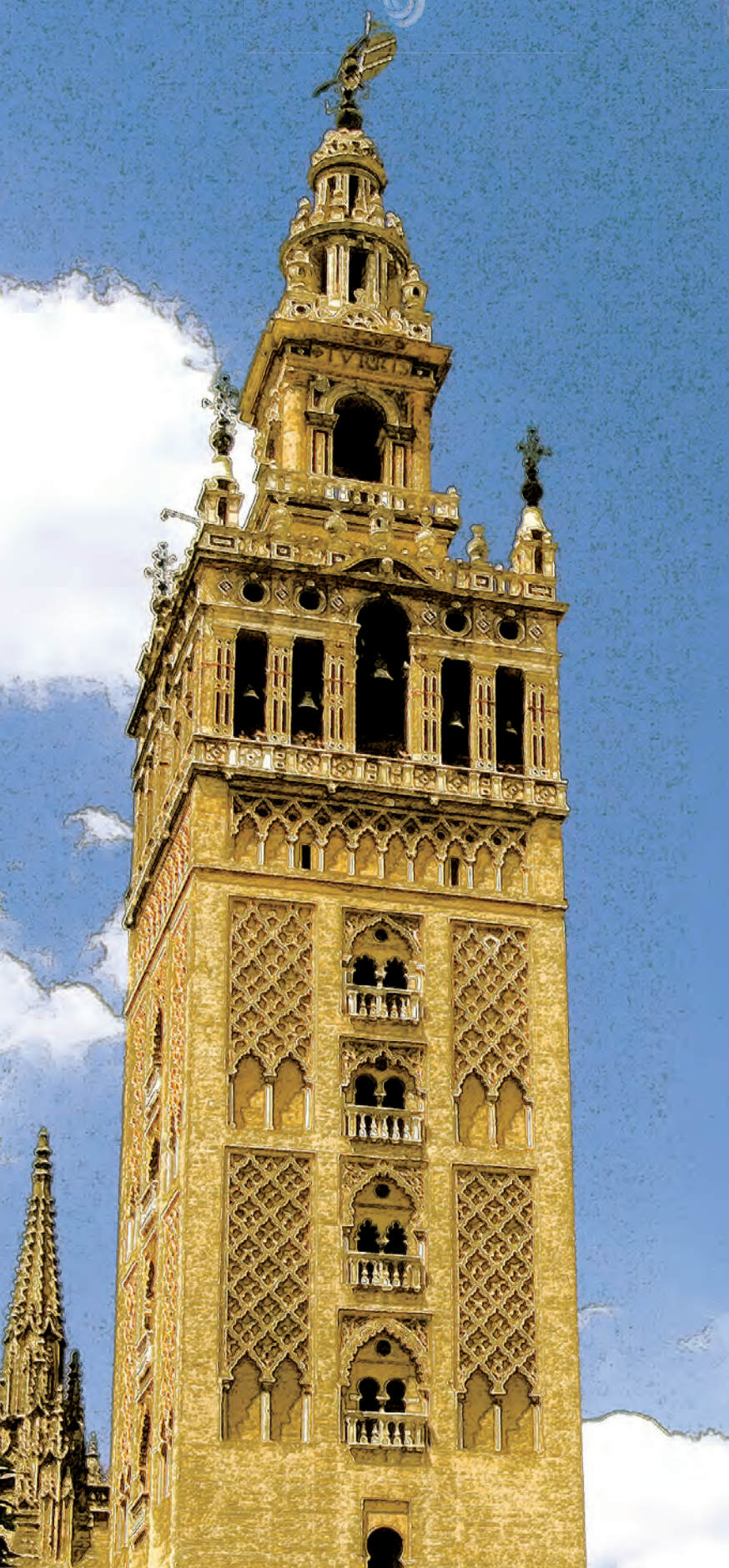


NO DO



Palacio de Congresos 17-19 octubre

SEVILLA 2013

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

# Programa Educativo

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 Exposiciones y  
Congresos (FIBES)



Edita:



grupoacciónmédica

Grupo Acción Médica, S.A.  
c/ Ríos Rosas, 51 - 2.º izqda. 28003 Madrid  
Telf.: 91 536 08 14 · Fax: 91 536 06 07  
c/ Balcells, 21-25, bajos, local 1. 08024 Barcelona  
Telf.: 93 285 75 55 · Fax: 93 285 75 56

Depósito legal: M-27035-2013

# PROGRAMA EDUCACIONAL

**Coordinadores:** **José Luis Díez Martín (SEHH)**  
*Servicio de Hematología.  
Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid*

