hematíes (y no sólo de forma calculada) y cuantificar simultáneamente su volumen ha permitido tener información de 9 poblaciones eritrocitarias (Figura 3). El porcentaje de hematíes hipocromos es de gran utilidad en el déficit funcional de hierro<sup>(9)</sup> y el porcentaje de hematíes hiperchromos es de gran valor para sospechar esferocitosis hereditaria. Estas medidas también se pueden realizar sobre la población de reticulocitos, como vimos anteriormente.

#### 5. Esquistocitos

Su identificación y cuantificación es fundamental para el diagnóstico de diversas patologías que suponen un riesgo vital para el paciente, por lo que los analizadores deben informarnos de su presencia. Su recuento al microscopio es impreciso y subjetivo habiendo una gran discordancia en sus recuentos. Algunos analizadores informan de su recuento en pantallas de investigación y, aunque la sensibilidad es bastante buena (cerca al 100%), la especificidad es menor del 20%. En casos de sospecha, siempre se debe revisar el frotis de sangre periférica<sup>(10)</sup>.

#### Serie leucocitaria

Los analizadores hematológicos nos dan los recuentos de las 5 poblaciones leucocitarias, así como diferentes alarmas morfológicas de sospecha (bandas, granulocitos inmaduros, linfocitos atípicos y blastos, principalmente). Estos recuentos son expresados tanto en porcentaje como en valor absoluto, aunque son sólo estos últimos los que tienen significación clínica, por lo que los primeros podrían no informarse. Además, cuentan los eritroblastos en caso de que



**Figura 2.** Advia 2120 (Siemens). Histograma del contenido de hemoglobina en los hematíes (rojo) y en los reticulocitos (azul), antes, a los 4 días y a los 13 días después de la administración de hierro intravenoso en un paciente con anemia ferropénica que no respondía a hierro oral. Puede verse cómo en el día 0 empieza a aumentar el contenido de hemoglobina de los reticulocitos sin que aumenten esto; en el día 4 hay un claro aumento del contenido de hemoglobina en los reticulocitos que no se refleja en los hematíes hasta el día 13. (Detection, evaluation, and management of iron-restricted erythropoiesis. *Blood*.2010;116(23):4754-4761)

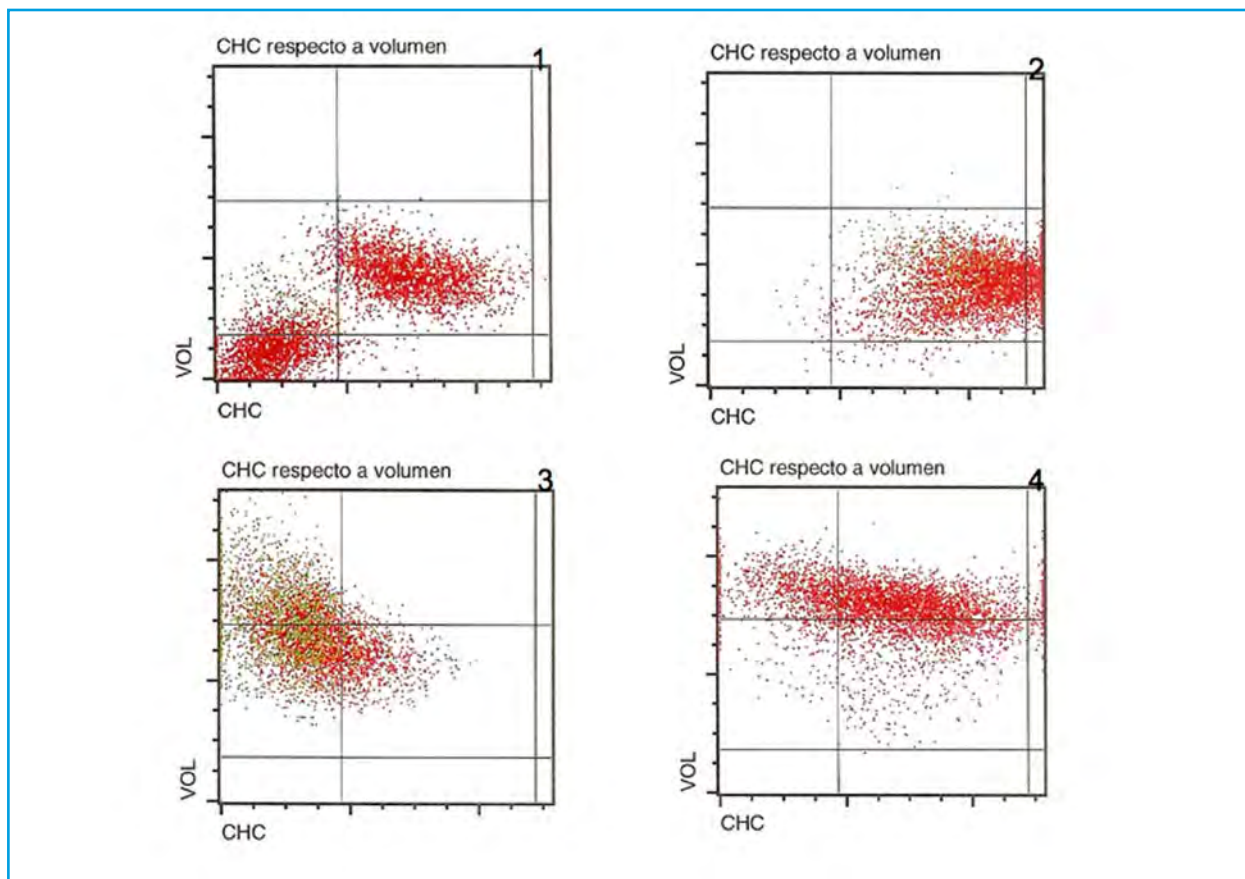


Figura 3. Sapphire (Abbott Diagnostic). Volumen de los hematíes frente a su contenido en hemoglobina. 1. Anemia ferropénica transfundida. 2. Esferocitosis hereditaria. 3. Anemia hemolítica autoinmune. 4. Anemia megaloblástica.

existan. La presencia de cualquiera de estas alarmas nos obliga a revisar el frotis de la muestra si queremos saber su cifra exacta y orientar el diagnóstico. También nos informan de otras alarmas que pueden interferir con el diferencial leucocitario, tales como agregados plaquetarios, hematíes no lisados, etc. Se deben tener claramente establecidos los rangos y los criterios de revisión y validación del hemograma en cada laboratorio, así como los métodos alternativos para la comprobación de los resultados.

En la actualidad, los analizadores hematológicos nos proporcionan la fórmula expandida, es decir, el diferencial leucocitario de, al menos, 9 poblaciones leucocitarias, siendo capaces no sólo de dar las alarmas morfológicas de sospecha, sino de cuantificar estas poblaciones. Estos resultados no se pueden informar directamente al clínico, sino que deben ser comprobados. Este diferencial, junto con los diferentes gráficos que suministran los equipos, nos permite diagnosticar la mayoría de los procesos patológicos.

De todas estas alarmas, la más importante es la de **blastos**. Independientemente del analizador utilizado, debemos ser capaces de sospechar la presencia de blastos en un paciente para adoptar las medidas necesarias para su diagnóstico. Pero lo que los analizado-

res detectan como blastos no son siempre las células inmaduras y malignas que vemos al microscopio y es posible que algunas células que no son estrictamente blastos sean contadas como tales (prolinfocitos, tri-leucocitos, promielocitos, etc.). Incluso células no malignas, como en la mononucleosis infecciosa, suelen ser identificadas como blastos. Pero lo que es más preocupante es que determinados blastos en algunas leucemias agudas no son reconocidos en los analizadores hematológicos. Esto ocurre principalmente cuando los blastos son de pequeño tamaño, similar al de un linfocito, y no tienen ninguna característica citoplásmica especial, como ocurre en algunas leucemias linfoblásticas, frecuentemente en niños. Si el paciente tiene una cifra de leucocitos normal y no presenta anemia ni trombocitopenia, la sospecha debe ser clínica (fiebre, dolor óseo, malestar general, etc.) y es imprescindible la realización de un frotis de sangre periférica y, si es necesario, un estudio de citometría de flujo. Hay que tener en cuenta que en determinadas situaciones el analizador identifica los blastos como otras células atípicas (linfocitos atípicos, granulocitos inmaduros, etc.), informando con las alarmas correspondientes. Es por esto por lo que es absolutamente necesario revisar todas las gráficas que pro-

porcionan los analizadores junto con los datos clínicos del paciente.

Pero existen otros problemas del diferencial sin resolverse. La identificación y el recuento de monocitos puede ser problemática y, en muchas ocasiones, no es posible diferenciar los monocitos ni los promonocitos. Los basófilos son la población más difícil de contar y, ante la sospecha de una basofilia, es necesario hacer un recuento manual. Los analizadores tienden a infraestimar la verdadera basofilia y, cuando ésta se produce, debe revisarse con precaución ya que puede deberse a artefactos o a la presencia de células anormales, tales como blastos, células plasmáticas o células linfomatosas.

En los últimos años, los analizadores hematológicos han incorporado nuevos parámetros que complementan el estudio de la serie leucocitaria. La cuantificación de las *células progenitoras hematopoyéticas (HPC)* puede ser de gran ayuda a la hora de decidir el mejor momento para la realización de una aféresis con el fin de obtener las células madre hematopoyéticas necesarias para un trasplante de médula ósea<sup>(11)</sup>. Otros utilizan anticuerpos monoclonales de forma rutinaria, siendo posible realizar en ellos la cuantificación automática de las poblaciones linfocitarias CD3/CD4/CD8. También es posible la utilización de otros anticuerpos monoclonales de forma semiautomática, lo que nos permite el estudio de las diferentes poblaciones linfocitarias (linfograma) y granulocíticas, identificación y recuento de células progenitoras y caracterización de blastos<sup>(12)</sup>. Estos anticuerpos también se pueden utilizar para el estudio de plaquetas y hematíes.

## Plaquetas

El recuento de plaquetas constituye uno de los mayores retos para los contadores hematológicos. Hay que tener en cuenta que para indicar una transfusión profiláctica de plaquetas el único dato de que dispone el clínico es la cifra de plaquetas que le proporcione el laboratorio y, cuando éstas se encuentran muy disminuidas, su cuantificación puede ser muy complicada. Por lo tanto, corremos el riesgo de no transfundir cuando es necesario y poner en riesgo la vida del paciente o, por el contrario, transfundir de más, con las posibles complicaciones que esto conlleva. En el recuento de plaquetas es fundamental conocer la tecnología que utiliza nuestro analizador y saber la linealidad del mismo, especialmente en cifras bajas. Los métodos que utilizan sólo el volumen de las plaquetas para su recuento (impedancia) son los más inexactos ya que éstas se pueden confundir con otras partículas de tamaño similar, tales como esquistocitos, fragmentos de leucocitos, microcitos, etc. (Figura 4). Para mejorar esto, algunos analizadores realizan una serie de ajustes logarítmicos para adaptarse

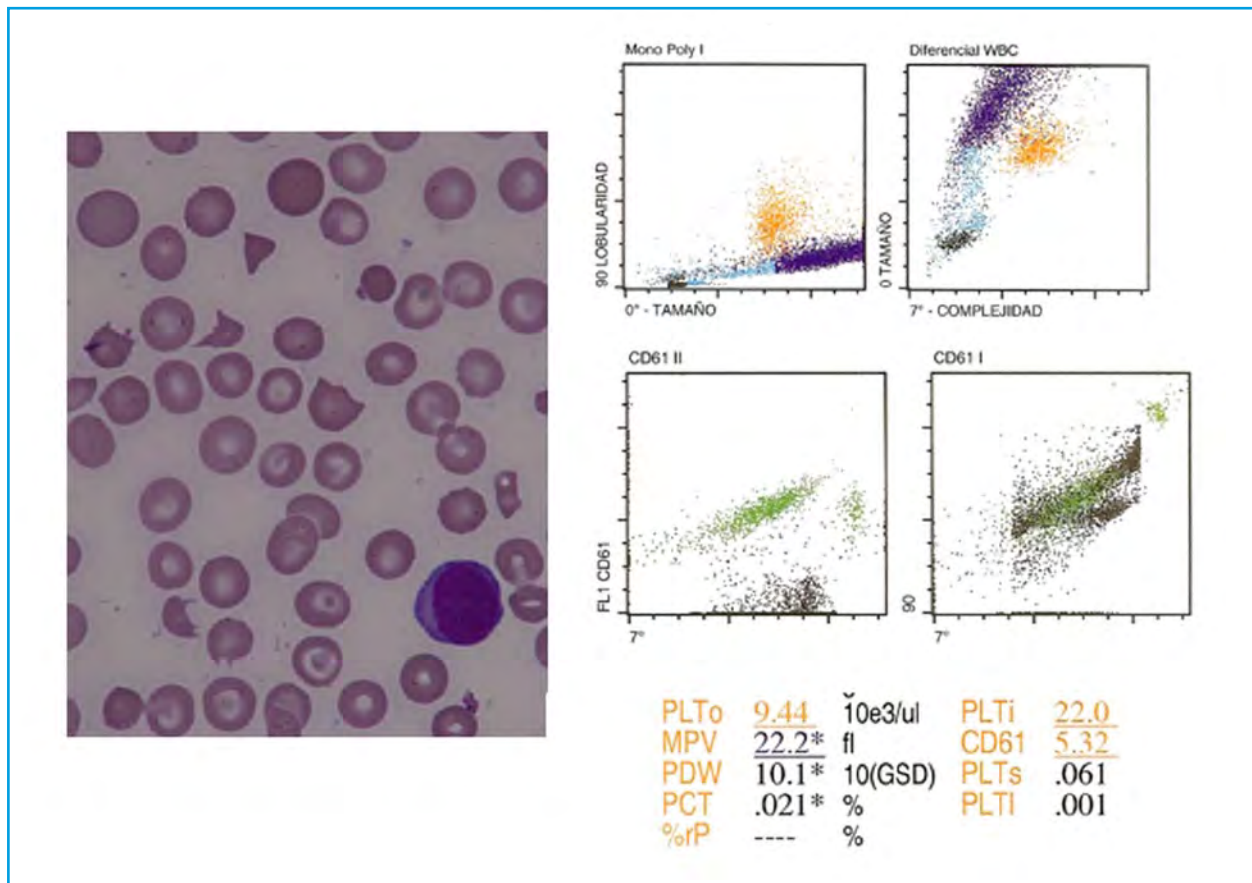
a la distribución de las plaquetas. La utilización de los métodos ópticos, que tienen en cuenta tanto el volumen como la composición celular interna de la plaqueta, mejoran considerablemente este problema. El método inmunológico, actualmente método de referencia para el recuento plaquetario, es el más adecuado para los casos de trombocitopenia severa<sup>(13)</sup>. Se basa en la identificación de las plaquetas por anticuerpos monoclonales (CD61, que identifica la proteína de membrana plaquetaria GPIIIA). Lo que no puede ser utilizado en estos casos para tomar decisiones clínicas es el recuento manual en el frotis de sangre periférica. Este método, además de tedioso, es impreciso e inexacto, llegando a tener coeficientes de variación de más del 25%, lo que implica que la indicación de transfundir plaquetas o no sea frecuentemente errónea. Esto no significa que no sea necesario revisar los frotis de sangre periférica, necesarios para valorar la morfología de las plaquetas y de otras células que nos pueden ayudar al diagnóstico.

Existen analizadores hematológicos que informan del número de plaquetas reticuladas. Estas plaquetas son las plaquetas más jóvenes, con mayor cantidad de ARN y son de mayor tamaño. Serían el equivalente de los reticulocitos en la eritropoyesis y están aumentadas en las trombocitopenias de causa periférica<sup>(14)</sup>. Aunque su utilidad clínica ha quedado demostrada en diversas publicaciones, su utilización no ha llegado a generalizarse en los laboratorios clínicos.

Otros parámetros plaquetarios, como la masa plaquetar (MCP) y su ancho de distribución (PCDW y PMDW), se han correlacionado con la activación plaquetaria, pero su utilización tampoco se ha generalizado debido, entre otras cosas, a la posible activación de las plaquetas en el proceso de extracción de sangre.

## Conclusiones

- El hemograma, junto con el frotis de sangre periférica, es una herramienta fundamental para el diagnóstico hematológico.
- Es necesario conocer las posibilidades y limitaciones de nuestros analizadores hematológicos para asegurarnos de que los resultados que ofrecemos son correctos.
- El hemograma debe interpretarse en el contexto clínico del paciente y para ello utilizaremos todas las herramientas que estén a nuestro alcance (antecedentes, historia clínica, datos analíticos, técnicas de imagen, pruebas complementarias, etc.).
- El informe final debe ser claro e inteligible y no limitarnos a dar una serie de descripciones citológicas sin llegar a ninguna conclusión.
- Aunque los analizadores hematológicos nos informan de numerosos parámetros, no todos tienen la misma utilidad. Hay que tener claro qué



**Figura 4.** Recuento de plaquetas por CD61. Es significativa la diferencia de plaquetas según el método utilizado (PLTo: óptico; PLTI: impedancia; CD61: anticuerpo monoclonal). En verde se observan las plaquetas reales y, en negro, esquistocitos que fueron contados como plaquetas. Corresponde a un caso de púrpura trombótica trombocitopénica secundaria a trasplante de médula ósea en una leucemia de células plasmáticas.

parámetros nos pueden ser útiles para la revisión, cuáles debemos informar al clínico y cuáles no nos aportan nada.

### Bibliografía

1. Report of the review of NHS pathology services in England. An independent review for the Department of Health. London: Department of Health, 2006:6.
2. Briggs C. Quality counts: new parameters in blood cell counting. *Int Jnl Lab Hem*, 2009, 31, 277-297.
3. Bryan L, Zakai A. Why is my patient anemic?. *Hematol Oncol Clin N Am* 26 (2012) 205-230.
4. Tefferi A, Hanson CA, Inwards DJ. How to interpret and pursue an abnormal complete blood cell in adults. *Mayo Clin Proc* 2005;80 (7):923-936.
5. Bain BJ. Haemoglobinopathy diagnosis: Algorithms, lessons and pitfalls. *Blood Reviews* 25 (2011) 205-213.
6. Fosburg MT, Nathan DG. Treatment of Cooley's anemia. *Blood* 1990;76:435-444.
7. Molina JR, Sanchez-Garcia J, Torres A, et al. Reticulocyte maturation parameters are reliable early predictors of hematopoietic engraftment after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007 Feb;13 (2):172-82.
8. Goodnough LT, Nemeth E and Ganz T. Detection, evaluation and management of iron-restricted erythropoiesis. *Blood*. 2010;116(23):4754-4761.
9. Buttarello M, Pajola R, Novello E, et al. Diagnosis of iron deficiency in patients undergoing hemodialysis. *Am J Clin Pathol*, 2010, 133, 949-954.
10. Lesesve JF, Salignac S, Alla F, et al. Comparative evaluation of schistocyte counting by an automated method and by microscopic determination. *Am J Clin Pathol*. 2004;121:739-745.
11. Letestu R, Marzac C, Audat F, et al. Use of hematopoietic progenitor cell count on the Sysmex XE-2100 for Peripherals blood stem cell harvest monitoring. *Leuk Lymphoma*. 2007;48:89-96.
12. Molero T, Roemer B, Perera Alvarez M, et al. Analysis and enumeration of T cells, B cells and NK cells using the monoclonal antibody fluorescent capability of a routine haematology analyser Cell-Dyn CD4000. *Clin Lab Haematol* 2005;27:224-234.
13. Harrison P, Horton A, Grant D, et al. Immunoplatelet counting: a proposed new reference procedure. *Br J Haematol* 2000, 108; 228-235.
14. Pons I, Monteagudo M, Lucchetti G, et al. Correlation between immature platelet fraction and reticulated platelets. Usefulness in the etiology diagnosis of thrombocytopenia. *Eur J Haematol* 2010;85:158-163.

# CASOS CLÍNICO-CITOLÓGICOS

**Coordinadores:** **María Rozman Jurado**

*Unidad de Hematopatología.*

*Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Clínic. Barcelona*

**Mar Osma Córdoba**

*Servicio de Hematología. Hospital Universitario*

*Morales Meseguer. Murcia*

**Francisco Ortuño Giner**

*Servicios de Hematología y Oncología.*

*Hospital Universitario Morales Meseguer. Murcia*



## Caso 1 Mujer de 75 años con pancitopenia

I. DLOUHY<sup>1</sup>, Ó. PEÑA<sup>1</sup>, N. MARTÍNEZ CIBRIAN<sup>1</sup>, X. ANDRADE<sup>1</sup>,  
X. CALVO<sup>2</sup>, M. AYMERICH<sup>2</sup>, D. COSTA<sup>2</sup>, N. VILLAMOR<sup>2</sup>,  
J. ESTEVE<sup>1</sup>, M. ROZMAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Servicio de Hematología; <sup>2</sup> Unidad de Hematopatología.  
Servicio de Anatomía Patológica. IDIBAPS. Hospital Clínic de Barcelona

### Historia clínica

Mujer de 75 años, con antecedentes de diabetes mellitus de tipo 2 (sin tratamiento farmacológico) y colecistectomía por litiasis biliar. A raíz de astenia progresiva de una semana de evolución, se realizó una analítica en otro centro, donde se observaba una pancitopenia, por lo que fue derivada a nuestro hospital.

### Exploración física

Al examen físico presentaba un ECOG de 0, con palidez cutáneo-mucosa, siendo el resto de la exploración normal.

### Pruebas complementarias

El hemograma presentaba hemoglobina 61 g/L, VCM 86 fL, leucocitos  $3,50 \times 10^9/L$  (neutrófilos  $2,1 \times 10^9/L$ , linfocitos  $0,9 \times 10^9/L$ , monocitos  $0,4 \times 10^9/L$ , eosinófilos  $0,1 \times 10^9/L$ ) y plaquetas  $23 \times 10^9/L$ . En la bioquímica no se encontraron alteraciones destacables. Las serologías víricas frente a VIH, VHC y VHB fueron negativas. En el frotis de sangre periférica se observaron eritrocitos con morfología alterada (perfil de “champiñón”) y neutrófilos desgranulados (Figura 1).

El aspirado medular fue hiper celular, con disminución de la grasa. La serie blanca estaba disminuida, mientras que los megacariocitos estaban presentes en cantidad normal, pero un 70% de ellos presentaba signos displásicos (núcleos hiposegmentados, micromegacariocitos). El componente eritroide semimaduro y maduro comportaba el 12% del total celular y mostraba marcados signos displásicos: cromatinas megalooblásticas, núcleos irregulares, cariorrexis, elementos binucleados y punteado basófilo. Asimismo se observó una infiltración por un 29% de células blásticas, la mayoría de aspecto eritroide (núcleo redondo, cromatina inmadura y citoplasma amplio, basófilo y con vacuolas confluentes) (Figuras 2-4).

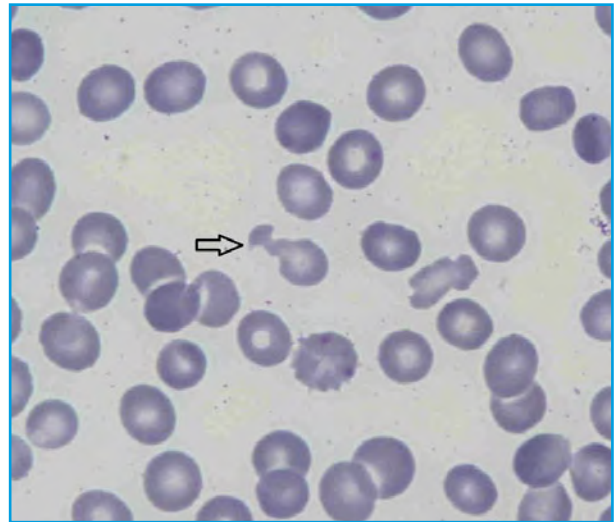


Figura 1. Frotis de sangre periférica. Se observan eritrocitos de morfología alterada. Flecha: eritrocito con perfil de “champiñón” (May-Grünwald-Giemsa).

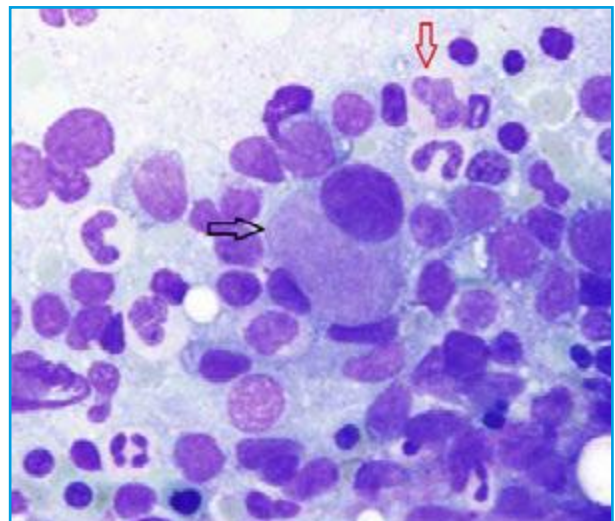
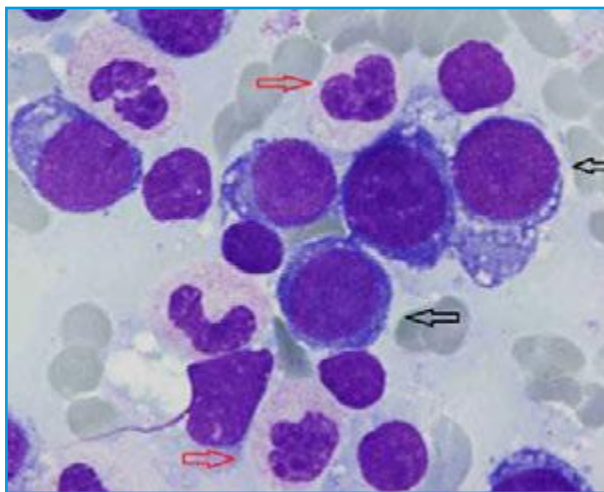
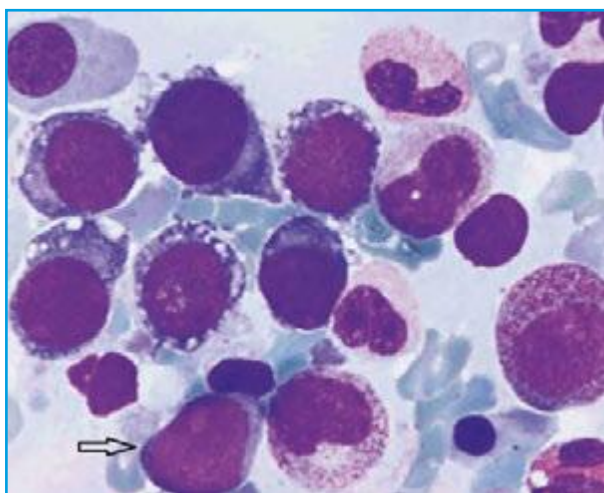


Figura 2. Aspirado medular. Se observa un megacariocito pequeño con núcleo redondo (flecha negra) y un neutrófilo con segmentación nuclear anómala (flecha roja) (May-Grünwald-Giemsa).