**Pascual Marco Vera (SETH)**  
*Servicio de Hematología.  
Hospital General Universitario de Alicante*



# Sumario

---

<b>Bases moleculares de las hemopatías malignas</b> . . . . .	<b>1</b>
Xose Antón Suárez Puente	
<hr/>	
<b>Diagnóstico del déficit de vitamina B<sub>12</sub>-folato: papel de la homocisteína, el ácido metilmalónico y la holotranscobalamina</b> . . . . .	<b>2</b>
Ángel F. Remacha, Edgar Zapico, M. <sup>a</sup> Pilar Sarda, Joan Remacha, Josep M. Queraltó	
<hr/>	
<b>Leucemia linfática crónica</b> . . . . .	<b>7</b>
Francesc Bosch, Sabela Bobillo, Julia Montoro, Laura Fox, Andrés López, David Valcárcel, Olga Salamero, Pere Barba, Merche Gironella, Ana Marín, Pau Abrisqueta, Marta Crespo, Noelia Purroy, Cecilia del Carpio	
<hr/>	
<b>Tratamiento actual de las infecciones fúngicas invasoras en pacientes hematológicos</b> . . . . .	<b>13</b>
Ildefonso Espigado, Manuela Aguilar	
<hr/>	
<b>Papel de la PET/TC en el diagnóstico y seguimiento de las hemopatías malignas</b> . . . . .	<b>20</b>
Xavier Setoain	
<hr/>	
<b>Uso de factores de crecimiento en la medicina transfusional</b> . . . . .	<b>24</b>
María Luisa Lozano, Pastora Iniesta, José Rivera, Vicente Vicente	
<hr/>	
<b>La beta-2-glicoproteína en la patogénesis del síndrome antifosfolípido</b> . . . . .	<b>31</b>
Víctor Arqueros, Chari López-Pedreira, Francisco Velasco	
<hr/>	
<b>Manejo hemostático de la hemorragia crítica</b> . . . . .	<b>37</b>
Enric Contreras, Rafael Parra	
<hr/>	
<b>Hemofilia adquirida</b> . . . . .	<b>42</b>
Pascual Marco, Tamara López, Ángel Giménez, María Jiménez	
<hr/>	
<b>El nicho hematopoyético como diana terapéutica</b> . . . . .	<b>48</b>
Simón Méndez-Ferrer	



# Bases moleculares de las hemopatías malignas

XOSE ANTÓN SUÁREZ PUENTE

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Oviedo.*

*Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA)*

---

## Introducción

Tumor transformation is known to arise from the progressive accumulation of mutations in the genome. The subsequent progression of the disease is largely influenced by the specific alterations accumulated in the tumor genomes, as well as the evolution of tumor populations, their response to specific therapies and the emergence of resistant clones. The recent development of Next Generation Sequencing technologies has made possible to determine the genetic alterations present in a tumor genome, as well as their evolution during disease progression and after treatment. These technologies offer the opportunity to determine the complete sequence of a tumor genome by using whole-genome sequencing, or just the sequence of the more than 20,000 genes by using whole-exome sequencing. The recent application of either whole genome or whole-exome sequencing

to the study of hematological tumors has revolutionized our understanding of the disease, with the identification of novel oncogenes and tumor suppressors involved in the development of these pathologies. Some of these alterations constitute novel prognostic factors with important implications in the clinical management of the patients. In addition, the characterization of driver genes, whose mutations are involved in the oncogenic transformation, represents novel diagnostic markers that might help in patient stratification, as well as provides novel pharmacological targets for the design of more specific therapies. The stratification of patients based on their tumor's genome profile will also benefit the design of more accurate clinical trials aimed at targeting patients with tumors caused by the same genomic alterations. Together, novel sequencing technologies constitute an important advantage for the study and management of oncologic pathologies.

# Diagnóstico del déficit de vitamina B<sub>12</sub>-folato: papel de la homocisteína, el ácido metilmalónico y la holotranscobalamina

ÁNGEL F. REMACHA, EDGAR ZAPICO, M.<sup>a</sup> PILAR SARDA, JOAN REMACHA, JOSEP M. QUERALTÓ  
 Servicios de Hematología, Laboratorio y Bioquímica.  
 Hospital Sant Pau. Barcelona

## Introducción

Clásicamente, el déficit de factores de maduración (vitamina B<sub>12</sub> y ácido fólico) se ha asociado a una **anemia megaloblástica** basándose en la anomalía morfológica característica de la serie eritroide; pero que también afecta a las restantes series hematopoyéticas. Típicamente, produce una anemia macrocítica más o menos marcada. El diagnóstico y tratamiento de esta forma de déficit de vitamina B<sub>12</sub> o de ácido fólico es relativamente sencillo<sup>(1)</sup>.