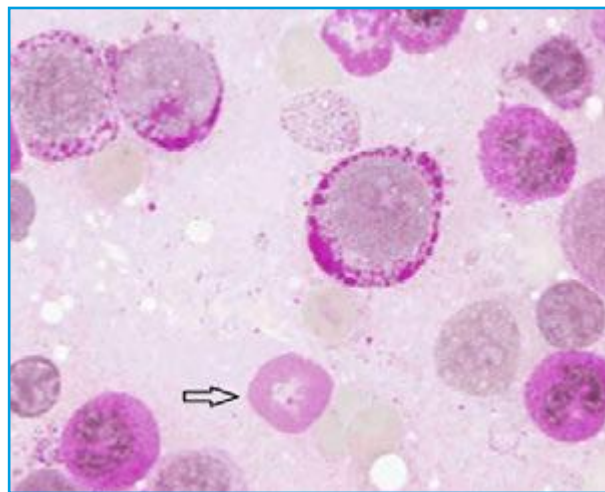
**Figura 3.** Aspirado medular en el que se observan células inmaduras de aspecto eritroide: núcleo redondo, con el citoplasma basófilo intenso y con vacuolas (flechas negras). Asimismo, se observan neutrófilos con segmentación nuclear anómala (flechas rojas) (May-Grünwald-Giemsa).



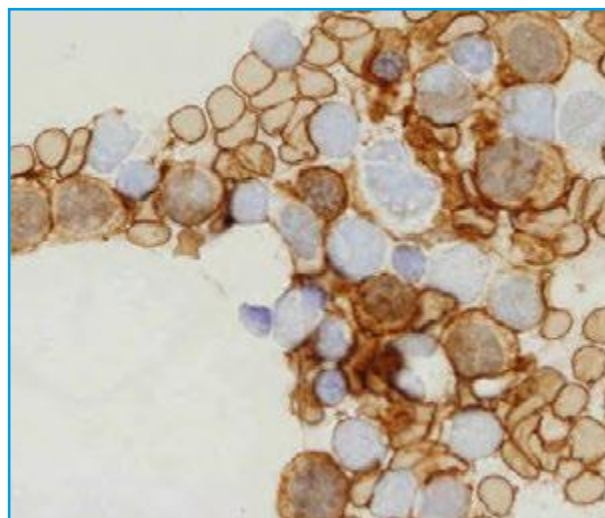
**Figura 4.** Aspirado medular. Se observa un blasto de aspecto mieloide (flecha negra) y abundantes blastos de aspecto eritroide (May-Grünwald-Giemsa).

En el estudio citoquímico, la tinción de ácido periódico de Schiff (PAS) mostró positividad citoplasmática en mazacotes, que tendían a la coalescencia (Figura 5), y en el estudio inmunocitoquímico (sobre el mielograma) la mayoría de las células blásticas fueron positivas para glicoforina (Figura 6), y aisladamente alguna fue positiva para CD61 o mieloperoxidasa.

En el estudio inmunofenotípico por citometría de flujo la muestra medular estaba constituida mayoritariamente por linfocitos (17%), serie roja (18%), serie granulocítica (46%) y monocitos (6%). Existían además un 6-8% de elementos de FSC/SSC intermedio y de fenotipo CD117++, CD45 débil,



**Figura 5.** Reacción del PAS sobre aspirado medular. Se observa la positividad en forma de granos gruesos que tienden a la coalescencia, además de un eritrocito PAS-positivo (flecha).



**Figura 6.** Inmunocitoquímica sobre aspirado medular. La mayoría de las células blásticas son de línea eritroide (glicoforina +).

CD33 débil, CD13+ débil, HLA-DR+, CD71+++ , MPO-, lisozima-, y sin expresión de marcadores de maduración neutrófila ni monocítica. Los elementos CD117+ coexpresaban CD2, CD4 y CD7. Asimismo, el patrón de maduración neutrófila fue anómalo.

El estudio citogenético en médula ósea fue 45-47, XX, -5[3], del(5)(q13q33)[12], -7[3], r(7)(p22q36)[8], +mar1[2], +mar2[2]/46, XX[7].

El análisis de la duplicación interna en tándem del gen FLT3 (FLT3-ITD) mediante PCR fue negativo.

### Diagnóstico

Leucemia mieloide aguda con cambios relacionados con mielodisplasia.

## Evolución

Se inició tratamiento con azacitidina (75 mg/m<sup>2</sup> x 7 días cada 28 días), con muy buena tolerancia, con lo que mejoró el cuadro asténico. Alcanzó una respuesta hematológica completa, con normalización de los parámetros hemoperiféricos y reducción de la cifra de blastos (5%), pero después del 8.º ciclo se detectó una pancitopenia, por lo que se realizó un aspirado medular, confirmando la recaída de la enfermedad (infiltración por 28% de blastos de similares características a las del diagnóstico). Se pasó entonces a un tratamiento paliativo, con soporte transfusional. Finalmente la paciente fue *exitus vitae* a los 10 meses del diagnóstico.

## Discusión

Las leucemias agudas son proliferaciones clonales de células hematopoyéticas inmaduras que suelen cursar con una disminución de los elementos mieloides normales. Su diagnóstico se basa en el análisis integrado de la morfología, citoquímica, inmunofenotipo, citogenética y biología molecular de sangre periférica y/o médula ósea. Las leucemias mieloides agudas (LMA) se dividen, según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) 2008, en LMA con anomalías genéticas recurrentes, LMA con cambios relacionados con mielodisplasia, LMA relacionadas con el tratamiento y LMA sin otra especificación<sup>(1)</sup>.

La LMA con cambios relacionados con mielodisplasia (LMA-CRM) se define por la presencia en sangre periférica o médula ósea de un 20% o más de blastos junto a rasgos displásicos intensos en la hematopoyesis residual, el antecedente de una mielodisplasia previa o bien la presencia de anomalías citogenéticas relacionadas con mielodisplasia (Tabla 1);

**Tabla 1. Anomalías citogenéticas definitivas de leucemia mielóide aguda con cambios relacionados con mielodisplasia (si ≥ 20% de blastos)**

Cariotipo complejo (≥ 3 alteraciones no relacionadas)	
Alteraciones no balanceadas	Anomalías balanceadas
-7/del(7q)	t(11;16)(q23;p13.3)
-5/del(5q)	t(3;21)(q26.2;q22.1)
i(17q)/t(17p)	t(1;3)(q26.2;q22.1)
-13/del(13q)	t(2;11)(p21;q23)
del(11q)	t(5;12)(q33;p12)
del(12p)/t(12p)	t(5;7)(q33;q11.2)
del(9q)	t(5;17)(q33;p13)
idic/(X)(q13)	t(5;10)(q33;q21)
	t(3;5)(q25;q34)

además no debe haber antecedentes de quimio- o radioterapia ni la presencia de anomalías citogenéticas recurrentes. En cuanto a la morfología, la displasia debe estar presente en al menos el 50% de las células de al menos 2 líneas celulares de la hematopoyesis.

Ante la presencia de un componente mayoritariamente eritroide en un caso de leucemia aguda hay que plantearse el diagnóstico diferencial con la eritroleucemia (antigua M6 de la clasificación FAB), de la cual se diferencian 2 subtipos: la leucemia aguda mieleroitroide (LAME) y la leucemia aguda eritroide pura (LAEP). La primera se caracteriza por presentar un componente eritroide de al menos el 50% de las células nucleadas en la médula ósea, y un 20% o más de blastos mieloides de la celularidad restante. Estas leucemias pueden originarse de novo, evolucionar desde un síndrome mielodisplásico o, más raramente, desde un síndrome mieloproliferativo crónico<sup>(2)</sup>, si bien con la clasificación actual de la OMS el antecedente de mielodisplasia haría que se catalogara como una LMA-CRM. La LAME ocurre preferentemente en adultos, con ligero predominio masculino, y es poco frecuente (menos del 5% de las leucemias mieloides). Los pacientes típicamente presentan al diagnóstico una anemia muy marcada, con eritroblastos displásicos circulantes y con leucopenia.

La LAEP puede aparecer a cualquier edad, incluso durante la infancia, y es extremadamente rara. Para su diagnóstico se requiere que en la médula ósea se presenten un 80% o más de elementos inmaduros de la serie roja.

En ambas entidades, la serie roja muestra signos displásicos marcados (gran tamaño, alteraciones nucleares y frecuentemente la presencia de vacuolas citoplasmáticas PAS+ con tendencia a la coalescencia). En la LAEP estos rasgos displásicos son más evidentes que en la LAME, habiéndose observado además en el primer subtipo que a mayor porcentaje de proeritroblastos peor era la supervivencia<sup>(3)</sup>.

Liu *et al.* analizaron una serie de 538 casos consecutivos de mielodisplasia y 1.558 de LAM, de los cuales 66 casos (3%) cumplían criterios de eritroleucemia aguda (> 50% de precursores eritroides y > 20% de mieloblastos del componente celular no eritroide)<sup>(4)</sup>. La mediana global de supervivencia en estos pacientes fue de 10,9 meses. Las anomalías citogenéticas más frecuentemente observadas en estos pacientes fueron cariotipos complejos (31%) y monosomía de los cromosomas 5 y 7 en un 24% y 26% de los casos, respectivamente. Usando únicamente la clasificación citogenética del IPSS (International prognostic scoring system) para síndromes mielodisplásicos<sup>(5)</sup>, los pacientes del grupo de alto riesgo tenían peor supervivencia que los de riesgo bajo e intermedio (P = 0,034), mientras que, si se usa la clasificación citogenética para LMA del grupo británico (UKMRC)<sup>(6)</sup>, no

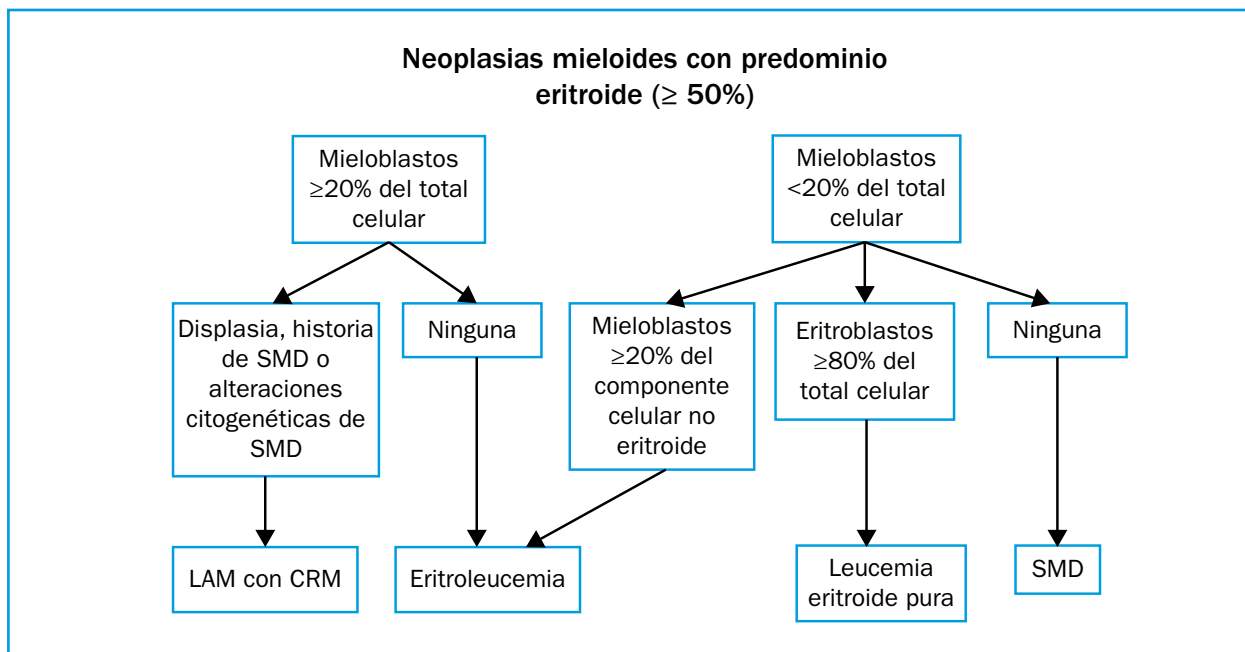


Figura 7. Algoritmo de clasificación de las neoplasias con componente eritroide mayoritario. Fuente: adaptado de S. Wang<sup>(8)</sup>.

hay diferencia entre los grupos de riesgo intermedio y alto ( $P = 0,516$ ). Asimismo, si se usa el *score* pronóstico IPSS completo, nuevamente el grupo de riesgo alto tiene una sobrevida más corta en comparación con los de riesgo bajo e intermedio ( $P = 0,031$ ). De hecho, las anomalías citogenéticas observadas en estos pacientes con predominio eritroide fueron similares a las descritas en los síndromes mielodisplásicos. Otros autores, como Zuo y Bacher, han publicado series de casos de patologías mieloides con predominio eritroide con observaciones similares<sup>(2,7)</sup>.

Si bien la definición de la leucemia aguda eritroide es clara en cuanto a los valores numéricos requeridos de serie roja y blastos (Figura 7), no siempre es tan fácil encasillar cada caso, sobre todo por la variabilidad interobservador, la distribución irregular de los distintos tipos celulares y la atribución a una determinada línea de los blastos presentes en la muestra. El criterio arbitrario del 50% de componente eritroide intenta diferenciar la eritroleucemia de las mielodisplasias y de las leucemias mieloides agudas con gran componente eritroide, aunque todo (los aspectos clínicos similares, las alteraciones citogenéticas comunes, etc.) parece indicar que se trataría de una misma entidad biológica<sup>(9)</sup>. La leucemia eritroide pura sería la “verdadera” eritroleucemia, ya que tiene una morfología y un comportamiento clínico-biológico diferentes, con un mayor porcentaje de cariotipos complejos y una peor respuesta a la quimioterapia de inducción, lo que se traduce en una peor supervivencia (mediana entre 1 y 4 meses)<sup>(9)</sup>.

El tratamiento de estas patologías es similar al de otras leucemias mieloides agudas, es decir, esquemas

de inducción con citarabina y antraciclinas (esquemas “7 + 3”), con tasas de remisión completa alrededor del 60% (salvo las LAEP, que son significativamente peores, de alrededor del 25%<sup>(9)</sup>). Los agentes hipometilantes (azacitidina) han demostrado cierta utilidad, con tasas de remisión citogenética completa en el 77% de casos, con una mediana de supervivencia de 12 meses<sup>(10)</sup>. Idealmente, los pacientes con LAEP deben ser incluidos en ensayos clínicos y, si es necesario y se dan las condiciones, posteriormente tratados con trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos.

#### Para recordar

- La leucemia aguda eritroide se define por presentar un componente eritroide de al menos el 50% de las células nucleadas en la médula ósea, y un 20% o más de blastos mieloides de la celularidad no eritroide. Sin embargo, estos criterios son arbitrarios y pueden plantear dificultades en algunos casos.
- El diagnóstico diferencial de la leucemia aguda eritroide debe hacerse principalmente con la leucemia aguda mieloides con cambios relacionados con mielodisplasia y con los síndromes mielodisplásicos con componente eritroide importante.
- El comportamiento clínico y las alteraciones citogenéticas observadas en la eritroleucemia y las otras patologías mieloides con predominio eritroide sugieren que estas entidades constituyen un mismo *continuum* biológico.

## Bibliografía

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press; 2008.
2. Bacher U, Haferlach C, Alpermann T, Kern W, Schnittger S, Haferlach T. Comparison of genetic and clinical aspects in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes all with more than 50% of bone marrow erythropoietic cells. *Haematologica*. 2011;96:1284-92.
3. Santos FP, Bueso-Ramos CE, Ravandi F. Acute erythroleukemia: diagnosis and management. Expert review of hematology. 2010;36:705-18.
4. Liu CJ, Hong YC, Yang CF, Liu SH, Gau JP, Liu JH, et al. Clinicopathologic features and outcome of acute erythroid leukemia based on 2008 revised World Health Organization classification. *Leukemia & Lymphoma*. 2012;53:289-94.
5. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997;89:2079-88.
6. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, et al. The Importance of Diagnostic Cytogenetics on Outcome in AML: Analysis of 1,612 Patients Entered Into the MRC AML 10 Trial. *Blood*. 1998;92:2322-33.
7. Zuo Z, Medeiros LJ, Chen Z, Liu D, Bueso-Ramos CE, Luthra R, et al. Acute myeloid leukemia (AML) with erythroid predominance exhibits clinical and molecular characteristics that differ from other types of AML. *PloS one*. 2012;7:e41485.
8. Wang SA, Hasserjian RP. Erythroid proliferations in myeloid neoplasms. *Human Pathology*. 2012;43:153-64.
9. Goldberg SL, Noel P, Klumpp TR DG. The erythroid leukemias: a comparative study of erythroleukemia (FAB M6) and Di Guglielmo disease. *J Clin Oncol*. 1998;21:42-7.
10. Vigil C, Cortes J, Kantarjian HM, Garcia-Manero G, Lancet JE LA. Hypomethylating therapy for the treatment of acute erythroleukemia patients. 51st ASH Annual Meeting and Exposition; 2009.

## Caso 2

# Paciente con cuadro constitucional, hemofagocitosis en médula ósea y ganglio linfático y diagnóstico de linfoma difuso de célula grande de línea B

P. INIESTA<sup>1</sup>, N. NAVARRO<sup>2</sup>, E. CAMPO<sup>3</sup>, J. ESTEBAN<sup>4</sup>, J.M. HERNÁNDEZ RIVAS<sup>5</sup>, L. QUINTANA<sup>1</sup>, G. SOLER<sup>1</sup>, M.M. OSMA<sup>1</sup>, A. JEREZ<sup>1</sup>, F.J. ORTUÑO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Servicio de Hematología y Oncología Médica. Hospital Morales Meseguer. Murcia

<sup>2</sup> Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Morales Meseguer. Murcia

<sup>3</sup> Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Clínic. Barcelona

<sup>4</sup> Servicio de Hematología. Hospital Virgen del Castillo. Yecla (Murcia)

<sup>5</sup> Servicio de Hematología. Hospital Clínico Universitario. Salamanca

### Motivo de consulta

Paciente de 56 años remitido en octubre de 2011 por astenia, fiebre y adenopatías de 10 semanas de evolución.

### Antecedentes patológicos

Psoriasis cutánea diagnosticada en 1990. Diabético controlado con hipoglucemiantes orales desde 4 años antes. Neumonía que requirió ingreso hospitalario en 2002. Amputación traumática del cuarto dedo de la mano derecha 5 años antes.

### Enfermedad actual

En estudio por cuadro de 3 meses de evolución de fiebre diaria de hasta 38 °C, de predominio vespertino, que se acompañaba de sudoración, astenia y anorexia progresivas, pérdida de hasta 15 kg de peso y crecimiento paulatino de adenopatías cervicales y submandibulares.

### Exploración física

Afectación del estado general, con aspecto caquéctico. Palidez mucocutánea; no lesiones dérmicas. Exploración ORL, pulmonar y cardíaca sin hallazgos. Abdomen distendido; hepato- y esplenomegalia de 4 y 5 cm por debajo del reborde costal, respectivamente, la primera de ellas, homogénea, y la segunda, que atravesaba la línea media, de consistencia pétreo. Se palpaban adenopatías laterocervicales y submandibulares bilaterales de 3 y 2 cm, respectivamente, y una adenopatía axilar derecha de 5 cm.

### Análíticas

- **Hemograma:** WBC:  $2,2 \times 10^9/L$ ; diferencial automático: 70% N, 22% L, 7% M, 1% E, Hb: 73 g/L, VCM 84 fL, CHCM: 33 pg/L, plaquetas:  $22 \times 10^9/L$ .

- **Bioquímica:** sin alteraciones en la función renal, ionograma, proteinograma ni en factores de maduración u hormonas tiroideas. FA: 400 UI/L, GGT: 72 UI/L, ALT: 26 UI/L, AST: 18 UI/L, bilirrubina: 1,1 mg/dL, LDH: 930 UI/L,  $\beta_2$ -microglobulina 5,8 mg/L, ferritina 1.440 mg/dL y triglicéridos 293 mg/dL. Coombs directo negativo. Sedimento de orina: sin hallazgos destacables.

### Microbiología

Hemocultivos y urocultivos: negativos. Serologías de atípicas, lúes, VHS, VVZ, CMV, VHB, VHC y VIH negativas. EBV y toxoplasma positivas (IgG). Antígeno de galactomanano sérico negativo. Broncoaspirado: flora habitual con Auramina negativa.

### Pruebas de imagen

- Rx de tórax: masa parahiliar derecha.
- Ecografía abdominal: hepatomegalia de 20 cm y esplenomegalia de 24 cm (medidas en eje cráneo-caudal).
- TAC tóraco-abdominal: masa parahiliar derecha de 5 x 6 cm, adenopatías pretraqueales e hiliares, en espacio prevascular, subcarinales y retropectorales bilaterales. Se confirman hepato- y esplenomegalia y, además, se observan adenopatías en la raíz del mesenterio, cadena celiaca, retroperitoneo, retrocavas y ambas cadenas ilíacas.
- Ecocardiografía: FEV: 55% sin otros hallazgos destacables.

### Estudios citológicos e histológicos

- **Frotis sanguíneo:** serie blanca de aspecto normal. Discreta anisocitosis; *rouleaux*. Se confirma trombocitopenia. No se observan células atípicas.
- **Estudio de médula ósea (MO):**
  - Aspirado: celularidad abundante. Serie eritroide: 37% (con desviación izquierda). Serie mielóide inmadura: 5% de predominio mieloblas-

tos de tipo II, promielocito y promonocito. Serie mieloide semimadura y madura: 51%, de predominio mielocito- metamielocito. Eosinofilia moderada. Serie monocítica y SMF: 3%; a destacar la presencia de numerosas imágenes de hemofagocitosis apreciándose en el citoplasma de los macrófagos: hematíes, elementos nucleados de serie eritroide, elementos de serie granulocítica, monocitos y plaquetas (Figura 1). Serie linfocítica: 2% (heterogénea). Megacariocitos muy abundantes. Hierro reticular: abundante; sideroblastos 6% (tipos I-II). Conclusión: Hemofagocitosis. Se descarta infiltración por proceso neoplásico. Hemofagocitosis.

- Biopsia de MO: hiperplasia mieloide con muy discretos rasgos displásicos. Fibrosis reticulínica de grado I.

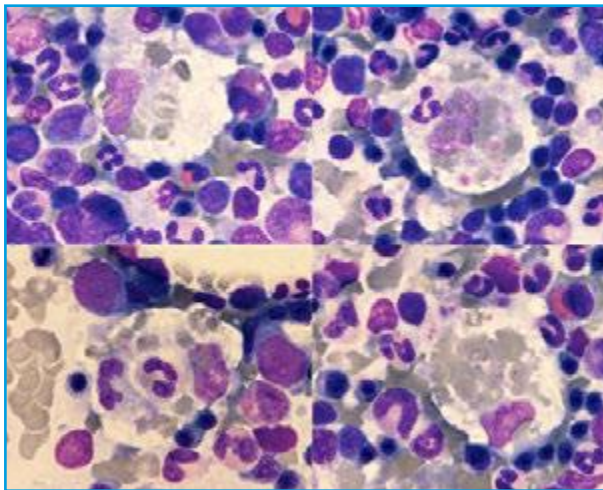


Figura 1. Aspirado de médula ósea en el que se observan imágenes de hemofagocitosis.

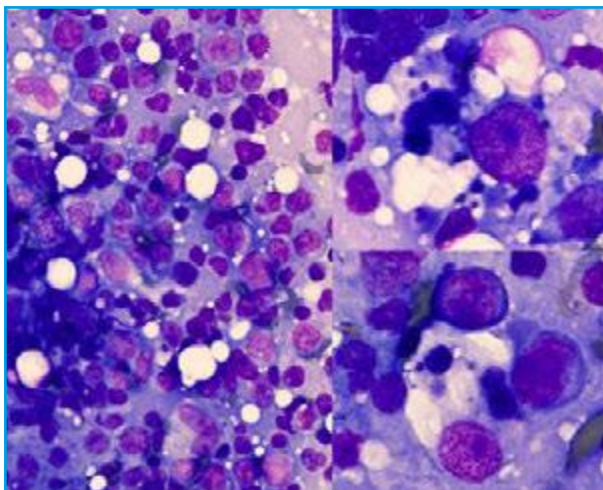


Figura 2. Impronta del ganglio linfático que muestra un infiltrado monomorfo por elementos linfoides y fenómeno de hemofagocitosis.

- Estudio inmunofenotípico: población linfocítica CD19+: 4,5%.
- Estudio citogenético: cariotipo 46,XY [30].

• **Biopsia transbronquial:** infiltrado denso y artefactado a expensas de células de hábito linfocítico positivas para CD20, CD79 y CD45. Compatible con infiltración por linfoma no Hodgkin B.

• **Estudio de ganglio linfático:**

- Improntas: celularidad abundante. Infiltración por linfocitos atípicos de tamaño heterogéneo (mediano/grande) y contorno nuclear irregular. En los de mayor tamaño destacan uno o más nucleolos de gran tamaño. Se observan macrófagos (“en cielo estrellado”) e imágenes de hemofagocitosis (Figura 2).
- Estudio histológico: borramiento de la arquitectura ganglionar por infiltración difusa polimorfa constituida por células grandes de hábito linfocítico acompañadas de abundantes histiocitos que forman pequeños pseudo-granulomas (Figura 3). Algunas de las zonas del ganglio están más conservadas y presentan un patrón de crecimiento vagamente nodular. Dichos nódulos están constituidos por una población similar a la observada en las áreas difusas.
- Inmunohistoquímica: células grandes CD20+, CD30+, MUM1+ y negativas para bcl6, CD10, bcl2, SOX11, EBER y LMP1. Ciclina D1 con positividad parcial (débil) y focal. Los marcadores CD23, CD35 y CD21 muestran hiperplasia de células foliculares dendríticas siguiendo un patrón peculiar, con presencia de estas células formando nódulos compactos en una parte del ganglio, mientras que en las zonas correspondientes a infiltración difusa existen numerosos elementos que no forman nódulos. Positividad T presente en compartimentos. Ki-67: 90%.

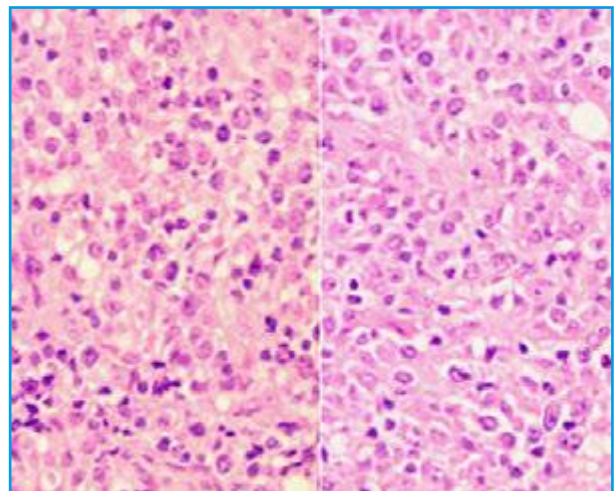


Figura 3. Estudio histológico del ganglio linfático que confirma el diagnóstico de linfoma.