Sin embargo, el déficit de vitamina B<sub>12</sub> y, en menor medida, de folato produce clínica neurológica. Entonces es más difícil el diagnóstico, sobre todo cuando las alteraciones hematológicas no son prominentes, lo que es muy frecuente. Además, el déficit de vitamina B<sub>12</sub> se asocia a otros tipos de anemia, sobre todo con la anemia ferropénica, lo que complica su estudio<sup>(1-3)</sup>.

En otro sentido, se han observado disminuciones de vitamina B<sub>12</sub> en numerosas situaciones, siendo un verdadero reto clínico diferenciar si hay o no un déficit. En estos casos el estudio de los metabolitos alterados en su metabolismo es esencial<sup>(1,2)</sup>.

En este trabajo, se comentarán algunos aspectos de la evaluación de estos metabolitos y su papel en el estudio de las diferentes formas de presentación clínica de los déficits de factores de maduración, sobre todo de la vitamina B<sub>12</sub>.

## Metabolitos de la vitamina B<sub>12</sub>-folato

El folato interviene en numerosas reacciones metabólicas. Es de especial interés su papel en la síntesis de timidina y, por lo tanto, en la síntesis del ADN; por esta razón, en el déficit de folato aparece una anemia megaloblástica. Cuando esta reacción bioquímica se produce de forma adecuada (paso de 5-metil-tetrahidrofolato a tetrahidrofolato), la homocisteína (Hcy) se transforma en metionina, reacción que es mediada por la metionina sintetasa, cuyo cofactor es la vitamina B<sub>12</sub> en su isoforma metilcobalamina. Por ello, en caso de un déficit de folato y de vitamina B<sub>12</sub>, como la reacción anterior no se produce de forma adecuada, se eleva la Hcy que podemos cuantificar<sup>(1,2)</sup> (Figuras 1 y 2). Existen múltiples metodologías para medir Hcy, varias automatizadas en los autoanalizadores más comunes. Es decir, la medición de Hcy es fácilmente accesible y está disponible en la mayoría de los laboratorios<sup>(2,4)</sup>.

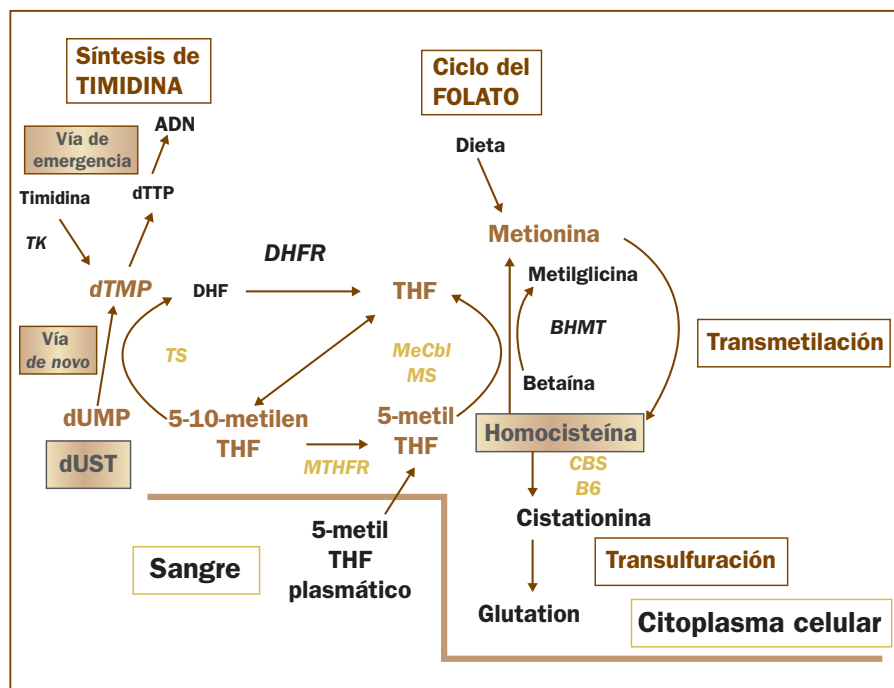


Figura 1. Metabolismo celular de la vitamina B<sub>12</sub> y del folato. Ciclo del folato.

CBS: cistationin-beta-sintetasa; DHF: dihidrofolato; DHFR: dihidrofolato reductasa; dTMP: d-timidin monofosfato; dTTP: d-timidin trifosfato; dUMP: d-uridin monofosfato; dUST: d-uridin suppression test; MeCbl: metilcobalamina; MS: metionina sintetasa; MTHFR: metilen THF reductasa; THF: tetrahidrofolato; TK: timidin kinasa; TS: timidin sintetasa.