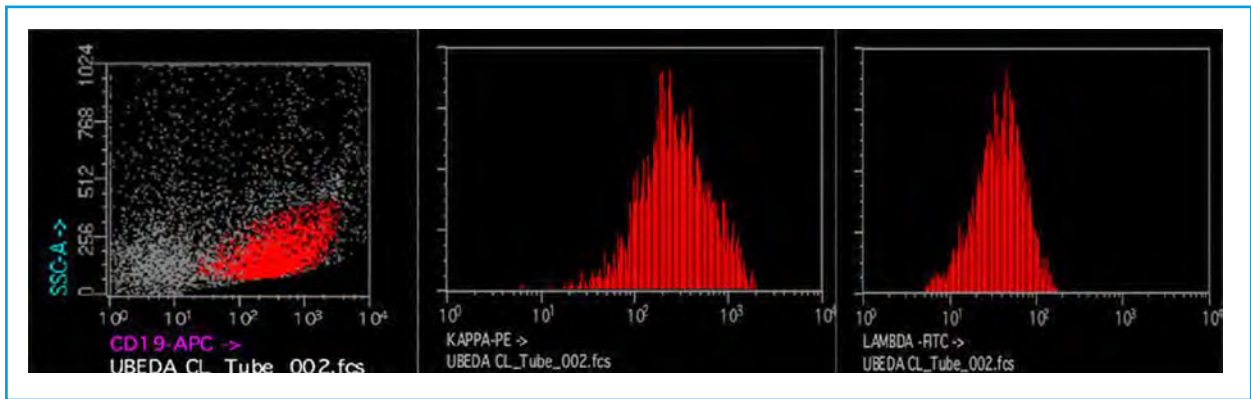


Figura 4. Estudio inmunofenotípico de la suspensión ganglionar con población CD19+ y monoclonalidad kappa.



Figura 5. Citogenética de suspensión ganglionar con cariotipo complejo.

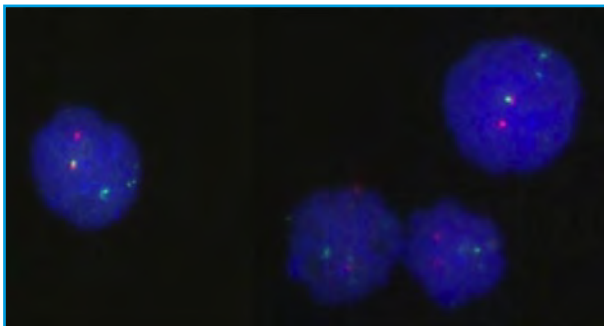


Figura 6. FISH en suspensión ganglionar donde se confirma el reordenamiento bcl1.

– Estudio inmunofenotípico de la suspensión ganglionar: CD19+: 52%. Estos elementos presentan fenotipo CD10+ débil, CD5-, CD20+, CD22+, CD81+, CD79b+, FMC7+ y monoclonalidad kappa (Figura 4).

- Citogenética de suspensión ganglionar: cariotipo 49, XY, +1, del(1)(p31), +4, del(6)(q21), -13, add(14)(q32), +mar1, +r [16] (Figura 5).
- FISH sobre células obtenidas a partir de la suspensión ganglionar: positividad para IgH (58%; sonda LSI IgH DCBA) y reordenamiento bcl1 (12% núcleos; sonda LSI IgH/CCND1 XT DCDF) (Figura 6). Estudios de bcl2, bcl6 y c-myc negativos. Todas las sondas de Vysis-Abbott.

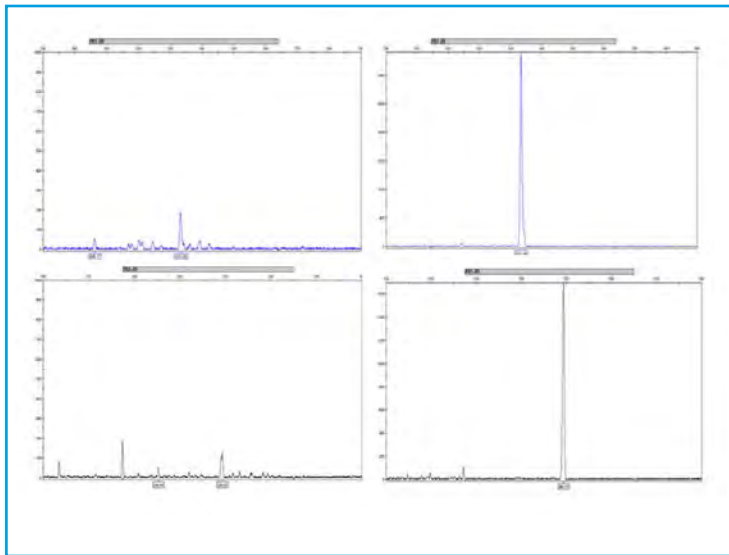
### Estudios moleculares

- MO: análisis del reordenamiento clonal del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas IgH: positivo para las regiones FR1-JH y FR2-JH.
- Suspensión ganglionar: idéntico reordenamiento del gen de la IgH en las regiones FR1-JH y FR2-JH (Figura 7). Análisis del reordenamiento clonal del gen TCR: negativo, tanto en MO como en ganglio linfático.

### Diagnósticos

- Linfoma no Hodgkin difuso de célula grande (LNH-DCG) de fenotipo B. Estadio IV-B (pulmón, hígado), IPI alto, cariotipo complejo en ganglio linfático y elevado índice proliferativo (Ki-67: 90%). Destaca la positividad parcial para bcl1 tanto por técnica inmunohistoquímica como por FISH.
- Síndrome hemofagocítico (linfohistiocitosis hemofagocítica).





**Figura 7.** Suspensión ganglionar y médula ósea: reordenamiento clonal del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas IgH: positivo para las regiones FR1-JH y FR2-JH (izquierda: médula ósea; derecha: ganglio).

## Evolución

Se inició tratamiento quimioterápico tipo CHOP-R con desaparición precoz de la sintomatología constitucional. Un TAC tóraco-abdominal tras finalizar seis ciclos objetivó la desaparición de la masa hilar y del resto de adenopatías, con la excepción de una de 1,5 cm en el territorio pretraqueal; ejes mayores de hígado y bazo: 12 y 14 cm, respectivamente. PET: ausencia de captación patológica. A consecuencia de los factores adversos al diagnóstico, el paciente fue consolidado en mayo de 2012 con un trasplante autólogo de precursores hematopoyéticos (TASPE), recibiendo acondicionamiento con esquema de tipo BEAM, presentando como complicaciones más relevantes mucositis de grado 3, fiebre con foco más probable en la mucositis y una eritrodermia generalizada de origen tóxico/medicamentoso. En la reevaluación del día +100 post-TASPE persistían criterios de respuesta completa, con ausencia de adenopatías en el TAC tóraco-abdominal salvo adenopatía pretraqueal sin cambios, y con nuevo PET sin captaciones anómalas.

## Discusión

El caso que nos ocupa tiene dos puntos de interés: a) El hallazgo de numerosas imágenes de hemofagocitosis con un cortejo clínico-biológico característico. b) El diagnóstico de linfoma difuso de célula grande de línea B con positividad parcial para bcl1 y, en conjunto, con un patrón histológico e inmunohistoquímico inhabitual.

El hallazgo de numerosas imágenes de hemofagocitosis en MO y en las improntas del ganglio linfático, así como la presentación clínica con fiebre y esplenomegalia, y biológica con pancitopenia, hipertrigliceridemia e hiperferritinemia hacen que el paciente presentara seis criterios aceptados para el diagnóstico de linfocitosis hemofagocítica<sup>(1)</sup> y que incluyen, además de los identificados en nuestro caso, hipofibrinogenemia, una actividad NK disminuida o ausente y un aumento de los niveles de CD25 soluble (> 2.400 UI/mL).

La linfocitosis hemofagocítica (LHH) es un síndrome de activación inmune anómala caracterizado por manifestaciones clínicas y biológicas de un estado proinflamatorio extremo. En la actualidad se consideran formas familiares, también denominadas primarias y esporádicas o secundarias, estas últimas ligadas a infecciones, neoplasias y enfermedades reumatológicas<sup>(1,2)</sup>.

La variante primaria se asocia a alteraciones genéticas o, en su defecto, presenta herencia familiar evidente y en estos casos existe un defecto de la actividad citotóxica. Entre las variantes con implicación genética evidente se han descrito mutaciones en PRF1, UNC13D, STX11, RAB27A, STXBP2, SH2D1A, XIAP y LYSY<sup>(3)</sup>. Estos casos se diagnostican habitualmente en niños, tienen un alto riesgo de recurrencia y son indicación de trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH). Su debut clínico se ha asociado a infecciones (CMV y EBV principalmente) y a vacunaciones, aunque en algunos casos no se detecta un desencadenante claro del cuadro.

Los casos secundarios se presentan en adolescentes o adultos con o sin historia familiar ni causa genética aparente. Se asocian a numerosas condiciones: a) infecciones: bacterianas, fúngicas, víricas (EBV, CMV, H1N1), leishmaniasis, etc.; b) enfermedades autoinmunes: artritis idiopática juvenil, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico y otras; en este grupo es de resaltar la importancia del diagnóstico diferencial de la LHH con el síndrome de activación macrofágica, una complicación letal de la artritis juvenil idiopática; c) neoplasias hematológicas: linfoma de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, fundamentalmente de línea T o NK, linfomas anaplásicos y leucemias agudas de línea B; en este grupo es de destacar la asociación de LHH, linfoma de Hodgkin e infección por EBV; d) tumores sólidos: sarcoma de Ewing, medulloblastoma y tumores germinales. Por último, no debemos pasar por alto que, aunque habitualmente los casos secundarios no son recurrentes, el riesgo real de recaídas no ha sido establecido y, de hecho, se han descrito recurrencias esporádicas<sup>(1,2)</sup>.

La asociación entre LHH y linfomas de línea B es poco frecuente; sin embargo, y aunque no está bien establecido, la hemofagocitosis parece relacionarse de manera más evidente con los linfomas intravasculares, un tipo poco frecuente de linfoma B extranodal de célula grande, que tiene unas características peculiares: 1) ausencia de linfadenopatías marcadas; 2) infiltración de órganos como la piel, el sistema nervioso central (SNC), la MO, los pulmones y otros; 3) comportamiento clínico muy agresivo; 4) presentación distinta según el área geográfica, de tal forma que la variante asiática suele cursar típicamente con síndrome hemofagocítico, y la variante europea u occidental suele afectar sobre todo a la piel y SNC<sup>(5)</sup>. Por todo ello, amén de una histología incongruente con dicho diagnóstico, la presencia de linfadenopatías generalizadas descartó este proceso en nuestro paciente. Por otra parte, en una excepcional serie de 7 pacientes con linfoma B difuso de célula grande y LHH<sup>(6)</sup>, se sugiere que la patogenia de la hemofagocitosis es una hipercitokinemia inducida por una proliferación de linfocitos T-CD8+. En ninguno de estos casos se detectaron anomalías moleculares, lo que hace nuestro caso aún más interesante.

Aunque se han publicado diversos casos aislados o series limitadas de LHH en el contexto de distintos tipos de linfomas B, no hemos encontrado en la literatura ningún caso con diagnóstico de linfoma del manto o implicación de *bcl1*. En este sentido, la segunda característica única del caso que nos ocupa además de la confluencia de los diagnósticos de LHH y LNH-DCG, es la positividad a *bcl1* por técnica inmunohistoquímica y por FISH. La ciclina D1 es parte de un complejo molecular que promueve la progresión de la fase G1 del ciclo celular, y su expresión desregulada participa probablemente en la carcinogénesis de diversas neoplasias sólidas y tumores hematológicos. Específicamente en los LNH-DCG, este hallazgo ha sido reportado previamente hasta en el 10% de casos, y más recientemente, y probablemente con mejor metodología, entre el 1,5% y el 4,5% de este subtipo histológico de linfomas<sup>(6,7)</sup>. Estos casos suelen presentar un patrón inmunohistoquímico propio de linfomas no centrogerminales CD10-/CD5-/*bcl6*+/*MUM1*+, y en ellos la negatividad de SOX11 es útil para confirmar la sospecha diagnóstica de NHL-DCG y descartar el diagnóstico de linfoma del manto, ya que este marcador es positivo en un 89% de los casos con este último diagnóstico<sup>(7)</sup>. Además, los estudios citogenéticos (cariotipo y FISH) son de utilidad en este contexto, ya que, en conjunto con los hallazgos inmunohistoquímicos, permiten establecer el diagnóstico diferencial entre la existencia de una *t(11;14)* u otras alteraciones numéricas o estructurales de 11q, e incluso de CCND1 propiamente, frente a la sobreexpresión de CCND1 de origen pos-

transcripcional. En este sentido puede ser de gran utilidad el análisis en paralelo, por una parte, con sondas de fusión que hibriden tanto la región IgH en 14q32 como la región CCND1 y que permitan determinar la *t(11;14)* y, por otra parte, con sondas del tipo *break apart* que, estudiando regiones centroméricas y teloméricas al punto de rotura habitual en 11q13, permiten detectar la existencia de reordenamientos de CCND1, aunque sin establecer el *partner* de su translocación<sup>(6)</sup>.

En nuestro caso, la positividad para *bcl1* por técnica inmunohistoquímica, aunque débil y focal, fue confirmada en dos laboratorios distintos mediante la utilización de dos anticuerpos monoclonales diferentes. El hallazgo de positividad parcial mediante una sonda de fusión IgH/CCND1 (Vysis, Abbott) y la ausencia de *t(11;14)* en el estudio cariotípico introducen un elemento más de interés en este caso.

En conjunto, éste es un LNH-DCG de línea B excepcional por la presencia simultánea de asociaciones inhabituales como el diagnóstico sincrónico de LHH en LNH-B DCG y la positividad parcial de *bcl1* y cuyo diagnóstico ha sido posible gracias al uso racional de un complejo arsenal de técnicas diagnósticas y a la implicación de hematólogos y patólogos.

### Para recordar

- La observación de hemofagocitosis florida en el estudio del aspirado medular debe conllevar un diagnóstico diferencial en el que han de considerarse diversas neoplasias hematológicas; entre éstas, las más frecuentes son los linfomas de línea T y, con menor incidencia, los de línea NK. Los linfomas de línea B, aunque raros en este contexto, siempre deben incluirse en el diagnóstico diferencial.
- Para el diagnóstico y la correcta categorización de los LNH-B difusos de célula grande se requiere una batería de técnicas de laboratorio entre las que deben incluirse de manera racional y progresiva: histología/citología, inmunohistoquímica/inmunofenotipo por técnica de citometría de flujo, citogenética (cariotipo y FISH) y estudios moleculares.

### Bibliografía

1. Jordan MB, Allen CE, Weitzman S, Filipovich AH, McClain KL. How I treat hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood* 2011; 118: 4041-52.
2. Weitzman S. Approach to Hemophagocytic Syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011;2011:178-83.
3. Meeths M, Entesarian M, Al-Herz W, Chiang SC, Wood SM, Al-Ateeqi W, et al. Spectrum of clinical presentations in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 5 patients with mutations in STXBP2. *Blood* 2010; 116: 2635-43.

4. Ferreri AJ, Dognini GP, Campo E, Willemze R, Seymour JF, Bairey O, et al.; on behalf of the International Extranodal Lymphoma Study Group (IELSG). Variations in clinical presentation, frequency of hemophagocytosis and clinical behavior of intravascular lymphoma diagnosed in different geographical regions. *Hematologica* 2007; 92: 486-92.
5. Yeh YM, Chang KC, Chen YP, Kao LY, Tsai HP, Ho CL, et al. Large B cell lymphoma presenting initially in bone marrow, liver and spleen: an aggressive entity associated frequently with haemophagocytic syndrome. *Histopathology* 2010; 57: 785-95.
6. Ehinger M, Linderth J, Christensson B, Sander B, Cavalin-Ståhl E. A Subset of CD5- Diffuse Large B-Cell Lymphomas Expresses Nuclear Cyclin D1 With Aberrations at the CCND1 Locus. *Am J Clin Pathol* 2008; 129: 630-8.
7. Hsiao SC, Cortada IR, Colomo L, Ye H, Liu H, Kuo SY, et al. SOX11 is useful in differentiating cyclin D1-positive diffuse large B-cell lymphoma from mantle cell lymphoma. *Histopathology* 2012; en prensa.
8. Miyahara M, Sano M, Shibata K, Matsuzaki M, Ibaraki K, Shimamoto Y, Tokunaga O. B-cell lymphoma-associated hemophagocytic syndrome: clinicopathological characteristics. *Ann Hematol* 2000; 79: 378-88.

## Caso 3

### Anemia, neutropenia y fiebre

A. PÉREZ MARTÍNEZ<sup>1</sup>, B. NAVARRO<sup>1</sup>, L. GARCÍA<sup>1</sup>, P. AMAT<sup>1</sup>, V. POSADAS<sup>2</sup>, F. MARES<sup>2</sup>, J. DONAT<sup>2</sup>, R. FERNÁNDEZ-DELGADO<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Servicio de Hematología; <sup>2</sup> Servicio de Pediatría.  
Hospital Clínico Universitario de Valencia

#### Motivo de consulta

Niño de 24 meses remitido a consultas externas de hematología y oncología pediátrica por bicitopenia.

#### Antecedentes personales

El niño procedía de una gestación y parto normales (peso al nacimiento: 3.500 g), y había sido alimentado básicamente, aunque no de forma exclusiva, con lactancia materna hasta el momento.

Antecedente de cuadros infecciosos típicos de la infancia: otitis media en 4 ocasiones, 3 episodios de conjuntivitis, frecuentes infecciones de las vías respiratorias superiores y un cuadro compatible con herpangina, todos ellos con una evolución clínica considerada normal.

La ganancia de peso había sido pobre, con peso en percentil 3 desde el primer mes de vida y talla entre los percentiles 25 y 50.

#### Historia clínica

Tras observar palidez cutánea en el examen rutinario a los 2 años de edad, su pediatra le solicitó un hemograma que mostró anemia macrocítica: Hb 80 g/L, VCM 94 fL y neutropenia: neutrófilos  $0,3 \times 10^9/L$ .

En ese momento, se decidió su ingreso para estudio de la bicitopenia y por síndrome febril asociado. Durante el ingreso se observó descenso de la cifra de plaquetas y desarrollo de una pancitopenia grave que precisó soporte transfusional. Las cifras de LDH llegaron hasta 7.000 U/L, y la de IgA hasta 3.200 mg/dL, con disminución del resto de inmunoglobulinas.

En dicho contexto, el paciente fue diagnosticado de una neumonía multilobar (LSD, LM y LID) con derrame pleural, motivo por el que se inició tratamiento antibiótico con vancomicina, ceftazidima, amikacina y fluconazol, además de efectuarse drenaje pleural y administrarse oxigenoterapia de alto flujo. Se objetivó buena respuesta al tratamiento con mejoría progresiva y una radiografía de control a los 7 días, que fue prácticamente normal.

Tras el episodio intercurrente se normalizó la cifra de neutrófilos, aunque persistía la anemia y la trombocitopenia con requerimiento transfusional frecuente tanto de plaquetas como de concentrados de hematíes. Se objetivó reaparición de la fiebre de manera intermitente, aumento de la hepatomegalia y aparición de esplenomegalia. A lo anterior, se asociaba aumento de la circulación cutánea abdominal, sin demostrarse alteración de la circulación portal por ecografía. Se instauró tratamiento empírico con prednisona a 2 mg/kg/día sin observarse mejoría.

#### Exploración física

Afectación del estado general y decaído, con palidez mucocutánea marcada, con cutis marmorata y frialdad acra. Escaso panículo adiposo. Temperatura: 39 °C, constantes normales.

Orofaringe hiperémica con mucosidad en *cavum*, sin exudado amigdalario. Otoscopia con tímpano derecho deslustrado y algo abombado, izquierdo normal. Adenopatías laterocervicales bilaterales. Hepatomegalia de 2 cm bajo el reborde costal. Resto de la exploración anodina.

#### Pruebas complementarias

*Hemograma:* Hb 75 g/L, VCM 94 fL, HCM 32,2 pg/mL, con reticulocitos: 3,2% (80.000/mm<sup>3</sup> absolutos), y leucocitos  $3,6 \times 10^9/L$ , neutrófilos  $0,60 \times 10^9/L$  (fórmula: Ne 16%, Li 59%, Mo 4%, Eo 10%). Plaquetas  $305 \times 10^9/L$ .

*Morfología de sangre periférica:* se objetivó anisocitosis con abundantes dacriocitos, esquistocitos y esfrocitos aislados (recuento: Ne 5%, Li 73%, Mo 8%, Eo 14%, y ausencia de células inmaduras).

*Bioquímica:* destaca una hipertransaminasemia: GOT 103 U/L (1-29) y GPT 150 U/L (1-27), con bilirrubina normal: total 0,8 mg/dL (0,1-1), directa 0,2 mg/dL (0,1-0,2). LDH aumentada: 1.455 U/L (240-480) y haptoglobina baja: 7,5 mg/dL (60-270). Cifras normales

de: vitamina B<sub>12</sub> 717 pg/mL (197-866), ácido fólico 4,8 ng/mL y metabolismo férrico: Fe 109 µg/dL (50-150), transferrina 288 mg/dL (200-360), IST 30%, ferritina 32 ng/mL (20-300). PCR 0,3 mg/L (0-5).

**Inmunoglobulinas:** marcado aumento de la IgA 1.284 mg/dL (25-75), con resto de inmunoglobulinas normales: IgM 30 mg/dL (30-80) e IgG 617 mg/dL (502-950), con subclases de IgG normales. Complemento normal.

**Microbiología:** serologías negativas para VHB, VHC, VIH, sífilis, parvovirus, VEB, CMV, sarampión, rubeola y parotiditis, así como *Leishmania*, *Salmonella*, *Bruceella*, *Bartonella henselae* y *Borrelia burgdorferi*. PCR negativa en plasma para VEB, parvovirus B19, y para TBC y enterovirus en LCR.

### Pruebas de imagen

**Ecografía cervical:** adenopatías cervicales bilaterales de aspecto inflamatorio, la mayor de las cuales posee un diámetro de 1,6 x 0,9 cm.

**Ecografía abdominal:** hepatoesplenomegalia homogénea, midiendo el bazo 8,8 cm de diámetro longitudinal máximo. Asas intestinales distendidas y paréti- cas con mínima cantidad de líquido entre ellas. Resto sin alteraciones.

**Test de Coombs directo:** negativo

**Estudio de anemia hemolítica no autoinmune:** dentro de la normalidad tanto los estudios enzimáticos (G-6PDH, piruvatoquinasa) como los de membrana (test de resistencia osmótica eritrocitaria) y la electroforesis de hemoglobinas.

**Mielograma:** médula ósea hipercelular con rasgos de dismegacariopoyesis en el 9% de los elementos (megacariocitos de núcleo mono- y bilobulado, algún núcleo disperso). La relación mieloeritroide estaba conservada. En la serie eritroblástica se identificaron todas las fases madurativas con desviación izquierda (33% de eritroblastos basófilos), y presencia de marcados rasgos de diseritropoyesis. Destacaban los rasgos macromegaloblásticos, con gigantismo celular, asincronismo madurativo, cromatina perlada, lobulaciones nucleares, punteado basófilo, cuerpos de Howell-Jolly, cariorrexis y mitosis anómalas. La serie granulopoyética representaba el 46% de la celularidad total, con evidencia de todos los estadios madurativos y rasgos megaloblásticos en el 60% de los elementos, con imágenes frecuentes de metamielocitos gigantes, asincronismo madurativo e hipersegmentación nuclear. Se observaron plasmocitos y alguna célula de Mott. Fenómeno de hemofagocitosis en < 2%. Tinción de Perls 87% sideroblastos (30% de tipo 1; 52% de tipo 2; 5% en anillo). Por técnica inmunohistoquímica el CD34 fue negativo.

Desde el punto de vista citológico las dismorfias observadas son características de una anemia me-

galoblástica, aunque los rasgos de dismegacariopoyesis no incluyen gigantismo ni hiperlobulación nuclear.

**Estudio citogenético (M-FISH):** cariotipo normal (46, XY [20]).

**Estudio molecular a partir del cultivo de fibroblastos:** mediante secuenciación de ADN complementario no se identificaron mutaciones en la región codificante del gen MTRR (CbIE) y del MMADH (CbLD variante 1) y TCN2 (transcobalamina II [TCII]), no pudiendo descartar la presencia de mutaciones en regiones no estudiadas del mismo.

**Inmunofenotipo:** el fenotipo inmunológico en sangre periférica descartó la presencia de poblaciones aberrantes, y el estudio de hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) no presentó anomalías.

**Determinación de ácidos orgánicos en plasma y orina mediante HPLC (cromatografía en fase líquida):** homocisteína elevada en plasma 32,8 µmol/L (< 7,5) y en orina 148 µmol/g creat. (< 20), metionina normal en sangre con excreción urinaria de ácido metilmalónico normal.

### Evolución

Ante la sospecha de una alteración en el metabolismo de la cobalamina por el hallazgo de homocisteinemia/homocistinuria, se comenzó tratamiento empírico con hidroxicobalamina (1 mg/i.m./24 h) y ácido fólico (1 mL/24 h) al tiempo que se iniciaba una disminución paulatina de la dosis de corticoides, a la espera del estudio genético. Se observó mejoría clínica del paciente con ganancia ponderal, normalización de la cifra de plaquetas y hemoglobina e independencia transfusional. Tres meses después del inicio del tratamiento se constató la normalización de la homocisteína en plasma, demostrándose la efectividad del tratamiento instaurado. Actualmente se encuentra en seguimiento periódico y continúa con tratamiento sustitutivo con hidroxicobalamina a dosis espaciadas.

El proceso de diagnóstico diferencial incluyó tanto hemopatías como enfermedades infecciosas, autoinmunes y carenciales. Se desestimaron las enfermedades de depósito y otros trastornos congénitos como el síndrome de Duncan, la anemia de Fanconi y el síndrome de Wiskott-Aldrich.

Se descartó tanto la anemia hemolítica de etiología inmune (Coombs directo negativo) como la debida a defectos enzimáticos del hematíe (G-6PDH, piruvatoquinasa) o de membrana (test de resistencia osmótica eritrocitaria normal).

### Diagnóstico

Anemia megaloblástica secundaria a un probable defecto genético en el metabolismo de cobalamina.

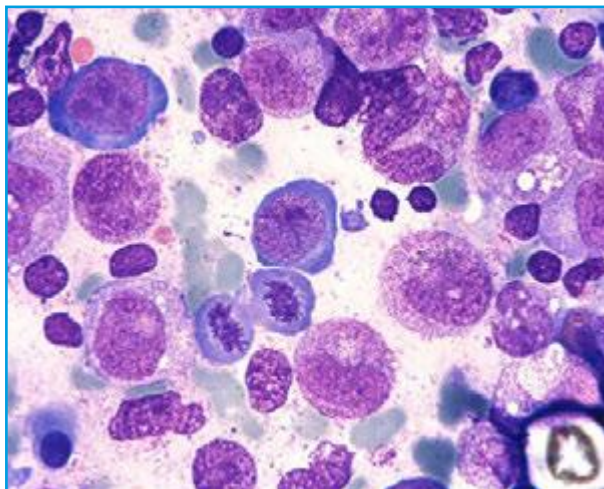
## Discusión

Los hallazgos morfológicos sugerían un síndrome mielodisplásico de tipo citopenia refractaria (RCC infancia), entidad poco frecuente (< 5% de las hemopatías en niños), o una anemia megaloblástica (a pesar de que los niveles de ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub> estaban dentro de los límites normales). La ausencia de blastos en el recuento medular y la evidencia de un cariotipo normal hacían poco probable el diagnóstico de un síndrome mielodisplásico de la infancia, por ello y ante lo llamativo de los rasgos megaloblásticos en el aspirado medular, se decidió ampliar el estudio de anemia megaloblástica sospechando una alteración del metabolismo de la cobalamina.

La anemia megaloblástica es la expresión de un trastorno madurativo de los precursores eritroides y mieloides, que da lugar a una hematopoyesis ineficaz, producto de la síntesis defectuosa del ADN con síntesis de ARN y proteínas normales, y cuya causa más frecuente es el déficit de vitamina B<sub>12</sub> y/o de ácido fólico. El aumento del contenido de ADN en las células se expresa en la morfología celular como núcleos grandes con cromatina laxa.

La vitamina B<sub>12</sub> o cobalamina desempeña un papel clave como coenzima en la síntesis de ADN y en la maduración celular, así como en la síntesis de mielina.

Respecto a su metabolismo y utilización (Figura 6), la metil-cobalamina es la forma activa de la cobalamina y actúa como coenzima de la metionina sintetasa (MTR), necesaria en la transformación de homocisteína en metionina. Esta reacción está acoplada a



**Figuras 1 a 5.** Morfología de aspirado de médula ósea: presencia de signos megaloblásticos con eritroblastos de gran tamaño y precursores eritroides con núcleo con cromatina laxa y de aspecto perlado. Gigantismo celular con alteración de la relación núcleo-citoplasma. Asincronía madurativa con precursores mieloides gigantes. Formas mitóticas presentes.

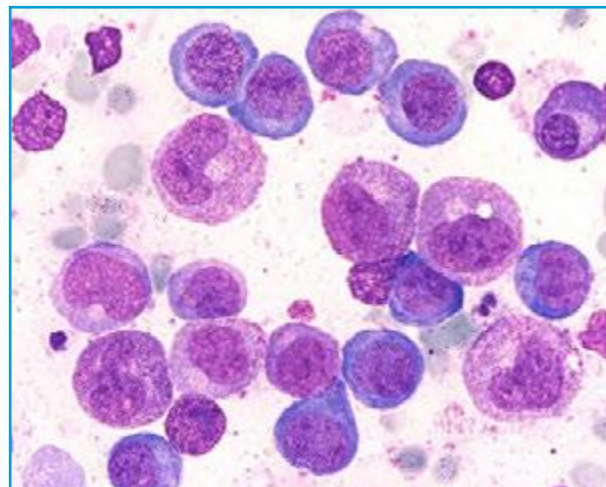
la generación de la forma activa de folato, cofactor indispensable en la síntesis de ADN. El déficit de cobalamina, al bloquear esta reacción, impide la síntesis de ADN y paralelamente, al no producirse metionina, se acumula la homocisteína, que se eliminará por la orina (homocistinuria). Puesto que la metionina es necesaria en la síntesis de S-adenosilmetionina (SAM), un metabolito que interviene en el mantenimiento de la mielina, el bloqueo de esta vía podría justificar las alteraciones neurológicas que a menudo acompañan al déficit de cobalamina.

El déficit de vitamina B<sub>12</sub> y/o ácido fólico se debe fundamentalmente a defectos en el aporte, metabolismo y utilización de los factores madurativos; y, si bien la causa más frecuente es el déficit de aporte, hay que valorar otras causas: tumores, tóxicos, o los trastornos congénitos del metabolismo.

Para llegar a un correcto diagnóstico es necesaria la cuantificación de los niveles plasmáticos de vitamina B<sub>12</sub> y ácido fólico, la determinación cuantitativa de ácidos orgánicos en suero y orina, siendo los de mayor importancia la homocisteína y el ácido metilmalónico; y es aconsejable el estudio genético molecular de los genes implicados en el metabolismo intracelular de la cobalamina.

Hay que señalar que la determinación sérica de vitamina B<sub>12</sub> tiene una alta tasa de falsos positivos y falsos negativos debido a la utilización de diversos métodos de medida y a la falta de estandarización entre los laboratorios<sup>(5)</sup>. Por todo ello, resulta difícil establecer el límite inferior para definir el déficit, y todavía no es posible garantizar la detección de todos los casos de deficiencia de cobalamina de etiología variable, incluido el déficit subclínico<sup>(4)</sup>.

Los trastornos relacionados con el metabolismo de la cobalamina pueden afectar a su absorción, su transporte o a su utilización. Los defectos de la absorción y el transporte incluyen: el déficit de factor



**Figura 2.** Véase el texto explicativo de Figura 1.

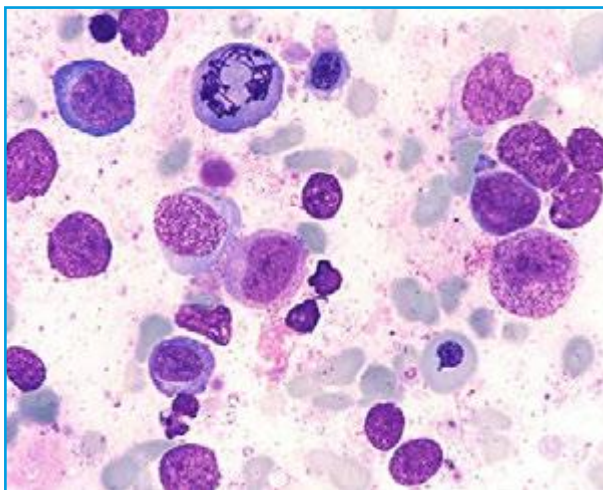


Figura 3. Véase el texto explicativo de Figura 1.

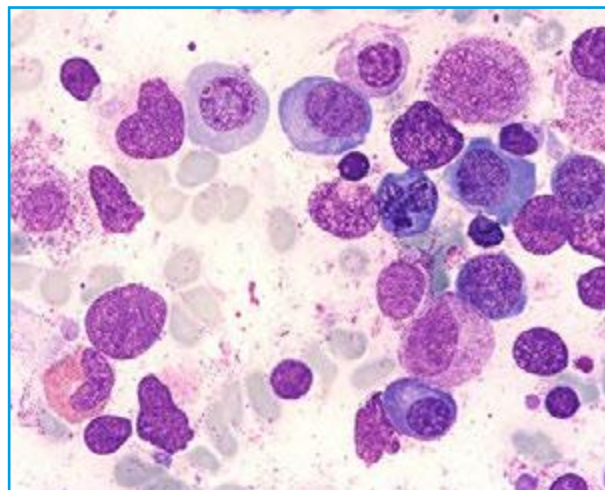


Figura 4. Véase el texto explicativo de Figura 1.

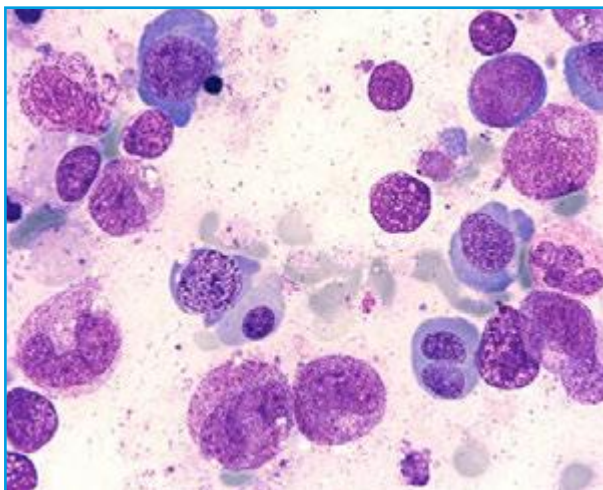


Figura 5. Véase el texto explicativo de Figura 1.

intrínseco (FI), del receptor ileal, de la haptocorrina y de la TCII. Las anomalías genéticas de la utilización de cobalamina son mucho más raras y su prevalencia real se desconoce.

La determinación de la homocisteína y/o el ácido metilmalónico en sangre y plasma es indispensable para clasificar el trastorno del metabolismo de la cobalamina, siendo en muchas ocasiones los niveles séricos de vitamina B<sub>12</sub> normales. En caso de defecto genético con homocisteinemia/homocistinuria, éste será debido a deficiencias parciales o totales de las enzimas implicadas en el metabolismo de la homocisteína CBS (cistatotina β sintetasa); MTHFR (metilentetrahidrofolato reductasa), implicada en el metabolismo del folato, y que cursan sin anemia, o las alteraciones del metabolismo intracelular de la cobalamina: MMACH (CbIC), MMADH (CbID), MTRR (CbIE), LMBRD1 (CbIF) y MTR (CbIG), sin olvidar los defectos congénitos en el transporte (FI y TCII) y la absorción de cobalamina (defecto del

receptor del complejo FI-cobalamina), que además presentan aciduria metilmalónica<sup>(3,14)</sup>.

Los avances en el diagnóstico molecular del metabolismo de la cobalamina han permitido la identificación de algunas mutaciones y polimorfismos en varios de los genes involucrados (Tabla 1 y Figura 6), que se traducen en:

- Defectos de remetilación de la homocisteína que impiden la síntesis de metionina: MTR (metionina sintetasa) (CbIG) y MTRR (metionina sintetasa reductasa) (CbIE). Cursan con hipometionemia/homocistinuria
- Defectos en la síntesis intramitocondrial de adenosil-cobalamina: MMAA (CbIA) y MMAB (CbIB) que presentan aciduria/acidemia metilmalónica.
- Deficiencia combinada de ambas vías MUT-MTR: MMACHC (CbIC), MMADHC (CbID) y LMBRD1 (CbIF).

Los trastornos de la función enzimática de MTR aislada o combinada MTR-MUT (metilmalonil-CoA mutasa) se acompañan de anemia megaloblástica, retraso en el crecimiento y, en ocasiones, de alteraciones neurológicas, y suelen mostrar una buena respuesta al tratamiento sustitutivo con cobalamina, si bien la clínica neurológica no siempre mejora con el tratamiento<sup>(4)</sup>. De hecho, ante la sospecha de una alteración genética a este nivel, se recomienda el tratamiento empírico con hidroxicobalamina intramuscular hasta que los resultados *in vitro* estén disponibles<sup>(9)</sup>. La deficiencia de MTR es una afección rara. El gen está localizado en el cromosoma 1 (1q43), mientras que el gen MTRR se encuentra en el cromosoma 5 (5p15.2-15.3). Se han descrito diversas mutaciones en ambos genes. Clínicamente presentan un inicio muy temprano, aunque algunos pacientes pueden no ser identificados hasta la edad adulta. Presentan gran variabilidad clínica, ambas cursan con anemia megaloblastica.

Tabla 1. Defectos enzimáticos en el metabolismo de la cobalamina

DEFECTO	GRUPO	GEN	FENOTIPO BIOQUÍMICO
Vía mitocondrial-ácido metilmalónico (MUT)	CblA	MMAA	Metilmalónico acidemia/aciduria
	CblB	MMAB	
Ambas (MUT/MTR)	CblC	MMACHC	Metilmalónico acidemia/aciduria Hiperhomocisteinemia/uria
	CblD	MMADHC	
	CblF	LMBRD1	
Vía metionina-homocisteína (MTR)	CblG	MTR	Hiperhomocisteinemia/Homocistinuria
	CblE	MTRR	

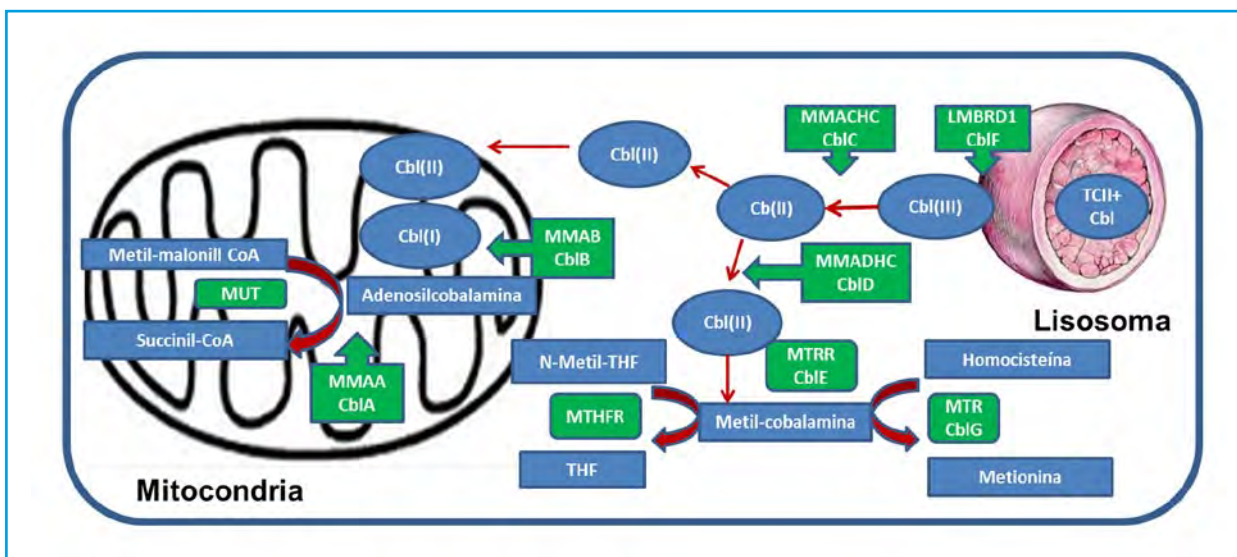


Figura 6. Metabolismo de la cobalamina. Fuente: modificado de R. Carmel<sup>(4)</sup>. Cbl: cobalamina; MTHFR: metiltetrahidrofolato reductasa; MTR: metionina sintetasa; MTRR: metionina sintetasa reductasa; MUT: metilmalonil-CoA mutasa; TCII: transcobalamina II.

blástica, y las manifestaciones neurológicas, que no siempre están presentes, pueden incluir debilidad, hipotonía, convulsiones y/o cambios en el estado mental. En el caso del defecto de MTR, en ocasiones se acompaña de trombofilia, síndrome hemolítico urémico (SHU), hipertensión pulmonar o atrofia del nervio óptico.

El suplemento con hidroxycobalamina intramuscular es la base del tratamiento. La cianocobalamina oral no es eficaz. Se recomienda un tratamiento precoz. Se aconseja la combinación con ácido fólico y betaína en los pacientes con CblG (MTR), puesto que la betaína aumenta la conversión de homocisteína a metionina no metionina sintetasa (MTR) dependiente. Aunque su papel ha sido cuestionado en los trastornos del metabolismo de la cobalamina intracelular, se requieren estudios adicionales para evaluar su eficacia.

Para el seguimiento, sobre todo en niños, se recomienda un control estrecho, con determinaciones analíticas una o dos veces al mes.

Respecto al pronóstico e historia natural de la enfermedad, existen limitaciones, ya que son pocos los casos descritos, muestran gran variabilidad clínica y no siempre se dispone de un diagnóstico molecular definitivo.

Los trastornos del metabolismo intracelular de la cobalamina suelen mostrar un patrón de herencia autosómica recesiva, siendo posible realizar consejo genético siempre que se identifique la mutación que origina el déficit enzimático. Actualmente en centros especializados es posible realizar un diagnóstico prenatal, enzimático y bioquímico mediante el cultivo de células amnióticas o de las vellosidades coriónicas.

En nuestro caso, a pesar de que las cifras de vitamina B<sub>12</sub> en suero eran normales, los rasgos morfológicos del aspirado medular altamente sugestivos de megaloblastosis orientaban el diagnóstico hacia una alteración del metabolismo de la cobalamina, que fue corroborado con la detección de la homocisteinemia con homocistinuria y niveles de ácido metilmalónico normales. Tras analizar las



rutas metabólicas implicadas, pensamos que el paciente tiene un déficit de metionina sintetasa MTR (CblG) o metionina sintetasa reductasa MTRR (CblE), si bien no ha sido posible identificar mutaciones en las regiones del gen estudiadas. Por todo ello, en base a los hallazgos morfológicos del aspirado medular, los parámetros bioquímicos y la respuesta al tratamiento empírico, podemos afirmar que el paciente probablemente padece un trastorno congénito en el metabolismo de la cobalamina, no siendo posible su clasificación al no identificarse la mutación responsable.

### Para recordar

- Ante la evidencia de rasgos megaloblásticos en el aspirado de médula ósea, es aconsejable la determinación de ácidos orgánicos en sangre y/u orina para detectar formas subclínicas de déficit de vitamina B<sub>12</sub> o defectos en su metabolismo, incluso aunque la cuantificación de vitamina B<sub>12</sub> y ácido fólico en suero sea normal.
- Los defectos congénitos del metabolismo de la cobalamina son entidades poco frecuentes, de herencia autosómica recesiva y de diagnóstico complejo. Su tratamiento se basa fundamentalmente en hidroxicobalamina intramuscular a dosis altas, teniendo en cuenta que las manifestaciones neurológicas a menudo no mejoran.
- El consejo genético es recomendable siempre que se conozca la mutación concreta. El diagnóstico prenatal es posible en laboratorios especializados.

### Bibliografía

1. Adams D, Venditti C. Disorders of intracellular cobalamin metabolism. *Gene Reviews*. 2008 Feb 25. PMID: 20301503 [PubMed]
2. Watkins D, Ru M, Hwang H, Kim C. Hyperhomocysteinemia due to methionine synthase deficiency, cblG: structure of the MTR gene, genotype diversity, and recognition of a common mutation, P1173L. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 143-53.
3. Quadros EV. Advances in the understanding of cobalamin assimilation and metabolism. *Br J Haematol* 2010; 148: 195-204.
4. Carmel R, Green R, Rosenblatt D, Watkins D. Update on cobalamin, folate, and homocysteine. *American Society of Hematology* 2003.
5. Stabler SP. Clinical practice. Vitamin B12 deficiency. *Stabler SP. New England Journal of Medicine* 2013; 368: 149-60.
6. Solomon LR. Disorders of cobalamin (vitamin B12) metabolism: emerging concepts in pathophysiology, diagnosis and treatment. *Blood Reviews* 2007; 21: 113-30.
7. Carmel R. Current concepts in cobalamin deficiency. *Annu Rev Med* 2000; 51: 357-75.
8. Watkins D, Rosenblatt DS. Lessons in biology from patients with inborn errors of vitamin B12 metabolism. *Biochimie* 2013; 95: 1019-22.
9. Whitehead V. Acquired and inherited disorders of cobalamin and folate in children. *British Journal of Hematology* 2006; 134: 125-36.
10. Bjørke Monsen AL, Ueland PM. Homocysteine and methylmalonic acid in diagnosis and risk assessment from infancy to adolescence. *Am J Clin Nutr* 2003; 78: 7-21.
11. Carmel R, Watkins D, Goodman SI, Rosenblatt DS. Hereditary defect of cobalamin metabolism (cblG mutation) presenting as a neurologic disorder in adulthood. *N Engl J Med* 1988; 318: 1738-41.
12. Hasle H, Niemeyer C. Advances in the prognostication and management of advanced MDS in children. *British Journal of Haematology* 2011; 154: 185-95.
13. Niemeyer C, Baumann I. Myelodysplastic syndrome in children and adolescents. *Elsevier* 2008. *Semin Hematol* 45: 60-70.
14. Vilaseca MA, Artuch R, Ramon F, Pineda M. *Química Clínica* 2007; 26: 191-5.

## Caso 4

### Paciente con bicitopenia y diseritropoyesis severa

A. MIGUEL<sup>1</sup>, M. ORERO<sup>1</sup>, R. COLLADO<sup>1</sup>, E. LUÑO<sup>2</sup>, D. IVARS<sup>1</sup>, C. VILLEGAS<sup>1</sup>, S. ORTIZ<sup>1</sup>, F. CARBONELL<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Servicio de Hematología. Centro de Diagnóstico Biomédico. Consorcio Hospital General Universitario de Valencia. Club Citológico de la Comunidad Valenciana y Murcia

<sup>2</sup> Servicio de Hematología. Hospital Universitario Central de Asturias. Oviedo

#### Historia clínica

Varón de 69 años estudiado en septiembre de 2009 por hallazgo intermitente de anemia normocítica normocromática (hemoglobinas entre 100 y 130 g/L) y trombocitopenia (plaquetas entre 90 y 144 x 10<sup>9</sup>/L) que fueron atribuidas a hepatopatía crónica alcohólica. En diciembre de 2012 acudió al servicio de urgencias por astenia, debilidad y disnea a moderados esfuerzos de 2 meses de evolución. Antecedentes personales de hipertensión arterial, alcoholismo crónico y cirrosis hepática alcohólica. En tratamiento con hierro de forma intermitente. Sin antecedentes familiares de anemia.

#### Exploración física

Palidez de la piel y las mucosas. Auscultación cardiorespiratoria normal. Esplenomegalia (2 cm por debajo del reborde costal). No adenopatías periféricas. Resto de la exploración dentro de la normalidad.

#### Pruebas complementarias

**Hemograma:** hemoglobina 41 g/L, VCM 90,5 fL, leucocitos 2,9 x 10<sup>9</sup>/L (neutrófilos: 2,2 x 10<sup>9</sup>/L; linfocitos: 0,38 x 10<sup>9</sup>/L; monocitos: 0,32 x 10<sup>9</sup>/L), plaquetas 59 x 10<sup>9</sup>/L. Reticulocitos 0,5 x 10<sup>9</sup>/L. Test de Coombs directo: negativo. VSG: 15 mm/h. Morfología de sangre periférica: hematíes con anisocitosis y poiquilocitosis moderadas; presencia de hipolobulación nuclear y/o hipogranulación citoplasmática en el 14% de los neutrófilos.

**Bioquímica:** creatinina: 1,02 mg/dL. GPT: 14 U/L. GOT: 19 U/L. GGT: 76 U/L. Fosfatasa alcalina: 68 U/L. Bilirrubina: 1,02 mg/dL. LDH: 572 U/L. Hierro: 155 µg/dL. Ferritina: 613 µg/L. IST: 59%. Vitamina B<sub>12</sub>: 118 pg/dL. Ácido fólico: 9,3 µg/L.

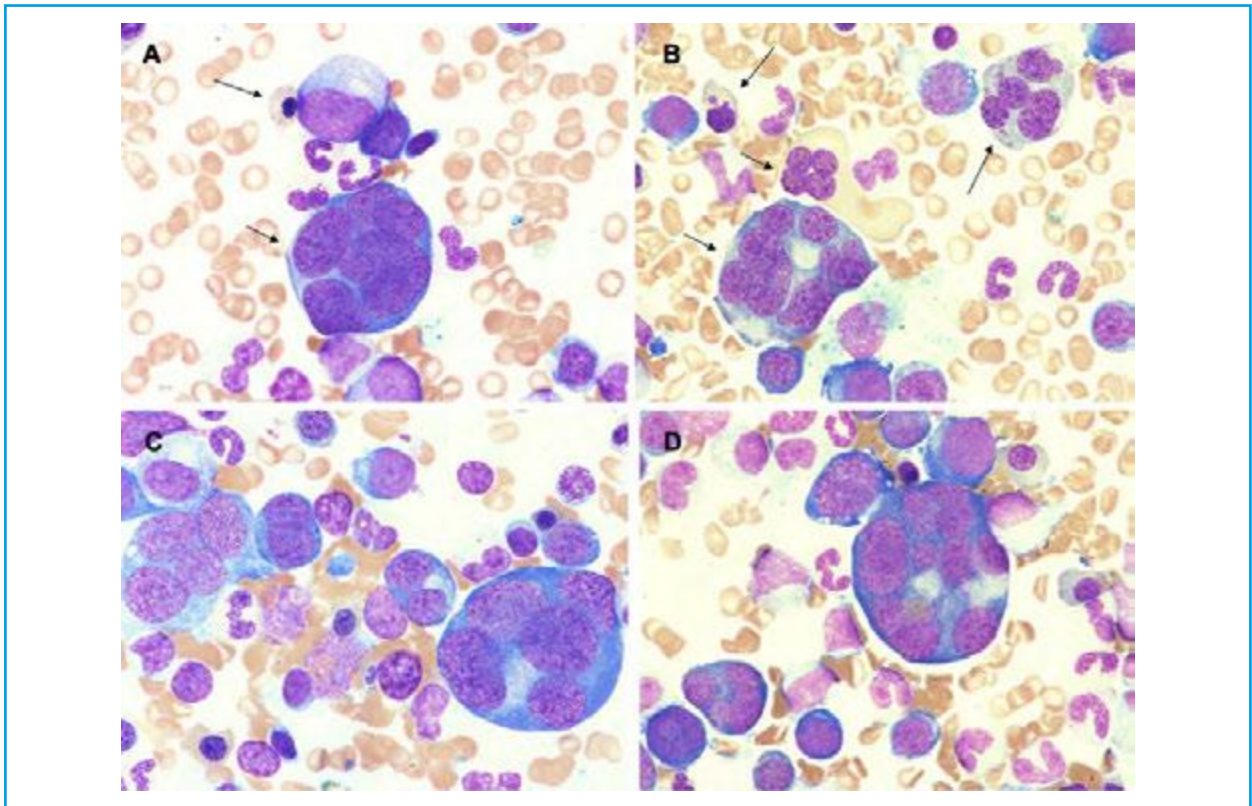
**Proteinograma:** normal. Hormonas tiroideas: normales. Serología vírica: hepatitis B (HBS Ag, anti-HBs y anti-HBc): negativo. Hepatitis C: negativo. VIH: negativo.

**Ecografía abdominal:** hígado de ecoestructura heterogénea compatible con hepatopatía crónica. Esplenomegalia de 15 cm con ecoestructura homogénea. La tomografía computarizada (TC) de abdomen demostró: hígado de tamaño normal con contornos abollonados y sin lesiones focales en su interior. Vena porta en el límite superior de la normalidad (13 mm). Esplenomegalia homogénea de 15 cm.

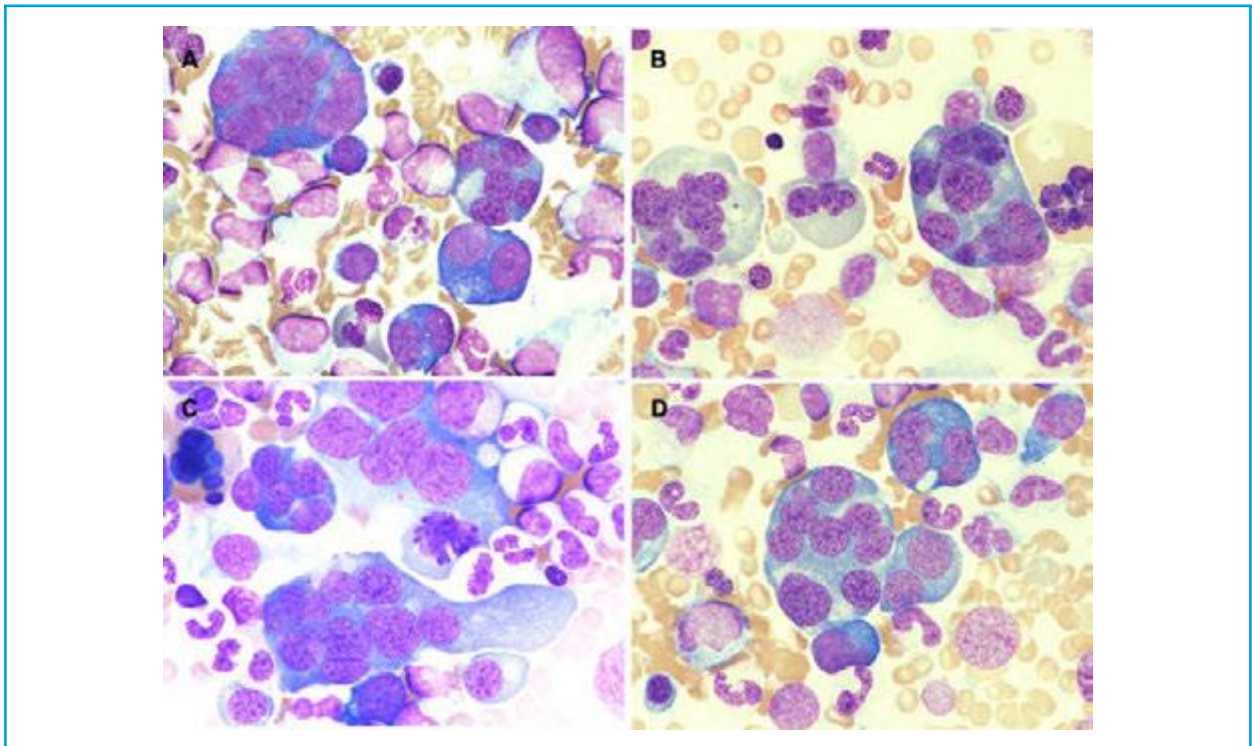
**Mielograma:** médula ósea (MO) muy hiperce-lular a expensas sobre todo de un aumento de la eritropoyesis (45% de la celularidad total). En los eritroblastos predominaban las formas inmaduras (proeritroblastos: 31%, eritroblastos basófilos: 44%, eritroblastos policromatófilos + ortocromáticos: 25%) mostrando rasgos megaloblásticos y diseritropoyéticos marcados, entre los que destacaban un 26% de formas gigantes con bi- o multinuclearidad (2 núcleos: 17%; 3 núcleos: 5%; 4 o más hasta 15 núcleos: 4%). Esta multinuclearidad se observaba en todos los estadios de maduración eritroide. Otros signos displásicos presentes en formas intermedias y maduras eran punteado basófilo citoplasmático, lobulación nuclear y cariorrexis (Figuras 1-3). Un 15% de la serie megacariocítica presentaba núcleos dispersos, hipo- o hiperlobulados y asincronismo madurativo núcleo/citoplasma. La disgranulopoyesis se observaba en un 18% de los elementos que mostraban hipolobulación nuclear, hipogranulación citoplasmática y gigantismo de forma ocasional (Figura 4). Presencia de un 2% de blastos con características morfológicas de línea mieloide.

**Citoquímica:** hierro de depósito aumentado. 82% de sideroblastos: anillados (40%) y tipo III (42%). Un 32% de los eritroblastos presentaban PAS positividad con distribución difusa o en mazacotes (Figura 5).

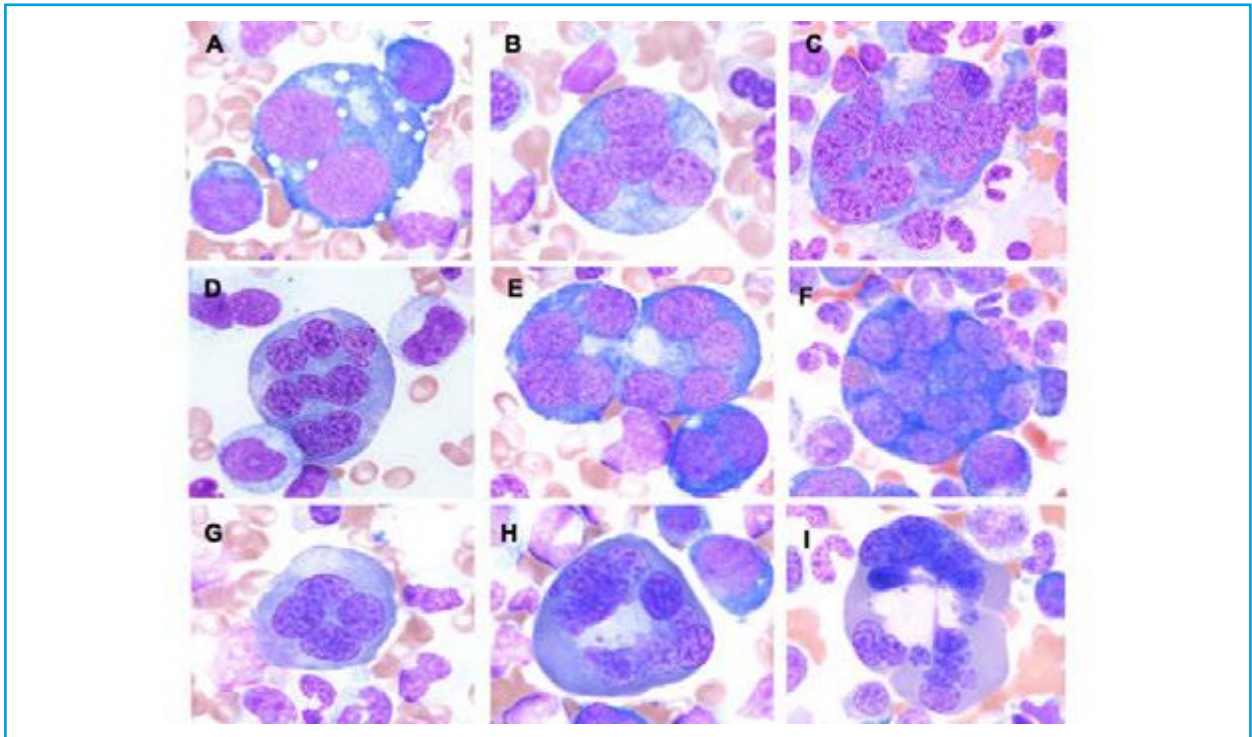
Ante el cuadro de diseritropoyesis severa, en la que destacaba la megaloblastosis con abundantes gigantoblastos multinucleados junto a displasia ligera en las otras dos series hematopoyéticas y, además, una bicitopenia, que podría también justificarse por el cuadro de hepatopatía crónica del paciente, nos planteamos



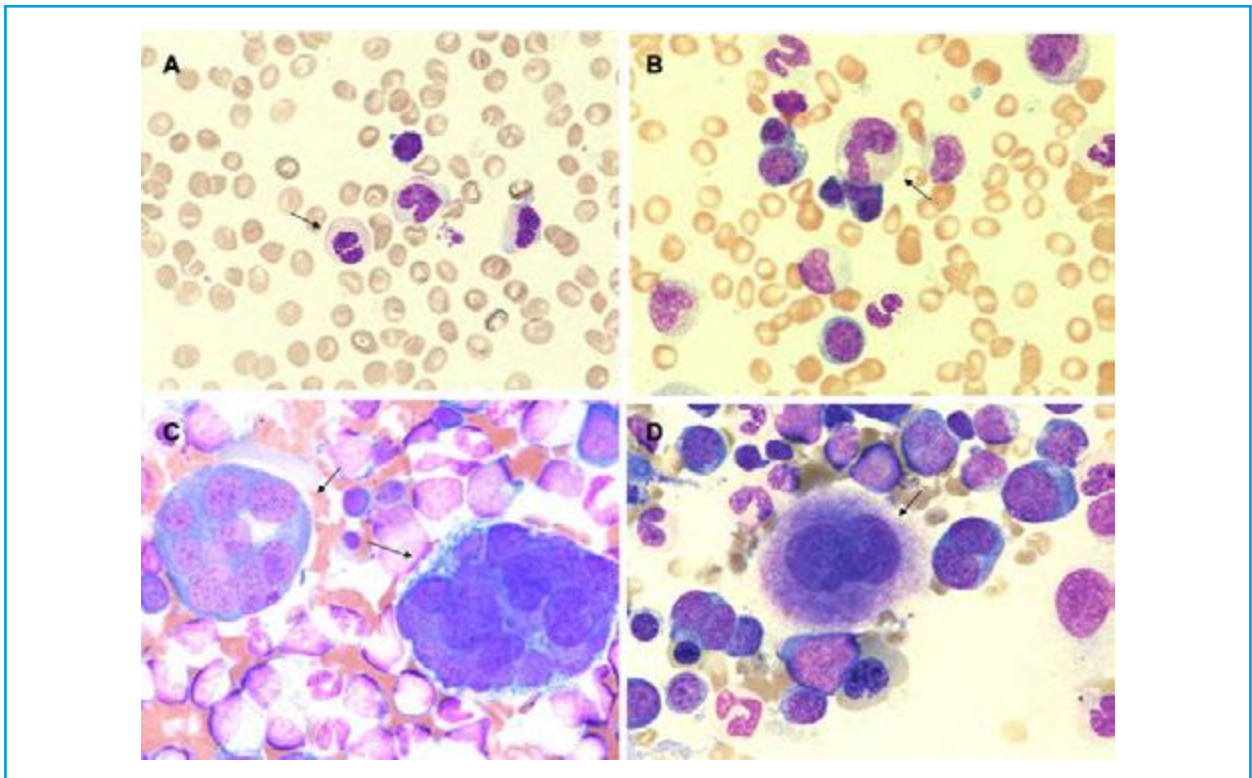
**Figura 1.** Aspirado de médula ósea (May-Grünwald-Giemsa). **A:** Eritroblasto basófilo gigante multinucleado (flecha corta). Eritroblasto ortocromático con punteado basófilo y núcleo picnótico (flecha larga). **B:** Eritroblastos gigantes multinucleados en diferentes fases de maduración (flecha corta). Eritroblastos policromatófilos con apéndice nuclear y fenómenos de cariorrexis (flechas largas). **C y D:** Varios proeritroblastos y eritroblastos basófilos gigantes multinucleados.



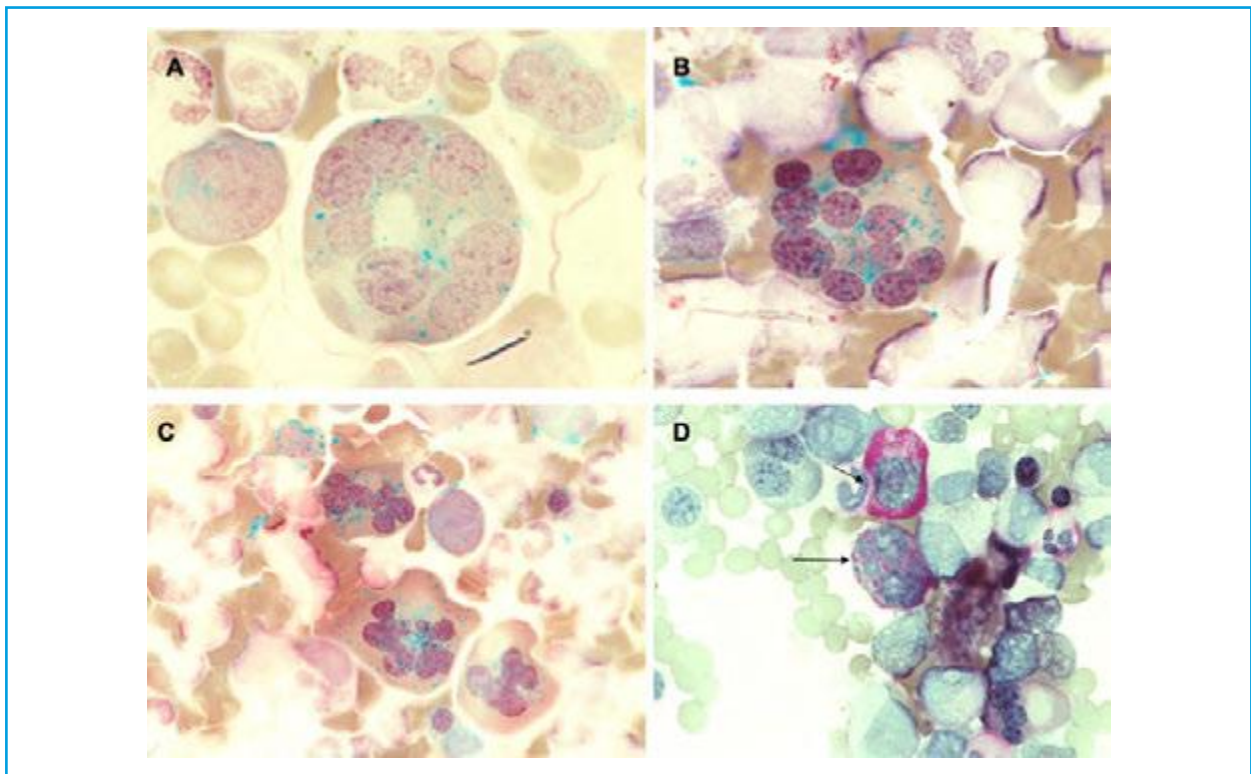
**Figura 2.** Aspirado de médula ósea (May-Grünwald-Giemsa). **A-D:** Varios eritroblastos gigantes multinucleados en diferentes fases de maduración.



**Figura 3.** Aspirado de médula ósea (May-Grünwald-Giemsa). **A:** Proeritroblasto binucleado con rasgos megaloblásticos y vacuolas citoplasmáticas. **B-G:** Eritroblastos basófilos gigantes y multinucleados. **H-I:** Eritroblastos policromatófilos multinucleados y con alteración en la distribución de la hemoglobina.



**Figura 4.** Sangre periférica (May-Grünwald-Giemsa). **A:** Neutrófilo con hiposegmentación nuclear e hipogranulación citoplasmática. Aspirado de médula ósea (May-Grünwald-Giemsa). **B:** Cayado neutrófilo gigante. **C:** Proeritroblasto gigante multinucleado (flecha corta). Megacariocito con hiperlobulación nuclear y asincronismo madurativo núcleo/citoplasma (flecha larga). **D:** Megacariocito con núcleo hipolobulado.

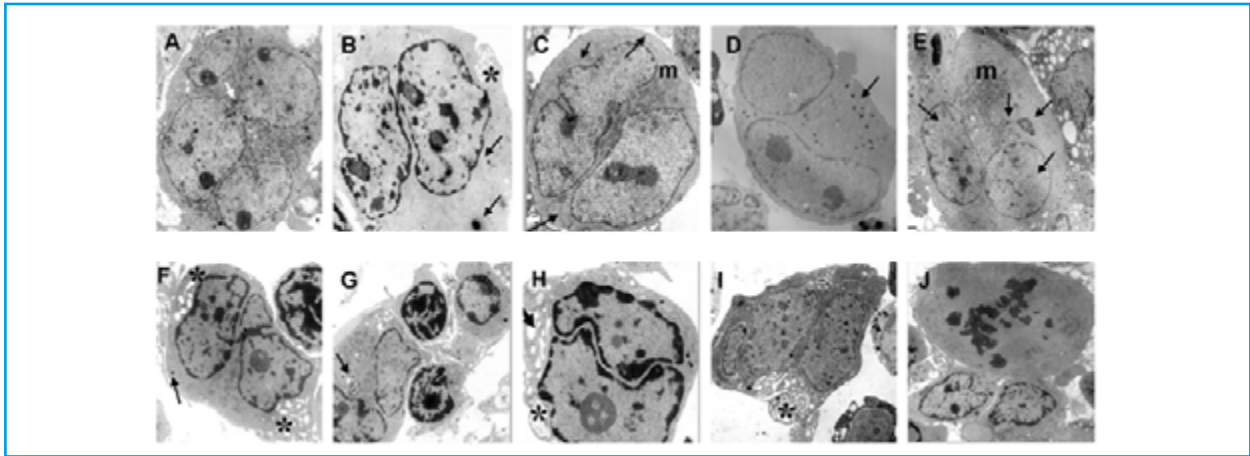


**Figura 5.** Citoquímica en médula ósea. **A-C:** tinción de Perls. Eritroblastos con acúmulo patológico de hierro. **D:** tinción de PAS. Eritroblastos mostrando glucógeno citoplasmático con distribución difusa (flecha corta) y en mazacotes (flecha larga).

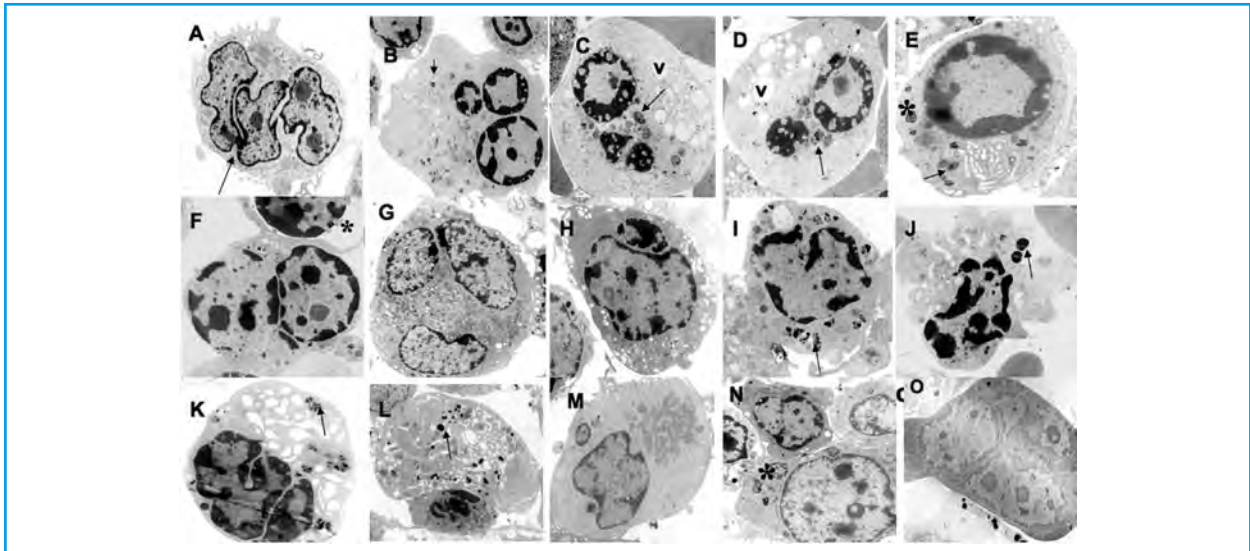
un diagnóstico diferencial entre anemia megaloblástica, neoplasias eritroides agudas, síndrome mielodisplásico y anemia diseritropoyética congénita (ADC) de tipo III. Como el paciente presentaba un déficit leve de vitamina B<sub>12</sub>, se le administró esta vitamina por vía parenteral hasta normalizar sus cifras, sin que se modificaran las citopenias ni cambiaran los hallazgos morfológicos en un segundo estudio de MO. Para completar el diagnóstico diferencial realizamos las siguientes exploraciones complementarias.

*Ultraestructura en MO mediante microscopía electrónica de transmisión (MET):* hiperplasia eritroblástica (62%) con clara desviación izquierda (20% proeritroblastos, 18% eritroblastos basófilos y 24% eritroblastos tardíos). Desde el estadio de proeritroblasto, el gigantismo y la multinuclearidad, ya constatadas en microscopía óptica, eran la característica dominante: 12% de los eritroblastos eran formas binucleadas, 4% trinucleadas, y 4% tetranucleadas. Aisladamente pudo identificarse alguna forma con más de 4 trozos nucleares. En las formas bi-, tri- y tetranucleadas, los trozos nucleares con frecuencia eran de diferente tamaño y estaban en distinto estadio de maduración. Los proeritroblastos y eritroblastos basófilos, identificados por su citoplasma electrón-denso peroxidasa-like por la hemoglobina y/o por su morfología ultraestructural, presentaban intensos rasgos megaloblásticos, núcleos con abundante eucromatina y nucléolos de gran

tamaño en algunos de ellos. Los marcados rasgos diseritropoyéticos no se circunscribían sólo al núcleo, sino que también, desde el estadio de proeritroblasto, las anomalías citoplásmicas eran notables. En el citoplasma, fue posible identificar algunos depósitos de micelas ferruginosas intramitocondriales, trazos de “doble membrana” citoplásmica y alguna figura mielínica (Figura 6). Las células eritroblásticas más maduras exhibían núcleos con contorno irregular en un 22% (en ocasiones en balón de rugby), con cromatina “en esponja” o “queso suizo” en un 6%, intensas irregularidades y hendiduras nucleares, aumento de los poros nucleares en general sin rotura de la membrana, así como marginación y condensación periférica de la cromatina de tipo apoptótico. En el citoplasma de estas células más maduras, las anomalías incluían doble membrana citoplásmica (12%), con frecuencia muy hipertrofiada, formando bucles periféricos, depósitos de micelas ferruginosas intramitocondriales (42,3%), PAS positividad eritroblástica en el 24% y coexistencia de sideoacrestia con PAS positividad en 10%. Las partículas de glucógeno se disponían formando pequeños acúmulos, pero también mazacotes. Un 16% de las formas semimaduras y maduras tenían vacuolas citoplásmicas y, ocasionalmente, áreas vacías de glucógeno extraído por el procesamiento (Figura 7). En la serie mieoide madura se observaban rasgos disgranulopoyéticos, hipo/agranularidad en un 24%, núcleos



**Figura 6.** **A:** Proeritroblasto de gran tamaño, con tres núcleos de talla desigual con abundante eucromatina y nucléolos evidentes. El núcleo central, que es el de mayor tamaño, tiene forma de diábolo (flecha). En el citoplasma, trazos de “doble membrana”. Doble contraste. Magnificación original x 8 k. **B y F:** Proeritroblastos megaloblásticos binucleados. Siderosomas (flechas). Membranas que forman bucles periféricos (\*) x 10 k y 12 k. **C:** Las mitocondrias se disponen entre los dos trozos nucleares (m); a la derecha gran nucléolo y trazos de “doble membrana” citoplasmática dispuestos de forma irregular alrededor del núcleo (flecha) x 12 k. **D:** Proeritroblasto binucleado con mitocondrias de pequeño tamaño que ya contienen micelas ferruginosas (flecha). Reacción de peroxidasa, sin contrastar x 10 k. **E:** Eritroblasto con cuatro trozos nucleares (flechas) en diferentes estadios de maduración. Acúmulo de mitocondrias (m) en el área de Golgi. Doble contraste x 10 k. **G:** Proeritroblasto con figura mielínica (flecha) x 10 k. **H:** Eritroblasto binucleado semimaduro con áreas de glucógeno extraído (\*) y “dobles membranas” dilatadas (flecha) x 20 k. **I:** Eritroblasto con tres núcleos de diferente tamaño y abundante contenido de hemoglobina (Px-like). Trazos de “doble membrana” dispuestos en la periferia citoplásmica, ligados a la membrana nuclear, o formando grandes bucles periféricos como en la ADC de tipo II (\*) x 8 k. **J:** Mitosis gigante de eritroblasto x 8 k.



**Figura 7.** **A:** Eritroblasto semimaduro con tres trozos nucleares de contorno irregular, dos de ellos unidos por un ancho puente de heterocromatina (flecha). Doble contraste x 10 k. **B-E:** Eritroblastos tardíos con uno, dos y tres núcleos, que muestran características de ADC de tipo I, núcleos de diferente tamaño con marginación y condensación de la cromatina que refleja el estadio inicial de la apoptosis. Cromatina en “esponja” o “queso suizo” y aumento de poros nucleares sin rotura. En el citoplasma, mitocondrias con micelas ferruginosas que han destruido las crestas mitocondriales (flechas), vacuolas citoplásmicas (v) y acúmulos de glucógeno (\*). **F:** Eritroblasto semimaduro binucleado. El trozo nuclear de la izquierda muestra grandes poros nucleares y discontinuidad de la membrana, lo que permite que se mezclen material nuclear y citoplásmico. El eritroblasto de arriba, visible sólo de forma incompleta, muestra dilatación y despegamiento de la membrana nuclear (\*). **G-H:** Eritroblastos tri- y bi-nucleados x 10 k y 12 k. **J-L:** Eritroblastos tardíos con hendiduras e irregularidades nucleares y sideroacrestia. Las flechas señalan grandes depósitos de hierro intramitocondrial. **M:** La gran porción de citoplasma eritroblástico refleja el gigantismo celular. **N:** Gran acúmulo de glucógeno en un eritroblasto inmaduro (\*) x 12 k. **O:** Eritroblasto multinucleado. Reacción de peroxidasa x 15 k.

mono- y bilobulados en el 21%, y en el 4% asincronías madurativas (Figura 8). Entre los pocos megacariocitos analizados, se vieron algunas formas mono- o bilobuladas y un 1% de micromegacariocitos positivos para la peroxidasa plaquetaria. Eran frecuentes los macrófagos con fagocitosis de detritus celulares y alguna imagen de eritrofagocitosis.

**Inmunofenotipo en MO:** La pequeña proporción de blastos (2%) tenía un perfil inmunológico de célula de línea mieloide inmadura CD45 + débil, CD117 +, HLA-DR +, CD13 +, CD33 +, CD71 +, diferenciándose dos subpoblaciones por la intensidad de positividad para CD34: CD34 + (40%) y CD34 ++ (60%), esta última con positividad además para CD11b y CD4, lo que orientaba a una diferenciación monocítica. La celularidad eritroide fue positiva para CD36 y CD71, y negativa para la glicoforina.

**Cariotipo en MO:** 46,XY[20]. Hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en MO: empleando las sondas LSI *MLL* (11q23) y LSI *BCL-1*(11q13)/CEP11 se observaron, en el 28% de las células, entre 3 y 7 copias del cromosoma 11 sin reordenamiento ni delección del mismo. Con la sonda LSI 5q *EGR/D5S23/D5S721* se evidenció delección 5q31 en un 26% de los núcleos analizados (Figura 9). El estudio de trisomía 8, delección 7q31/-7, delección *TP53* (17p13.1) y delección 20q12 fue negativo.

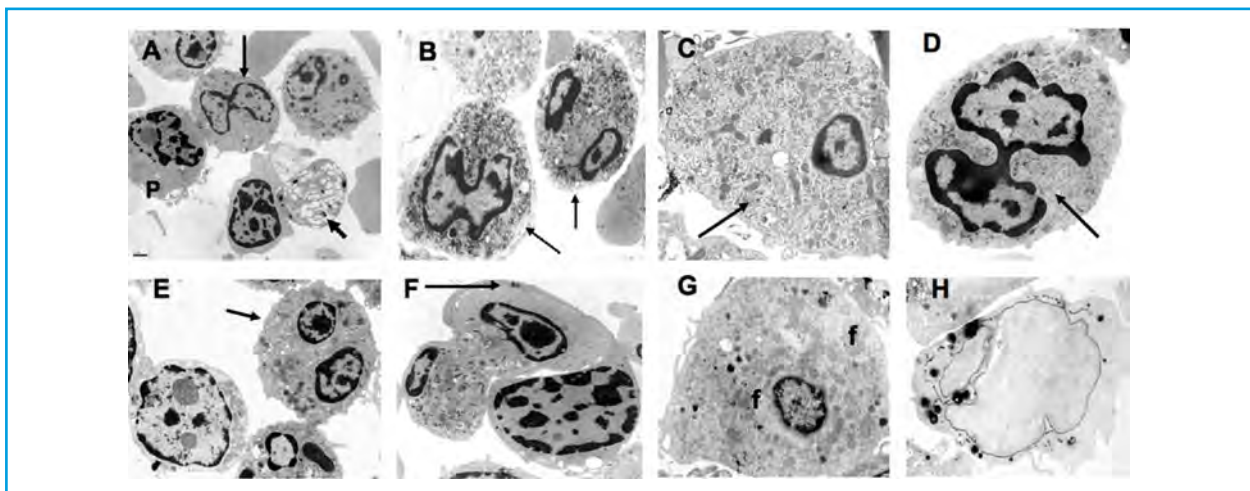
## Diagnóstico

Síndrome mielodisplásico de tipo citopenia refractaria con displasia multilineal de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

## Discusión

Los rasgos megaloblásticos con presencia de eritroblastos gigantes y la multinuclearidad forman parte del grupo de alteraciones morfológicas que reflejan diseritropoyesis en diferentes patologías eritroides. El término diseritropoyesis, independientemente de la causa que lo origine, implica un trastorno selectivo durante el proceso de maduración de la eritropoyesis, y su consecuencia son las anomalías morfológicas de los precursores eritroblásticos y un defecto en la producción de eritrocitos. La diseritropoyesis es un hallazgo común en enfermedades hereditarias y adquiridas, lo que, unido a su variabilidad en la expresión morfológica, puede dificultar el diagnóstico. Sin embargo, la concurrencia en la misma célula eritroide de gigantismo y multinuclearidad, lo que se ha denominado gigantoblastos, es un hallazgo poco frecuente en la diseritropoyesis en general, excepto en las ADC, principalmente en la de tipo III, donde la presencia de eritroblastos gigantes multinucleados es un hallazgo constante similar a la fase regenerativa de la aplasia pura eritroide por parvovirus B<sub>19</sub>, que define las alteraciones morfológicas de la enfermedad<sup>(1-4)</sup>.

Se presenta el caso de un paciente con antecedentes de anemia y trombocitopenia moderadas atribuidas a alcoholismo y hepatopatía crónicas que, de forma brusca, sufrió una anemización severa. El estudio morfológico de MO demostró la presencia de hiperplasia eritroide con rasgos megaloblásticos y diseritropoyesis marcada, destacando abundantes eritroblastos gigantes con multinuclearidad. Las series mieloide y megacariocítica presentaban rasgos



**Figura 8.** A: Neutrófilo hipogranulado (flecha). Reticulocito con membranas dilatadas y hierro intramitocondrial (flecha corta). Célula plasmática (P). Doble contraste x 8 k. B-E: Serie mieloide madura degranulada (flechas). En B, citoplasma con abundantes partículas de glucógeno, aisladas o en pequeños grupos, y solo algún gránulo aislado x 15 k. E: Núcleo bilobulado (flecha) x 10 k. F: Un eritroblasto con hierro intramitocondrial (flecha), engloba en su citoplasma un neutrófilo sin internalizarlo. G: Neutrófilo monolobulado y degranulado con grandes haces de microfilamentos (f). H: Blasto MOP-positivo en cisterna perinuclear, retículo endoplásmico y gránulos. Reacción de peroxidasa. Método de Breton-Gorius. Sin contrastar, x 15 k.

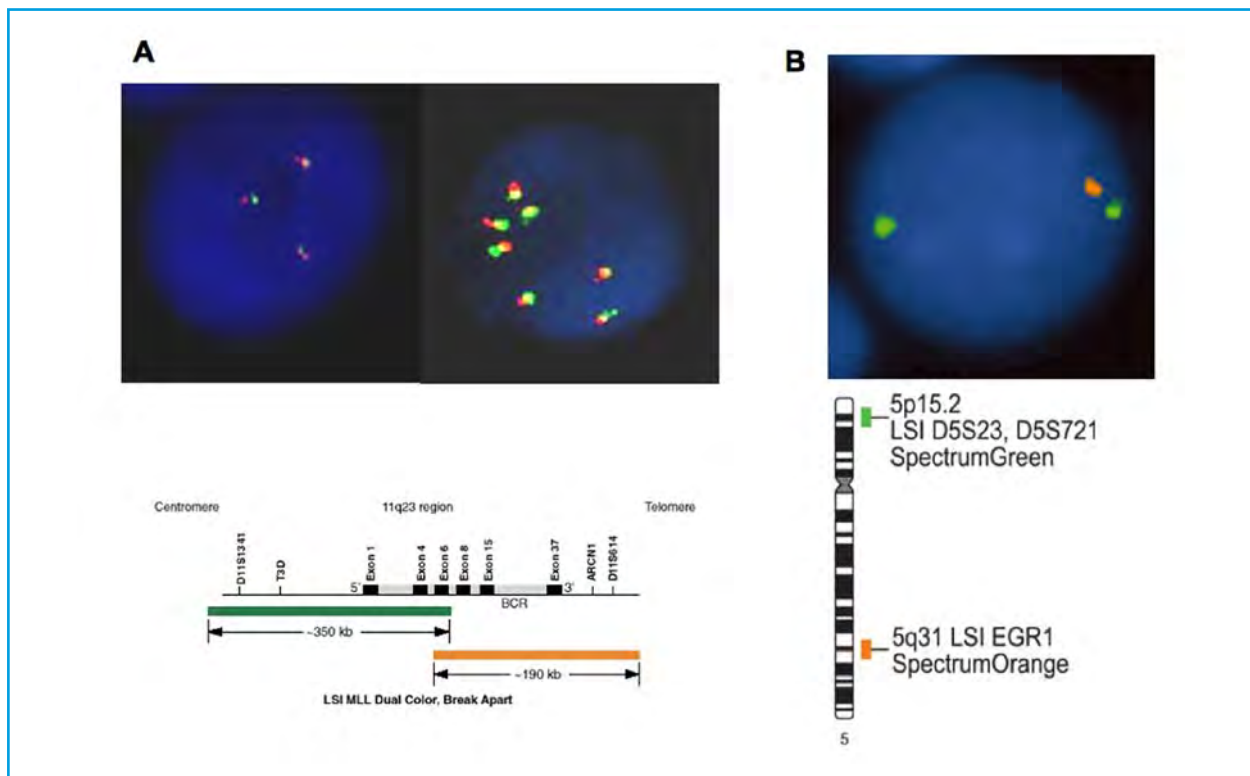


Figura 9. FISH en interfase. A: Múltiples copias no reordenadas del gen *MLL* (11q23). B: Delección 5q31.

displásicos en un número poco elevado de sus elementos. Con estos hallazgos morfológicos nos planteamos un diagnóstico diferencial entre las patologías que pueden cursar con diseritropoyesis marcada, fundamentalmente la anemia megaloblástica, las neoplasias eritroides agudas, el síndrome mielodisplásico y la ADC. Otras patologías que pueden producir cierto grado de diseritropoyesis son, entre otras, la ingesta crónica de alcohol<sup>(5)</sup> que, estando presente en nuestro caso, se descartó como entidad responsable ya que la intensidad de la displasia eritroide que provoca suele ser moderada, aunque no se puede descartar que tuviese un efecto sumatorio en la displasia. El déficit de vitamina B<sub>12</sub> como causa de la megaloblastosis se eliminó también al no corregirse la anemia tras su tratamiento. Por otra parte, y siguiendo los criterios de la OMS de 2008<sup>(6)</sup>, el número de eritroblastos y de blastos mieloides en MO no se ajustaba a los valores requeridos para el diagnóstico de leucemia aguda eritroide, por lo que se descartaron estas patologías.

La ADC de tipo III es una entidad muy poco frecuente de la que se han descrito casos familiares con diferentes patrones de herencia y casos esporádicos con probable herencia autosómica recesiva o bien por mutación espontánea dominante<sup>(7-8,19)</sup>. Hasta el momento, sin embargo, sólo tres familias descritas cumplen los criterios de ADC de tipo III, ya que otros casos esporádicos publicados no han sido definitivamente incluidos en este grupo<sup>(9)</sup>. Esta enfer-

medad se caracteriza por presentar una anemia hiporegenerativa moderada de curso relativamente benigno, lo que permite, en la mayoría de los casos, alcanzar la longevidad. El hallazgo morfológico que la caracteriza es la diseritropoyesis marcada, con presencia de abundantes gigantoblastos con hasta 10 o más núcleos, como observábamos en nuestro paciente<sup>(1-3,10)</sup>. Por todo ello, esta opción diagnóstica se tomó en consideración. La ADC de tipo III no presenta normalmente displasia de las otras dos series hematopoyéticas, por lo que la presencia de algunos signos displásicos en las series mieloide y megacariocítica podría descartar el diagnóstico de ADC de tipo III. Sin embargo, el hecho de que en personas sanas y en pacientes con enolismo crónico se puedan encontrar rasgos displásicos con cifras algo superiores al 10%, lo que marca la OMS como cifra de corte en cada una de las series hematopoyéticas para el diagnóstico de síndrome mielodisplásico<sup>(5,11-12)</sup>, nos hizo no excluir esta posibilidad diagnóstica al inicio.

Las alteraciones ultraestructurales en los eritroblastos de la ADC de tipo III incluyen rasgos megaloblásticos, gigantismo y multinuclearidad, junto a otras anomalías como la existencia de hendiduras (*clefts*) intranucleares, lobulaciones del contorno nuclear, células multinucleadas con núcleos de diferente tamaño, forma y/o maduración, y anomalías de la membrana nuclear como duplicación, pérdida o extensa mielinización de partes de la membra-



na nuclear. El citoplasma contiene siderosomas, vacuolas autofágicas, figuras mielínicas, un exceso de microfilamentos, precipitados de hemoglobina, mitocondrias anormales y sólo ocasionalmente mitocondrias cargadas de hierro. Otras anomalías que también han sido descritas, “cromatina en esponja” o incluso trazos de “doble membrana” citoplasmática, en escaso porcentaje de células, son características de ADC de tipos I y II, respectivamente<sup>(4,7,13-14)</sup>. Estas alteraciones, que indican una diseritropoyesis severa, aunque son muy características, no son exclusivas de la ADC de tipo III y se pueden observar de forma inusual en otras patologías con displasia eritroide, principalmente eritroleucemias y síndromes mielodisplásicos. En el caso que presentamos, la mayoría de estas alteraciones estaban presentes, junto a otras no relacionadas con una alteración selectiva de la serie eritroblástica, como la existencia de displasia mieloide y megacariocítica, ya sospechadas a nivel óptico y confirmadas a nivel ultraestructural. Por otra parte, la intensa sideroacrestia con más del 15% de sideroblastos anillados puede estar presente tanto en la ADC como en los síndromes mielodisplásicos o eritroleucemias. Además, y ello no es menos importante, la existencia de PAS-positividad eritroblástica, reflejo de la existencia de eritroblastos con importantes acúmulos de glucógeno, no es un hallazgo descrito en los eritroblastos displásicos de ADC, sino que acompaña con frecuencia a la diseritropoyesis de las eritroleucemias y de los síndromes mielodisplásicos.

Una característica determinante en el diagnóstico de los síndromes mielodisplásicos es la presencia de alteraciones citogenéticas que se observan aproximadamente en un 45-50% de los mismos<sup>(15,16)</sup>. En nuestro caso, se detectaron alteraciones numéricas del cromosoma 11 y delección 5q, anomalías previamente descritas en los síndromes mielodisplásicos<sup>(17,18)</sup> y no entre los pacientes con ADC de tipo III, en los que estudios moleculares recientes han evidenciado que una mutación en *KIF23/MKLP1* en la región 15q23 es la responsable de esta entidad<sup>(19)</sup>.

Las trisomías/tetrasomías del cromosoma 11 se han relacionado con la sobreexpresión de determinados oncogenes<sup>(20)</sup> y el desarrollo de leucemia aguda mieloblástica<sup>(21,22)</sup>. Por su parte, las alteraciones del cromosoma 5 pueden presentarse como única anomalía o bien estar acompañadas por otras alteraciones cromosómicas<sup>(23)</sup>. La delección completa o parcial del brazo largo del cromosoma 5 es la alteración cromosómica más frecuente en los síndromes mielodisplásicos, siendo su incidencia entre los casos al diagnóstico del 10-15%<sup>(15,16)</sup>.

La técnica de FISH en interfase aportó una valiosa información a nuestro caso. Las anomalías descritas se detectaron mediante el estudio de FISH en

interfase, siendo el análisis FISH en metafase negativo y, por tanto, compatible con los resultados previos obtenidos mediante citogenética convencional. Este hecho ocurre con frecuencia en clones celulares portadores de anomalías cromosómicas poco proliferativos, como podría ser nuestro caso, dado el porcentaje de núcleos alterados (26-28%), o bien en aquellos casos en los que el cultivo celular ha seleccionado la proliferación de los clones no patológicos. En un estudio reciente llevado a cabo por el Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica (GCECGH) y por el Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos (GESMD), en el que se aplicó la técnica de FISH a 637 casos sin evidencia de anomalía 5q tras citogenética convencional, se detectó la delección 5q en 38 pacientes (5,96%), de los cuales, 9 casos (2,7%) correspondieron a pacientes con citogenética normal<sup>(24)</sup>.

Por tanto, la PAS-positividad eritroblástica, la displasia mieloide y megacariocítica, y los hallazgos citogenéticos fueron la clave para llegar al diagnóstico final de síndrome mielodisplásico subtipo citopenia refractaria con displasia multilineal de la clasificación de la OMS con la característica de presentar una morfología eritroide similar a la que se observa en la ADC de tipo III.

---

### Para recordar

- La intensa diseritropoyesis con gigantoblastos y multinuclearidad, característica de las anemias diseritropoyéticas congénitas de tipo III, es una alteración posible aunque infrecuente en los síndromes mielodisplásicos.
- El estudio ultraestructural puede ser un método complementario útil en el diagnóstico de algunos síndromes mielodisplásicos con características morfológicas inhabituales.
- El estudio citogenético convencional y molecular es actualmente imprescindible en el diagnóstico y la valoración pronóstica de los síndromes mielodisplásicos.

---

### Bibliografía

1. Bright M, Cobb J, Evans B, Parry TE. Congenital dyserythropoietic anaemia with erythroblastic multinuclearity. *Journal of Clinical Pathology* 1972; 25: 561-9.
2. Wickramasinghe SN. Dyserythropoiesis and congenital dyserythropoietic anaemias. *Br J Haematol* 1997; 98: 785-97.
3. Heimpel H. Congenital dyserythropoietic anaemias: epidemiology, clinical significance, and progress in understanding their pathogenesis. *Ann Hematol* 2004; 83: 613-21.
4. Wickramasinghe SN, Wood WG. Advances in the understanding of the congenital dyserythropoietic anaemias. *British Journal of Haematology* 2005; 131: 431-46.
5. Michot F, Gut J. Alcohol-induced bone marrow damage. A bone marrow study in alcohol-dependent individuals. *Acta Haematologica* 1987; 78: 252-7.

6. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL (eds.). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. Lyon, France; IARC; 2008.
7. Wickramasinghe SN, Parry TE, Williams C, Bond AN, Hughes M, Crook S. A new case of congenital dyserythropoietic anaemia, type III: studies of the cell cycle distribution and ultrastructure of erythroblasts and nucleic acid synthesis in marrow cells. *Journal of Clinical Pathology* 1982; 35: 1103-9.
8. Sigler E, Shaft D, Shtalrid, Shvidel L, Berrebi A, Resnitzky P. New sporadic case of Congenital Dyserythropoietic Anemia type III in an aged woman: Detailed description of ultrastructural findings. *American Journal of Hematology* 2002; 70: 72-6.
9. Iolascon A, Esposito MR, Russo R. Clinical aspects and pathogenesis of congenital dyserythropoietic anemias: from morphology to molecular approach. *Haematologica* 2012; 97: 1786-94.
10. Sandstrom H, Wahlin A. Congenital dyserythropoietic anemia type III. *Haematologica* 2000; 85: 753-7.
11. Parmentier, Scheteling J, Lorenz K, Kramer M, Ireland R, Schuler U, et al. Assessment of dysplastic hematopoiesis: lessons from healthy bone marrow donors. *Haematologica* 2012; 97: 723-30.
12. Germing U, Srupp C, Giagounidis A, Haas R, Gattermann N, Starke C, Aul C. Evaluation of dysplasia through detailed cytomorphology in 3156 patients from the Düsseldorf registry on myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research* 2012; 36: 727-34.
13. Björkstén B, Holmgren G, Roos G, Stenling R. Congenital dyserythropoietic anaemia type III: an electron microscopic study. *Br J Haematol* 1978; 38: 37-42.
14. Wickramasinghe SN, Wahlin A, Anstee D, Parsons SF, Stopps G, Bergström I, et al. Observations on two members of the Swedish family with congenital dyserythropoietic anaemia, type III. *Eur J Haematol* 1993; 50: 213-21.
15. Haase D, Germing U, Schanz J, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Hildebrandt B, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* 2007; 110: 4385-95.
16. Solé F, Luño E, Sanzo C, Espinet B, Sanz GF, Cervera J, et al. Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2005; 90: 1168-78.
17. Collado R, Badía L, García S, Sánchez H, Prieto F, Carbonell F. Chromosome 11 abnormalities in myelodysplastic syndromes. *Cancer Genetics Cytogenetics* 1999; 114: 58-61.
18. Schanz J, Tüchler H, Solé F, Mallo M, Luño E, Cervera J, et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol* 2012; 30: 820-9.
19. Liljeholm M, Irvine AF, Vikberg AL, Norberg A, Month S, Sandström H, et al. Congenital dyserythropoietic anemia type III (CDA III) is caused by a mutation in kinesin family member, KIF23. *Blood* 2013 (Epub ahead of print).
20. Weh HJ, Hoffman R, Sucie S, Kuse R, Hossfeld DK. Is trisomy another nonrandom chromosomal anomaly in acute nonlymphocytic leukemia and myelodysplastic syndrome? *Cancer Genet Cytogenet* 1988; 35: 205-11.
21. Avanzi GC, Giovinazzo B, Depaolo L, Bertini M, Rosegotti L, Pegoraro A. Trisomy 11 in myelodysplastic syndrome derived acute myeloblastic leukaemias. *Eur J Haematol* 1989; 43: 173.
22. Wang SA, Jabbar K, Lu G, Chen SS, Galili N, Vega F, et al. Trisomy 11 in myelodysplastic syndromes defines a unique group of disease with aggressive clinicopathologic features. *Leukemia* 2010; 24: 740-7.
23. Mallo M, Cervera J, Schanz J, Such E, García-Manero G, Luño E, et al. Impact of adjunct cytogenetic abnormalities for prognostic stratification in patients with myelodysplastic syndrome and deletion 5q. *Leukemia* 2011; 25: 110-20.
24. Mallo M, Arenillas L, Espinet B, Salido M, Hernández JM, Lumberras E, et al. Fluorescence in situ hybridization improves the detection of 5q31 deletion in myelodysplastic syndromes without cytogenetic evidence of 5q-. *Haematologica* 2008; 93: 1001-8.

## Caso 5

### Paciente con enfermedad de Gaucher y anemia macrocítica

L. ÁBALO<sup>1</sup>, I. SAAVEDRA<sup>1</sup>, J.D. RODRÍGUEZ-GAMBARTE<sup>1</sup>,  
M. CALBACHO<sup>1</sup>, J. LÓPEZ-JIMENEZ<sup>1</sup>, M. GARCÍA-COSÍO<sup>2</sup>,  
D. REY<sup>3</sup>, M. TALAVERA<sup>3</sup>, J. CARRILLO-FARGA<sup>4</sup>, J. VILLARRUBIA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid

<sup>2</sup> Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid

<sup>3</sup> Servicio de Genética. Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid

<sup>4</sup> Instituto de Hematopatología. Querétaro (México)

#### Historia clínica

Mujer de 80 años seguida en el servicio de hematología por enfermedad de Gaucher (EG) y en la que se aprecia anemia macrocítica refractaria al tratamiento.

En 1979, con 46 años, ingresó en el servicio de gastroenterología por un episodio de colecistitis y colelitiasis. Desde 2 años antes, la paciente presentó varios episodios de dolor cólico, así como una anemia y trombocitopenia moderadas (10,9 g/L y  $122 \times 10^9/L$ , respectivamente), esplenomegalia de 3 cm por debajo del reborde costal y una VSG de 68. Después de la colecistectomía, persistió la trombocitopenia, por lo que se realizó un aspirado-biopsia de médula ósea, que estableció el diagnóstico de EG (Figuras 1 y 2). Ante el buen estado clínico de la paciente y la recuperación de las citopenias, se decidió no hacer esplenectomía, único tratamiento para esta enfermedad en ese momento. En los siguientes años la paciente acudió a revisión de hematología, permaneciendo asintomática y detectándose únicamente un déficit de vitamina B<sub>12</sub>, sin anemia, por lo que fue tratada

con vitamina B<sub>12</sub> i.m., que se administró de forma esporádica. A los pocos años dejó de acudir a las revisiones.

En el año 2011, 32 años después, con 78 años, la paciente acudió de nuevo al hospital por un cuadro de anemia macrocítica, objetivándose unos niveles séricos de vitamina B<sub>12</sub> de 112 pg/mL y de ácido fólico de 24 ng/mL. Tras iniciar tratamiento sustitutivo y a pesar de normalizarse las cifras de vitamina B<sub>12</sub>, persistía la anemia macrocítica.

Posteriormente la paciente ha sido intervenida para sustitución de una prótesis de cadera. Recuperada sin complicaciones de la intervención, la paciente continúa anemizándose (hemoglobina 70 g/L), llegando a precisar transfusiones de hematíes. Por este motivo, y viendo que el patrón de citopenias no se ajustaba al característico de la EG, se decidió hacer un nuevo aspirado-biopsia de médula ósea.

#### Exploración física

La exploración física fue normal, no objetivándose ni hepato- ni esplenomegalia.

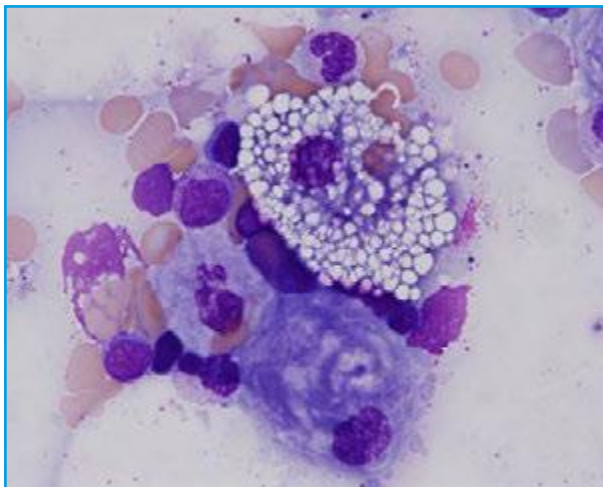


Figura 1. Histiocito espumoso y célula de Gaucher.

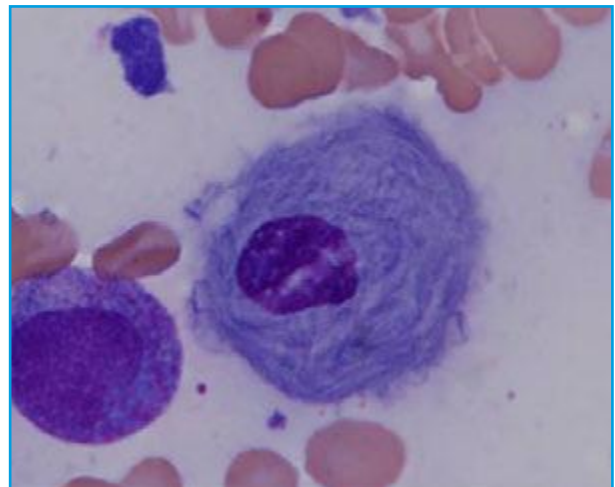


Figura 2. Célula de Gaucher.

### Pruebas de laboratorio

**Hemograma:** leucocitos  $2.700 \times 10^9/L$  (neutrófilos 44%, linfocitos 40%, monocitos 14%, eosinófilos 2%), hemoglobina 94 g/L, VCM 112 fL, plaquetas  $125 \times 10^9/L$ . **Bioquímica:** LDH 177 UL, AST 11 UL, GGT 11 UL, creatinina 0,6 mg/dL, proteínas 6,3 g/dL, saturación de la transferrina 82,5%, ferritina 595 ng/dL, transferrina 179 mg/dL, sideremia 153 ug/dL, vitamina B<sub>12</sub> 112 pg/mL, ácido fólico 24 ng/mL (en tratamiento con ácido fólico oral).

Estudio de mutaciones propias de la EG: N370S/N370S. Actividad enzimática ( $\beta$ -glucosidasa ácida): 18%; quitotriosidasa: 1.557 nmol/mL/h.

Hemograma después del tratamiento con vitamina B<sub>12</sub> i.m.: hemoglobina 91 g/L, VCM 110 fL, leucocitos  $3.180 \times 10^9/L$ , plaquetas  $191.000 \times 10^9/L$ , ferritina 795 ng/dL, vitamina B<sub>12</sub> 818 pg/mL.

**Aspirado de médula ósea:** médula hiper celular con hematopoyesis conservada en la que destaca una importante infiltración por histiocitos espumosos y células de Gaucher, así como hiperplasia de megacariocitos, siendo la mayoría pequeños y unilobulados. En el resto de las series no se apreciaban cambios displásicos significativos (Figuras 3-6).

**Biopsia de médula ósea:** frecuentes histiocitos con citoplasma amplio y espumoso PAS+, compatible con EG. Celularidad hematopoyética sin alteraciones significativas.

**Cariotipo de médula ósea:** en cultivo de 24 horas se estudian 21 metafases y en una se ha visto un clon anormal con una delección de 5q.

**Estudio de hibridación *in situ* de sangre periférica y médula ósea (FISH):** el 66% y el 51% de los núcleos en sangre periférica y médula ósea, respectivamente, muestran una única señal fluorescente correspondiente al cromosoma 5q, por lo que consi-

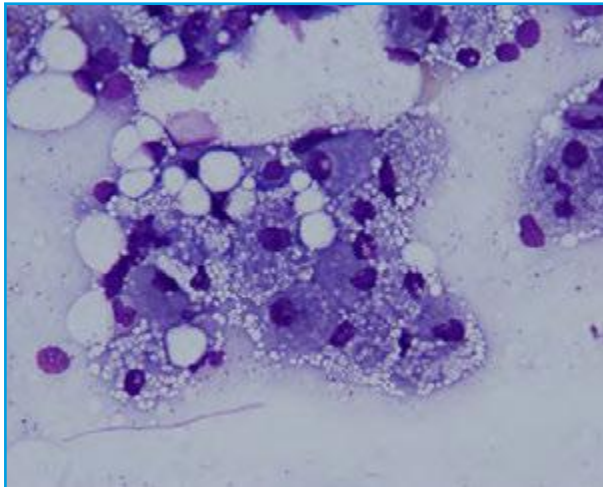


Figura 3. Agregado de histiocitos espumosos y células de Gaucher.

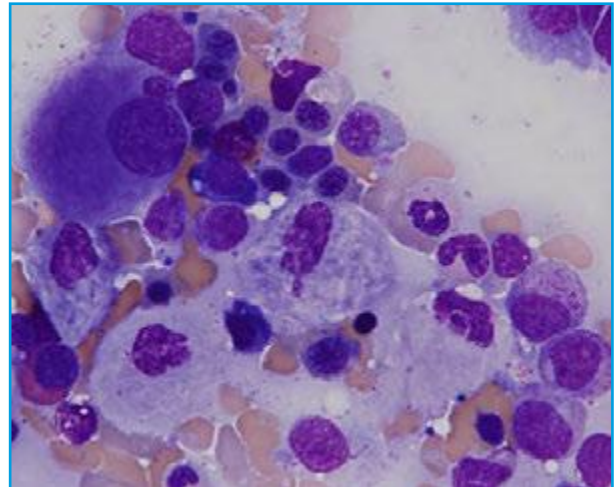


Figura 4. Células de Gaucher y megacariocito unilobulado característico de síndrome 5q.

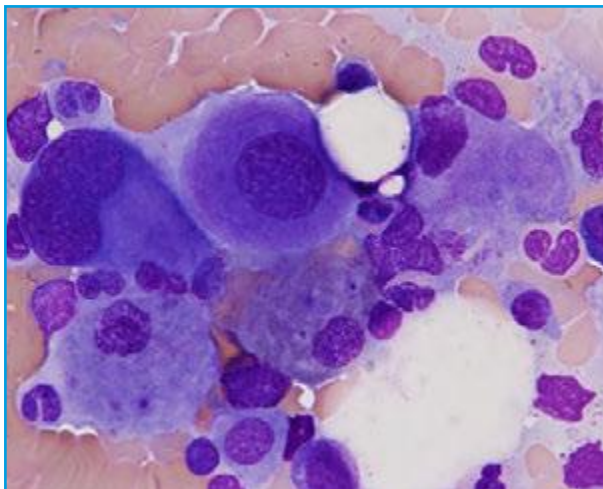


Figura 5. Células de Gaucher y megacariocito unilobulados.

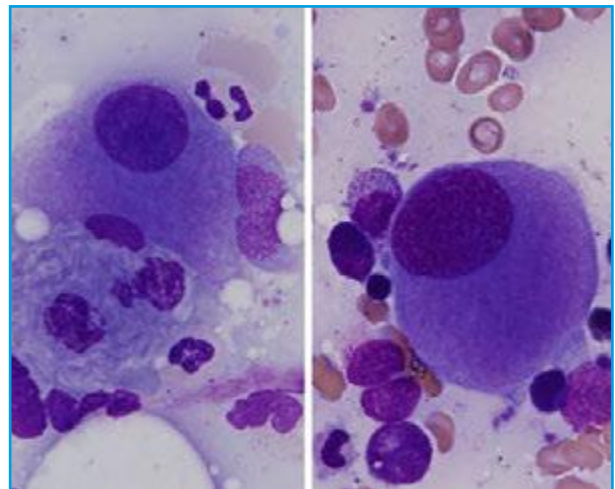


Figura 6. Célula de Gaucher y megacariocitos unilobulados.

deramos que presenta deleción de dicha región cromosómica. Resto de estudios por FISH en médula ósea: 7q, 8, p53 y 20q, sin alteraciones (Figura 7).

### Diagnóstico

Síndrome mielodisplásico (SMD) con deleción aislada del 5q (5q-) en paciente con EG.

### Situación actual

Se ha iniciado tratamiento con lenalidomida (Revlimid®) a dosis de 5 mg/día, durante 21 días, con 7 días de descanso. Se decidió esta dosis, al ser una persona de edad avanzada y con patología medular asociada. Después de 4 ciclos, la paciente se encuentra asintomática con muy buen estado general y presenta la siguiente analítica: hemoglobina 125 g/L, VCM 98 fL, leucocitos  $2.560 \times 10^9/L$ , plaquetas  $88 \times 10^9/L$  (Figura 8).

### Discusión

Desde el punto de vista epidemiológico, la EG es una enfermedad ultrarrara o ultrahuerfana, es decir, con menos de 10.000 pacientes en todo el mundo<sup>(1)</sup>.

Dicha entidad es una enfermedad lisosomal debida a un defecto en el metabolismo de los esfingolípidos como consecuencia de una deficiencia en la enzima  $\beta$ -glucosidasa ácida o glucocerebrosidasa (GCasa), codificada por el gen GBA1, que se encuen-

tra en el cromosoma 1q21<sup>(2)</sup>. Esto provoca un acúmulo de glucocerebrósido en las células del sistema monocito/macrófago, que se encuentran distribuidas en casi todo el organismo, dando lugar a macrófagos repletos de lípidos llamados células de Gaucher (Figura 9). Éstos se suelen acumular principalmente en el hígado, el bazo y la médula ósea, dando lugar a un cuadro clínico característico de citopenias, organomegalías y afectación ósea; menos frecuentemente pueden afectar a otros órganos, como son el pulmón, el corazón y el riñón. Según la afectación o no del sistema nervioso central, se pueden distinguir tres tipos: tipo 1 (no neuronopático), tipo 2 (neuronopático agudo) y tipo 3 (neuronopático subagudo). El tipo 1 constituye más del 95% de todos los casos<sup>(3)</sup>. Se tra-

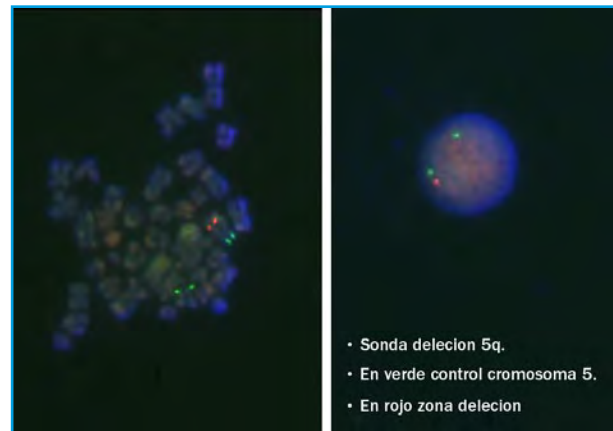


Figura 7. FISH en el que se observa la deleción del 5q.

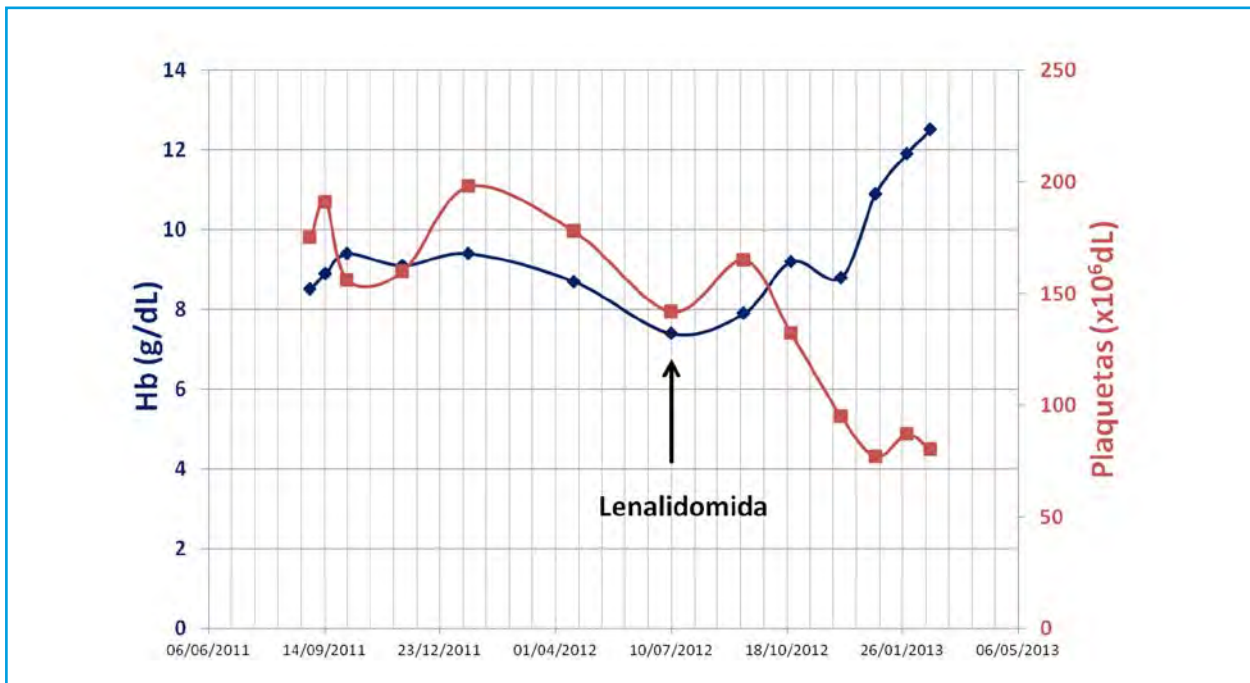


Figura 8. Evolución de la hemoglobina y las plaquetas en la que destaca el aumento de hemoglobina tras el tratamiento con lenalidomida al tiempo que disminuye la cifra de plaquetas.

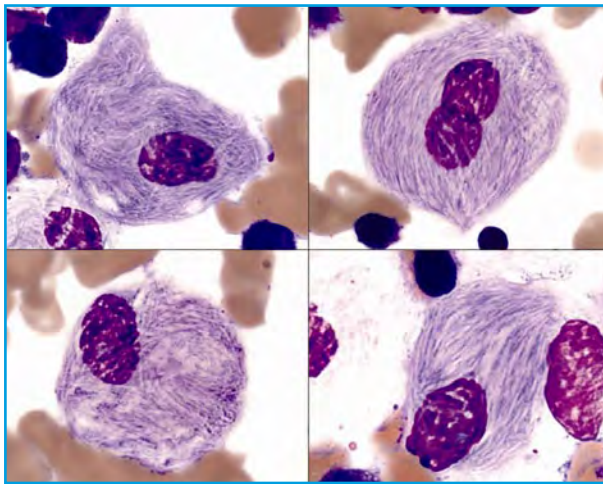


Figura 9. Características células de Gaucher.

ta de una enfermedad crónica, progresiva, heterogénea, multisistémica y altamente variable, lo que junto con su poca frecuencia hace que muchas veces sea de muy difícil diagnóstico<sup>(4)</sup>. El diagnóstico definitivo de la EG se hace determinando la actividad enzimática y estudiando el tipo de mutación que la causa aunque muchos pacientes son diagnosticados al realizarles un aspirado-biopsia de médula ósea. Los biomarcadores más frecuentemente utilizados para su seguimiento son la quitotriosidasa plasmática y la CCL-18/PARC<sup>(5)</sup>. El tratamiento de elección, cuando se precisa, es la terapia de sustitución enzimática (TSE), existiendo en este momento tres enzimas, imiglucerasa, velaglucerasa y taliglucerasa, esta última no disponible en Europa. Para los casos en que no se pueda utilizar la TSE, existe la terapia de reducción de sustrato, estando disponible en este momento los fármacos miglustat, y en 2014, eliglustat<sup>(6)</sup>.

La asociación de la EG con el cáncer se viene sugiriendo desde 1982, cuando se demostró en estudios *post mortem* que más del 50% de los pacientes fallecidos con EG presentaban algún tipo de neoplasia<sup>(7)</sup>. Numerosos estudios posteriores han demostrado que hay un riesgo aumentado de padecer una neoplasia hematológica asociada a EG, particularmente mieloma múltiple, llegando a ser éste de más de 50 veces más que en la población general<sup>(8)</sup>. También se han publicado casos aislados de otras neoplasias hematológicas, como linfomas, leucemia linfática crónica, leucemia aguda, etc., pero no se ha podido demostrar que estos casos tengan relación directa con la EG y más bien parecen ser hallazgos casuales. Este riesgo parece ser mayor en los pacientes esplenectomizados.

Hasta este momento, no se ha publicado ningún caso de EG asociado a SMD y, por lo tanto, tampoco a síndrome 5q-. El problema que presentan los pacientes con enfermedades raras y, más aún, si son

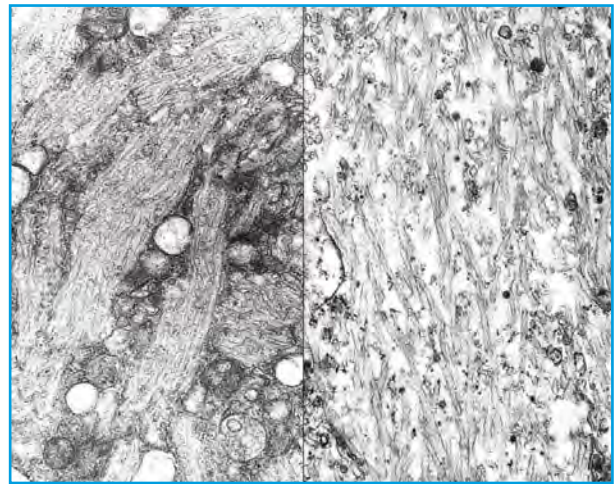


Figura 10. Microscopia electrónica de los gránulos de una célula de Gaucher donde se observa su característico alargamiento.

añosos, es que frecuentemente cualquier alteración analítica, signo o síntoma puede ser atribuido a su patología de base y no ser estudiado adecuadamente, con el consiguiente retraso en la instauración del tratamiento o puede que se esté tratando con una terapia inadecuada<sup>(4)</sup>.

El orden de instauración de las citopenias en la EG es muy característico la mayoría de las veces, apareciendo en primer lugar la trombocitopenia y después la anemia<sup>(9)</sup>. Esto puede variar si el paciente está esplenectomizado. El cuadro típico de presentación del síndrome 5q-<sup>(10)</sup> con anemia macrocítica y trombocitosis quedaba en este caso alterado al asociarse a otra patología que normalmente cursa con trombopenia. Nuestra paciente tenía una historia de EG de más de 30 años de evolución y no había precisado previamente tratamiento de TSE. El hecho de que presentara un síndrome anémico que precisó transfusiones y que no se corrigiera con vitamina B<sub>12</sub>, manteniendo estable la cifra de plaquetas, fue lo que hizo replantearse que el origen de la anemia estuviera vinculado a la EG. Por otra parte, la respuesta a la lenalidomida fue excelente y como único efecto secundario se objetivó una trombocitopenia que no obligó a suspender el fármaco. Es probable, sin embargo, que esta respuesta sea transitoria y que en un futuro haya que plantearse nuevas opciones terapéuticas<sup>(11)</sup>.

La médula ósea era altamente sugestiva de las dos enfermedades, por lo que sólo con el estudio citológico pudo hacerse el diagnóstico aunque, obviamente, éste debe confirmarse por otras tecnologías. La célula de Gaucher es patognomónica de la EG. La llamada "célula pseudo-Gaucher", descrita en diversas enfermedades, suele ser un macrófago tesarismótico, frecuentemente espumoso, que en ningún caso muestra los lisosomas alargados característicos de la EG (Figura 10). La presencia de fenómenos de eritofago-

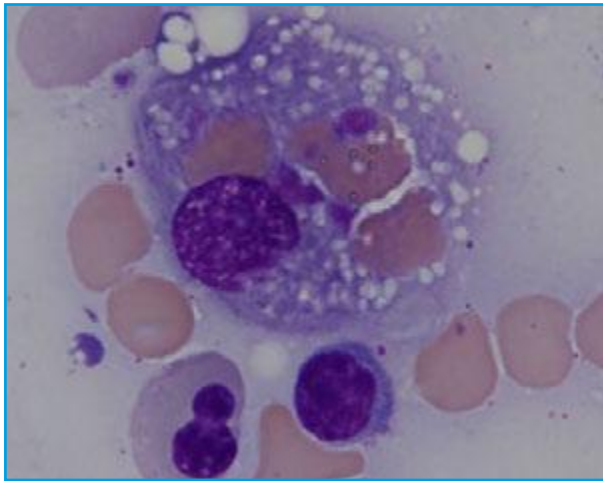


Figura 11. Eritrofagocitosis en una célula de Gaucher vacuolada.

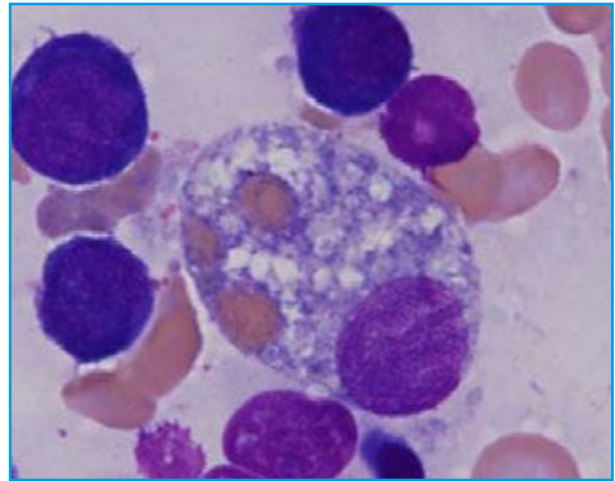


Figura 12. Eritrofagocitosis en un macrófago vacuolado en un paciente con enfermedad de Gaucher.

citosis en las células de Gaucher es frecuente ya que estas células mantienen intacta su capacidad fagocítica y tienen defectos sólo en la degradación lisosomal (Figuras 11 y 12). Los histiocitos espumosos son inespecíficos y pueden verse en diversas patologías. Los megacariocitos pequeños y unilobulados, junto con la hipoplasia eritroide y el resto de series hematopoyéticas sin cambios displásicos, son características del SMD asociado a 5q- aislado.

La disponibilidad de nuevos fármacos para el tratamiento de los errores congénitos del metabolismo y, más en concreto, en la EG, ha supuesto un considerable aumento en la expectativa de vida de estos pacientes. Esto supone la aparición de nuevos aspectos en la historia natural de la enfermedad, entre los que podría encontrarse el aumento del riesgo de neoplasias, por lo que los médicos que tratan estas enfermedades deben estar concienciados y sospechar estas posibles asociaciones.

### Para recordar

- Aunque la EG es una enfermedad muy rara, se debe pensar en ella ante pacientes con esplenomegalia y trombocitopenia.
- El diagnóstico definitivo de la EG se hace por determinación de la actividad enzimática de la  $\beta$ -glucosidasa ácida o glucocerebrosidasa, no siendo necesario realizar aspirado-biopsia de médula ósea en todos los casos.
- La célula de Gaucher es patognomónica de esta enfermedad.
- Existe una clara asociación entre EG y cáncer, especialmente mieloma múltiple u otra gammapatía, siendo el riesgo del primero 50 veces mayor que en la población general.

- El aumento de la esperanza de vida de los pacientes con enfermedades raras está cambiando su evolución, siendo cada vez más frecuente la asociación de otras patologías que deben sospecharse cuando la enfermedad de base no sigue su curso habitual.

### Bibliografía

1. Mehta A. Epidemiology and natural history of Gaucher's disease. *EJIM* 2006; 17: S2-S5.
2. Beutler E, Grabowski GA. Gaucher disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds.). *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. Vol. III. 8<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 3635-68.
3. Grabowski G. Gaucher disease and other storage disorders. *Hematology* 2012; 13-8.
4. Mistry P, Sadan S, Yang R, et al. Consequences of diagnostic delays in type 1 Gaucher disease: the need for greater awareness among hematologists-oncologists an opportunity for early diagnosis and intervention. *Am J Hematol* 2007; 82: 697-701.
5. Aerts J, Kallemeijn, Wegdam W, et al. Biomarkers in the diagnosis of lysosomal storage disorders: protein, lipids and inhibitors. *J Inher Metab Dis* 2011; 34: 605-19.
6. Zimran A. How I treat Gaucher disease. *Blood* 2011; 118: 1463-71.
7. Lee RE. The pathology of Gaucher disease. *Prog Clin Biol Res* 1982; 95: 177-217.
8. de Fost M, Vom Dahl S, Weverling GJ, et al. Increased incidence of cancer in adult Gaucher disease in Western Europe. *Blood Cell Mol Dis* 2006; 36: 53-8.
9. Hughes D, Cappellini MD, Berger M, et al. Recommendations for the management of the haematological and oncohaematological aspects of Gaucher disease. *BJH* 2007; 138: 676-86.
10. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. (eds.). *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. 4th edition. Lyon (France): IARC press; 2008. p. 102.
11. Kelaidi C, Eclache V, Fenaux P. The role of lenalidomide in the management of myelodysplasia with del 5q. *BJH* 2008; 140: 267-78.

## Caso 6

### Fracaso renal agudo en paciente con bicitopenia

M.A. PIÑÁN<sup>1</sup>, M. OLIVARES<sup>1</sup>, A. BALERDI<sup>1</sup>, A. IGLESIAS<sup>1</sup>, M. ZAMORA<sup>1</sup>, R. DEL ORBE<sup>1</sup>,  
M. DUEÑAS<sup>1</sup>, I. OLAZABAL<sup>1</sup>, M. PUENTE<sup>1</sup>, E. AMUTIO<sup>1</sup>, I. ANCÍN<sup>1</sup>, M. RIÑÓN<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Servicio de Hematología y Hemoterapia; <sup>2</sup> Servicio de Inmunología.

Hospital Universitario de Cruces. San Vicente de Barakaldo (Vizcaya)

#### Antecedentes personales

Mujer de 49 años de edad, intervenida en varias ocasiones por un colesteatoma y diagnosticada de artritis reumatoide en enero de 2011 y en tratamiento habitual con corticoides, hidroxiclороquina y metotrexato; desde marzo de 2012 era controlada en un centro privado por una leucopenia aislada.

#### Enfermedad actual

El 31 de mayo de 2012 se objetivó anemia normocítica (Hb: 97 g/L), leucopenia ( $1,16 \times 10^9/L$ ) y neutropenia ( $0,2 \times 10^9/L$ ), que fue relacionada con el tratamiento con metotrexato, motivo por el cual se suspendió y se administró a la paciente una dosis de factores estimulantes de colonias granulocíticas (G-CSF); 24 horas más tarde la paciente desarrolló un cuadro de dolor abdominal, náuseas, vómitos, descenso de la diuresis y hematuria. Tres días después ingresó por fracaso renal oligoanúrico (creatinina: 7,6 mg/dL), anemia y trombocitopenia. Fue tratada con hemodiálisis de filtro venoso-venoso continuo, requiriendo además cuatro concentrados de hemátias, transfusiones de plaquetas y tratamiento esteroideo al no resolverse el cuadro. Nueve días más tarde fue trasladada al servicio de nefrología de nuestro hospital con la sospecha de púrpura trombótica trombocitopénica, iniciándose diálisis y transfusiones de plasma.

#### Exploración física

Sin hallazgos reseñables.

#### Exploraciones complementarias

*Ecografía abdominal:* normal.

*Ecografía Doppler renal:* ausencia de trombosis.

*Bioquímica:* urea: 145 mg/dL (10-50), creatinina:

4,61 mg/dL (0,1-1,1). Ácido úrico: 4,9 mg/dL (2,4-5,7). Bilirrubina total: 0,5 mg/dL (0,2-1,2). Proteínas totales: 5,8 g/dL (6-8). LDH: 422 U/L (26-245). Resto de parámetros dentro de la normalidad.

*Hemograma:* Hb: 82 g/L. VCM: 94,6 fL. Leucocitos:  $7,9 \times 10^9/L$  (neutrófilos 22%, cayados 2%, metamielocitos 6%, mielocitos 1%, linfocitos 16%, monocitos 1%, 52% de células de tamaño mediano, con núcleo redondo de cromatina madura y aspecto pelgueroide y citoplasma amplio con granulación fina). Plaquetas:  $92 \times 10^9/L$  (Figura 1).

*Morfología eritrocitaria:* 2 esquistocitos/1.000 hemátias (Figuras 1 y 2).

*Estudio de coagulación:* APTT: 32 s (24-35). IP: 66% (70-120). Fibrinógeno: 236 mg/dL (200-400). Dímero D: 11.880 ng/mL (0-500). Monómeros de fibrina: negativo.

*Aspirado medular:* la muestra obtenida se coagula con rapidez y la imagen observada era hiper celular y monomorfa, constituida por un 71% de células

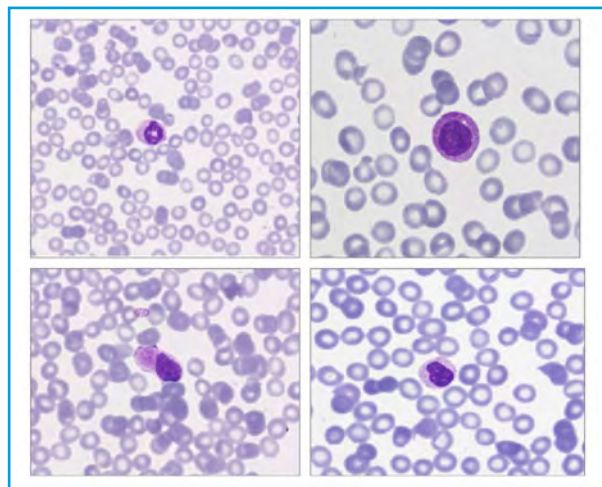


Figura 1. Imágenes de sangre periférica: serie granulocítica con rasgos displásicos (núcleo en anillo, cromatina con fenómenos de *cumpling*) y células atípicas de núcleo excéntrico y citoplasma con granulación fina y distribución polar (MGG x 1.000).



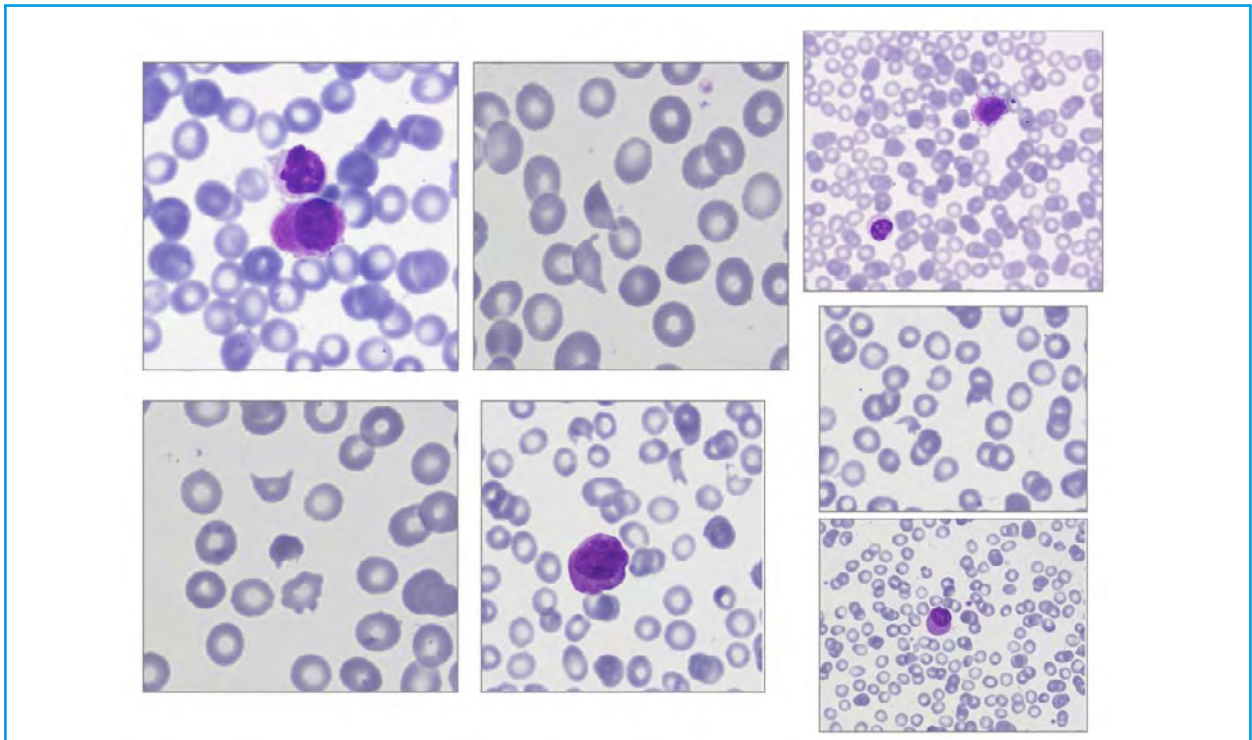


Figura 2. Sangre periférica: blastos granulares y esquistocitos aislados (MGG x 1.000).

de tamaño mediano a pequeño, en cuyo contorno se observaban con alguna frecuencia *blebs*; los núcleos eran redondos, excéntricos, sin indentaciones, con una cromatina de aspecto maduro y pelgueroide; los citoplasma eran abundantes y granulares; esta granulación era fina y a veces mostraba una disposición polar; no se vieron astillas ni bastones de

Auer y la reacción citoquímica para la peroxidasa fue intensamente positiva. La serie granulocítica residual era muy dismórfica y los megacariocitos estaban en cantidad suficiente y tenían morfología normal; la serie roja estaba escasamente representada (Figura 3-9).

*Inmunofenotipo:* el 84% de las células de la médula ósea tenían un fenotipo compatible con leucemia aguda promielocítica (LPA): CD45+, CD13+, CD33+, CD117+ (64%), DR-, CD56+, CD11c+, CD32+, CD64+, CD38+, MPO+, CD34-, CD11b-, CD16-, CD14-, CD4- (Figura 10).

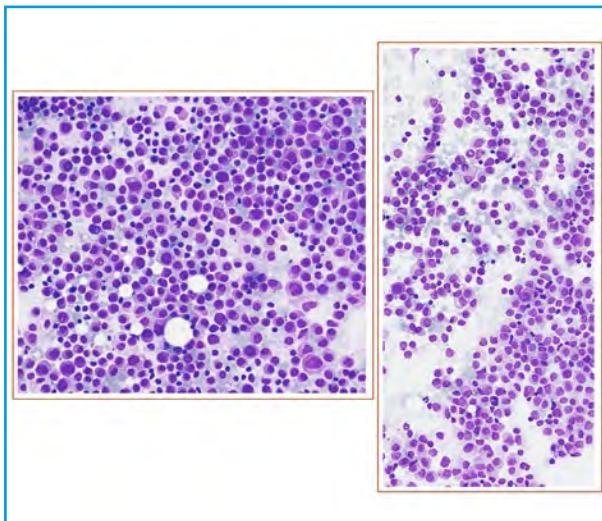


Figura 3. Aspirado medular en el que se observa una imagen hipercelular y monomorfa, constituida por una población blástica de tamaño mediano, con un núcleo redondo y excéntrico y un citoplasma amplio con granulación fina, sin bastones de Auer (MGG x 200).

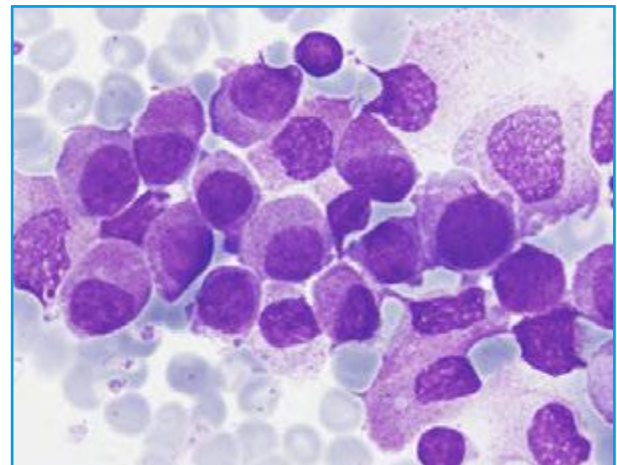


Figura 4. Aspirado medular: blastosis de estirpe granulocítica (MGG x 1.000).

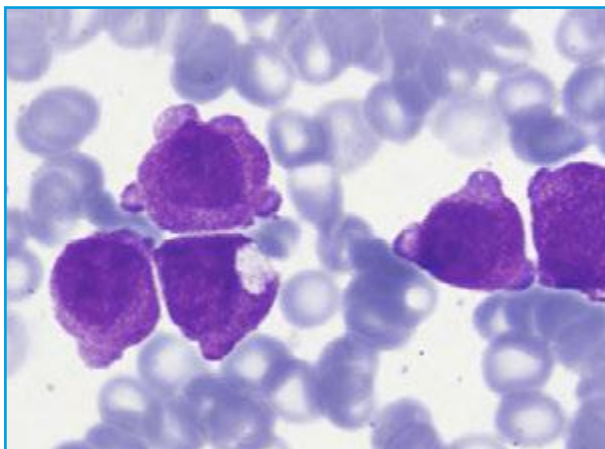


Figura 5. Aspirado medular: blastos granulares con presencia de *blebs* en su contorno (MGG x 1.000).

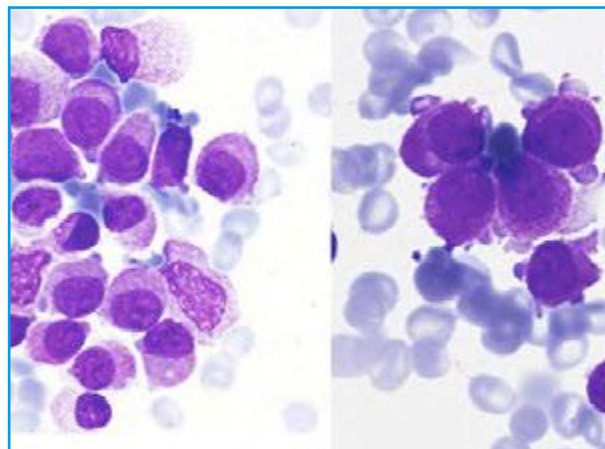


Figura 6. Aspirado medular: blastos de núcleo con apariencia madura y gran fragilidad (MGG x 1.000).

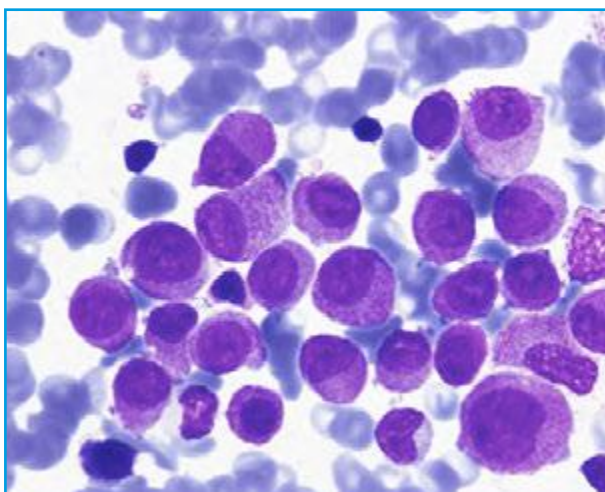


Figura 7. Aspirado medular: blastosis y un eritroblasto con cromatina deslustrada (MGG x 1.000).

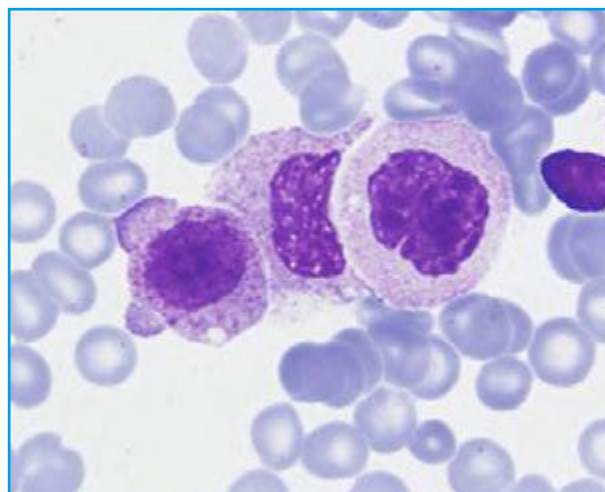


Figura 8. Aspirado medular: blasto con *blebs* y probable elemento de serie granulocítica desgranulado (MGG x 1.000).

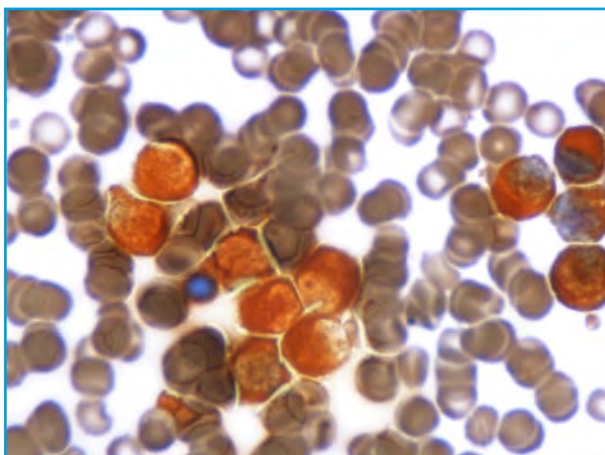


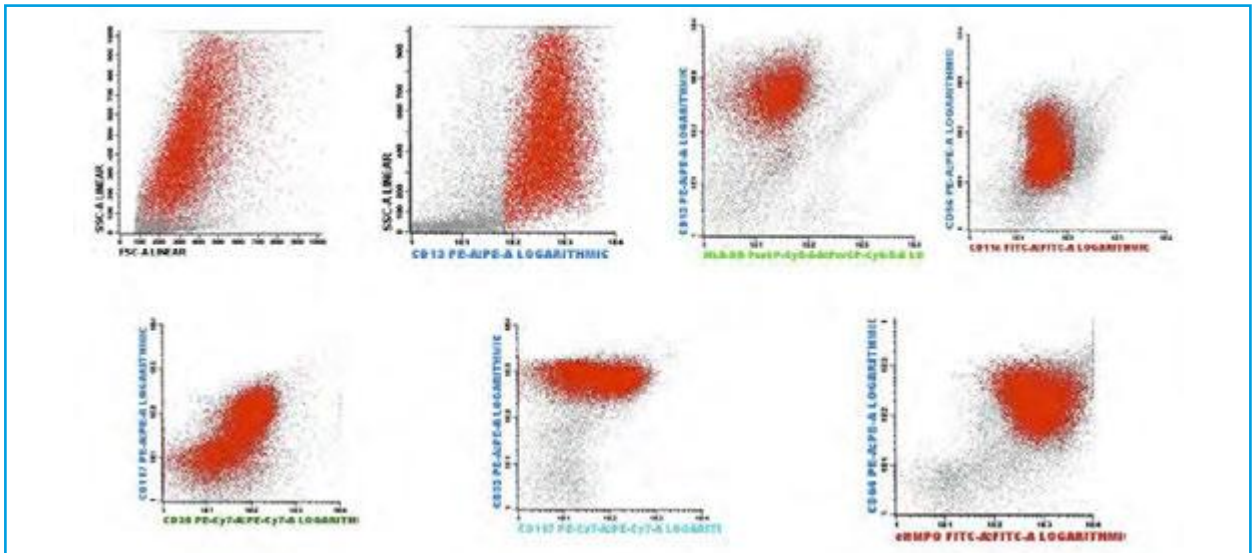
Figura 9. Aspirado medular: reacción muy intensa de los blastos con la peroxidasa (P x 1.000).

Los estudios citogenéticos y moleculares realizados en médula ósea fueron:

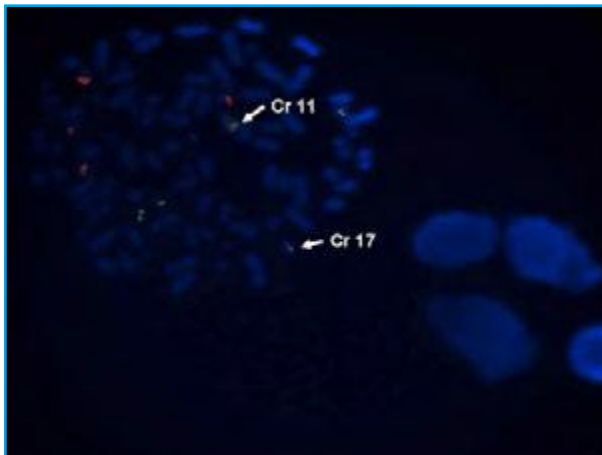
- Reordenamiento *PML-RARα* t(15;17)(q22;q21) (RT-PCR): negativo.
- *FISH*: nuc ish 15q22 (**PMLx2**), 17q21 (**RARax3**) [23/100] (Figura 11).
- Citogenética: 46, XX, del(5)(q13q31), t(11;17)(q23;q21) [20/30] / 46,XX [10/30] (Figura 12).
- Reordenamiento *PLZF-RARα* positivo (RT-PCR) (Figura 13).
- Reordenamiento *RARα-PLZF* positivo (RT-PCR).

### Diagnóstico

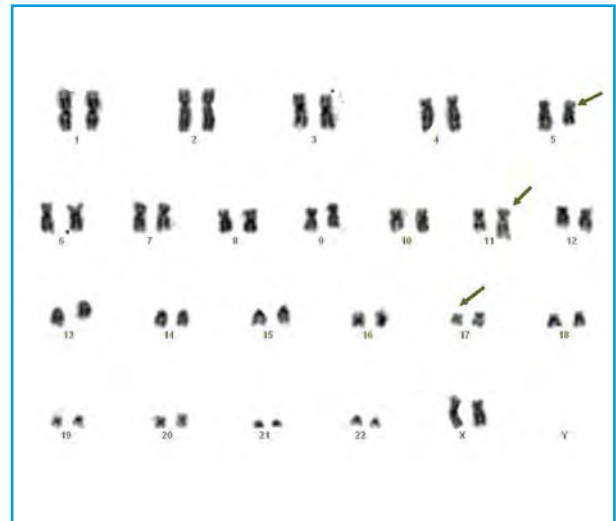
LPA con translocación variante *RARα* (según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud [OMS]).



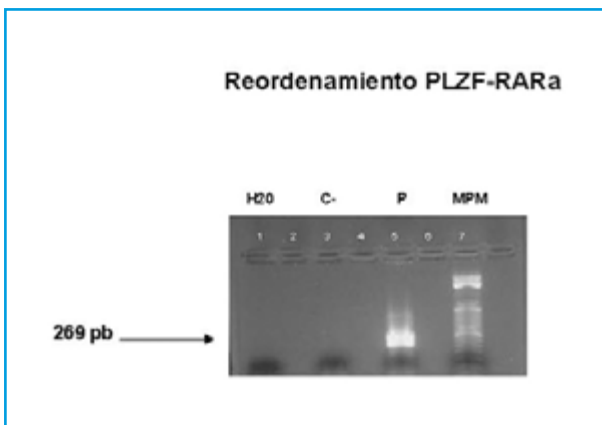
**Figura 10.** Inmunofenotipo de la médula ósea: la población blástica estaba caracterizada por los marcadores CD45+, CD13+, CD33+, CD117+ (64%), DR-, CD56+, CD11c+, CD32+, CD64+, CD38+, MPO+, CD34-, CD11b-, CD16-, CD14-, CD4-.



**Figura 11.** Técnica de FISH en el aspirado medular donde se observa una señal en el cromosoma 11. Cortesía de la Dra. Calasanz. Universidad de Navarra. Pamplona.



**Figura 12.** Citogenética de médula ósea en la que se confirma la  $t(11;17)(q23;q21)$ , además de una  $del(5q)(q13q31)$  en 20/30 metafases. Cortesía de la Dra. Calasanz. Universidad de Navarra. Pamplona.



**Figura 13.** Reordenamiento PLZF-RARA que demuestra la presencia de una banda de 269 pb; C-: control negativo; MPM: marcador de pesos moleculares (RT-PCR); P: paciente.

### Evolución

El 28/6/2013 la paciente fue trasladada a nuestro servicio e inició tratamiento quimioterápico de inducción según esquema IDICE (idarrubicina: 12 mg/m<sup>2</sup>/día los días 1, 3 y 5; Ara-C: 500 mg/m<sup>2</sup>/12 h, días, 1, 3, 5 y 7; y etopósido: 100 mg/m<sup>2</sup>/día, los días 1, 2 y 3) + ácido transretinoico (ATRA), 45 mg/m<sup>2</sup>/día repartido en 2 dosis, hasta alcanzar remisión completa y ajustando las dosis a la insuficiencia renal durante los primeros días y a dosis plenas 9 días más tarde, una vez resuelto este problema.

El aspirado medular en el día +37 postinducción mostró un 3% de células blásticas, una enfermedad residual (EMR) por citometría de flujo de un 0,4% y un cariotipo: 46,XX,del(5)(q13q31),t(11;17)(q23;q21)[4/50] / 46,XX [46/50]; el reordenamiento *PLZF-RARα* era positivo.

Se inició tratamiento de consolidación (2 ciclos de Ara-C: 500 mg/m<sup>2</sup>/12 h, días 1 a 6; mitoxantrone: 12 mg/m<sup>2</sup>/día los días 4, 5 y 6; y ATRA: 45 mg/m<sup>2</sup>/día repartido en dos dosis, días 1 a 15), tras los cuales se normalizó el cariotipo. La EMR fue en ese momento de 0,072%, y los estudios moleculares para *PLZF-RARα* y *RARα-PLZF* se negativizaron.

Durante el ingreso, previo al tratamiento quimioterápico, y como consecuencia de la colocación de un catéter de vía central para la diálisis, la paciente desarrolló un gran hematoma pectoral derecho con sangrado a través del orificio de entrada, que fue imposible de controlar con medidas físicas y obligó a retirar esa vía.

En febrero de 2013 se efectuó trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos con acondicionamiento mieloablativo y progenitores obtenidos a partir de la sangre periférica de su hermana, sin que sufriese complicaciones significativas.

## Discusión

La LPA se incluye entre las leucemias agudas con anomalías citogenéticas recurrentes y se caracteriza por presentar la translocación t(15;17)(q22;q12) *PML-RARα*. Sin embargo, en un 10% de los casos no se detecta esta alteración por técnicas citogenéticas, ya sea por problemas técnicos, inserciones cromosómicas submicroscópicas o reordenamientos más complejos. A pesar de ello podremos hacer un diagnóstico certero ya que el estudio molecular del transcrito *PMLRARα* será positivo. Por otro lado, aproximadamente un 2% de los casos de LPA portan un gen de fusión alternativo al *PML* (*PLZF* con la t(11;17)(q23q21), *NPM1* con la t(5;17), *NuMA* con la t(11;17)(q13q21), *FIPIL1* con la t(4;17), *BCOR* con la t(X;17), *STAT5b* y *PRKAR1A* con reordenamientos de 17q); el más frecuente de todos ellos es el *PLZF* (*promyelocytic zinc finger*)<sup>(1)</sup>; este gen, también conocido como *Zbtb16*, fue descrito por primera vez en 1993 en un paciente chino que padecía de una LPA atípica; está localizado en el cromosoma 11q23, entre un *cluster* de genes de la familia *zinc finger*, codificantes de unas proteínas con gran contenido en cisteínas e histidinas que requieren una o más uniones de zinc para estabilizar su estructura<sup>(2)</sup>; tiene una alta capacidad represora de la transcripción, y su nivel de expresión es muy alto en la célula madre y progenitora, pero disminuye a medida que la célula madura.

La importancia clínica de estas variantes de LPA es tria, sin duda, en la diferente respuesta al tratamiento con ATRA y trióxido de arsénico, ya que todas son sensibles, a excepción de las portadoras de los genes *PLZF* y *STAB5b*. En el caso de la LPA con t(11;17)(q23q21) hay evidencia de esta resistencia tanto *in vivo* como *in vitro*, particularmente en aquellos pacientes que tienen el reordenamiento inverso *RARα-PLZF*, cuyo producto jugaría un papel importante en la mediación de la resistencia al ácido retinoico<sup>(1,3)</sup>.

Desde el año 1993 se han comunicado aproximadamente 16 casos más de pacientes con esta translocación variante<sup>(4-7)</sup>, con una incidencia muy baja en la mujer (14 hombres *versus* 2 mujeres), frecuente coagulopatía (11 pacientes) y en todos ellos se detectó la t(11;17), ya fuera por citogenética convencional o por FISH; ocurrió lo mismo con los reordenamientos *PLZF-RARα* y *RARα-PLZF* en aquellos pacientes en los que se realizó el estudio molecular por PCR; respecto al tratamiento, 13 recibieron quimioterapia según diferentes esquemas, y en 14 se adicionó ATRA; 4 se sometieron a alotrasplante y 1 a autotrasplante de progenitores hematopoyéticos, consiguiendo respuestas de duración variable en todos los pacientes.

En nuestro caso la forma de debut de la enfermedad fue peculiar, por la presentación “subaguda”, la ausencia de clínica hemorrágica espontánea y el fracaso renal. La relación causa-efecto entre el tratamiento con factores madurativos y el daño renal nos lleva a pensar que los efectos proinflamatorios o trombogénicos de los G-CSF podrían jugar algún papel; sin embargo, no se demostró la existencia de una trombosis renal, ni de datos que apoyaran un daño endotelial evidente; por otro lado, uno de los casos descritos en la literatura fue tratado con la asociación de ATRA más G-CSF con buenos resultados<sup>(8)</sup> y nuestra paciente resolvió la insuficiencia renal con el tratamiento quimioterápico. Hay que recordar también que durante los 15 días previos al diagnóstico recibió múltiples transfusiones de plasma y se había sometido a diálisis, lo que bien pudiera haber enmascarado las alteraciones de la hemostasia habituales en este tipo de leucemia; aún así, en los días previos al tratamiento detectamos signos de fibrinólisis.

El antecedente de una artritis reumatoide tratada con metotrexato y la presencia de una del 5q en el cariotipo nos permiten especular con la posible existencia de una mielodisplasia previa al desarrollo de la leucemia o relacionar ambas enfermedades. En este sentido, no tenemos datos que demuestren la primera posibilidad y, por otra parte, la mayoría de los estudios que han investigado la asociación de enfermedades autoinmunes y sus tratamientos con la leucemia mieloide aguda han descrito un incremento del riesgo de desarrollarla que, sin embargo, no alcanza significación estadística, por lo que etiquetar a estas leucemias como leucemia mie-

loide aguda relacionada con terapia (t-LMA) no parece, de momento, apropiado<sup>(9)</sup>.

El diagnóstico morfológico de la LPA de morfología variante es siempre complejo, y en la literatura muchos de los casos fueron descritos como intermedios entre LMA-M2 y M3 de la clasificación FAB<sup>(7)</sup> y los blastos, definidos como células bloqueadas en un estadio intermedio promielocito-mielocito, con un núcleo de apariencia madura y cromatina condensada, así como presencia de rasgos displásicos asociados (hipogranulación, hiposegmentación del núcleo); la descripción de los blastos que hace la clasificación de la OMS de 2008 no difiere mucho de esas descripciones iniciales<sup>(10)</sup>.

Sin embargo, el perfil inmunofenotípico de la LPA es independiente de las variaciones citogenéticas subyacentes, de manera que es una herramienta rápida e imprescindible para el diagnóstico<sup>(11)</sup>, que por supuesto se debe completar con los estudios citogenéticos y moleculares.

### Para recordar

- Las leucemias promielocíticas agudas con t(11;17) (q23;q21) son poco frecuentes. Su morfología es muy peculiar y ha sido descrita como intermedia entre LMA M2 y M3 con rasgos displásicos severos. Su fenotipo, sin embargo, es indistinguible de la LPA con t(15;17).
- Las técnicas citogenéticas y moleculares son imprescindibles para poder llevar a cabo correctamente el diagnóstico.
- La experiencia terapéutica en esta entidad es escasa.

### Bibliografía

1. Jovanovic JV, Rennie K, Culligan D, Peniket A, Lennard A, Harrison J, et al. Development of real-time quantitative poly-

merase chain reaction assays to track treatment response in retinoid resistant acute promyelocytic leukemia. *Frontiers in oncology* 2011; 35: 1-8.

2. Suliman BA, Xu D, Williams BR. The promyelocytic leukemia zinc finger protein: two decades of molecular oncology. *Front Oncol* 2012; 2: 74.
3. Guidez F, Parks S, Wong H, Jovanovic JV, Mays A, Gilkes AF, et al. RAR-PLZF overcomes PLZF-mediated repression of CRABPI, contributing to retinoid resistance in t(11;17) acute promyelocytic leukemia. *PNAS* 2007; 20: 18694-99.
4. Grimwade D, Biondi A, Mozziconacci MJ, Hagemeijer A, Berger R, Neat M, et al.; on behalf of Groupe Français de Cytogénétique Hematologique, Groupe Français d'Hematologie Cellulaire, UK Cancer Cytogenetics Group, and BIOMED 1 European Community-Concerted. Action "Molecular Cytogenetic Diagnosis in Haematological Malignancies" Characterization of acute promyelocytic leukemia cases lacking the classic t(15;17): results of the European Working Party. *Blood* 2000; 96: 1297-308.
5. Rohr SS, Flores Pelloso LA, Borgo A, De Nadai LC, Yamamoto M, Rego EM, et al. Acute promyelocytic leukemia associated with the PLZF-RARA fusion gene: two additional cases with clinical and laboratorial peculiar presentations. *Med Oncol* 2011; DOI10.1007/s12032-011-0147-y 6.
6. Cassinat B, Guillemot I, Moluçon-Chabrot C, Zassadowski F, Fenaux P, Tournilhac O, Chomienne C. Favourable outcome in an APL patient with PLZF/RARalpha fusion gene: quantitative real-time RT-PCR confirms molecular response. *Haematologica* 2006; 91: e158-e159.
7. Licht JD, Chomienne C, Goy A, Chen A, Scott AA, Head DR, et al. Clinical and molecular characterization of a rare syndrome of acute promyelocytic leukemia associated with translocation (11; 17). *Blood* 1995; 85: 1083-94.
8. Jansen JH, de Ridder MC, Geertsma MC, Erpelinck CA, van Lom K, Smit EM, et al. Complete remission of t(11;17) positive acute promyelocytic leukemia induced by all-trans retinoic acid and granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1999; 94: 39-45.
9. Ramadan SM, Fouad TM, Summa V, Hasan SK, Lo-Coco F. Acute myeloid leukemia developing in patients with autoimmune diseases. *Haematologica* 2012; 97: 805-17.
10. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. *World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Vol 2. Geneva (Switzerland) WHO Press; 2008.
11. Dong HY, Kung JX, Bhardwaj V, McGill J. Flow cytometry rapidly identifies all acute promyelocytic leukemias with high specificity independent of underlying cytogenetic abnormalities. *Am J Pathol* 2011; 135: 76-84.