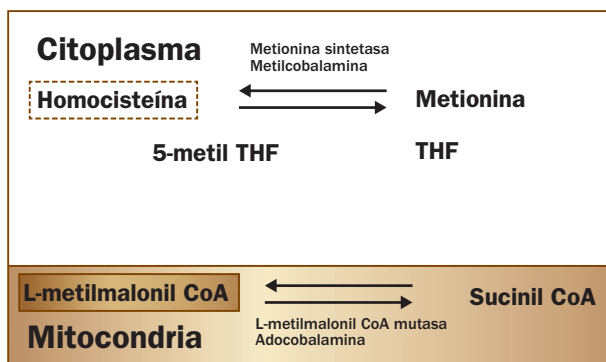


Figura 2. Papel de la vitamina B<sub>12</sub> en el metabolismo de la homocisteína y el ácido metilmalónico.

Sin embargo, a nivel mitocondrial, la isoforma adenosilcobalamina de la vitamina B<sub>12</sub> interviene en el ciclo del ácido tricarboxílico (paso de L-metilmalónil CoA a succinil CoA). En caso de déficit de vitamina B<sub>12</sub>, esta reacción no se produce de forma adecuada y se acumula ácido metilmalónico (AMM) que podemos medir<sup>(1,2)</sup>. Por lo tanto, la elevación de AMM no se produce en el déficit de folato, pero sí en el de vitamina B<sub>12</sub>; de ahí su mayor especificidad (Figura 2). A diferencia de la accesibilidad de la medición de la Hcy, la metodología para medir AMM es bastante más complicada (espectrometría de masas y cromatografía de gases), no está automatizada y sólo está disponible en muy pocos laboratorios<sup>(2,4)</sup>.

Por lo tanto, en un déficit de vitamina B<sub>12</sub> se elevan ambos metabolitos, la Hcy y el AMM. En cambio, en el déficit de folato sólo se eleva la Hcy. El test de síntesis de timidina (*d-uridine suppression test*) también permite comprobar la existencia de ambos déficits y diferenciarlos, pero al tener que realizarse en médula ósea y ser una prueba isotópica, prácticamente no se utiliza actualmente. Existe una excelente concordancia entre la Hcy y el AMM cuando se estudian alteraciones del metabolismo de la vitamina B<sub>12</sub> exclusivamente<sup>(1,2,4)</sup>.

### Holotranscobalamina

En el plasma, la vitamina B<sub>12</sub> circula unida a unos transportadores específicos: la cobalofilina, también llamada R-binder, haptocorrina y transcobalaminas 1 y 3; y la transcobalamina o transcobalamina 2. Aproximadamente un 75% de la vitamina B<sub>12</sub> circulante se une a la cobalofilina (holocobalofilina); el resto se une a la transcobalamina (holotranscobalamina, holo-TC). La holo-TC es captada por su receptor celular específico y es la forma activa que se incorpora a nivel del metabolismo celular, de ahí el interés de evaluar la holo-TC como forma activa de vitamina B<sub>12</sub> desde hace décadas<sup>(1,2,4-7)</sup>.

### Los niveles de vitamina B<sub>12</sub> sérica

La prueba clave para evaluar el metabolismo de la vitamina B<sub>12</sub> sigue siendo su medición en el suero, a pesar de sus inconvenientes<sup>(1,2,4)</sup>.

Por una parte, encontrar un nivel bajo de vitamina B<sub>12</sub> (vitamina B<sub>12</sub> sérica < 150 pmol/L) no significa automáticamente que exista un déficit; pueden existir disminuciones de la vitamina B<sub>12</sub> sin que exista un déficit real demostrado de esta vitamina<sup>(2-4)</sup>. Esto sucede especialmente en casos de anemia ferropénica<sup>(8)</sup>, en el embarazo<sup>(1,2)</sup>, en los pacientes VIH<sup>(9)</sup>, en déficits congénitos o adquiridos de cobalofilina<sup>(1,2)</sup>, en polimorfismos del gen de la fucosiltransferasa 2 (FUT2)<sup>(10,11)</sup>, etc.

En otro sentido, por encima del dintel teórico de deficiencia hay una zona gris (entre 150 y 200 o 250 pmol/L) en la que puede existir un déficit de esta vitamina en aproximadamente un 25-50% de los casos; es especialmente importante este dato en determinadas poblaciones, sobre todo en pacientes ancianos<sup>(1,2,4,12)</sup>, con problemas tromboembólicos<sup>(12-16)</sup> o en pacientes neuropsiquiátricos (demencia)<sup>(12,17-22)</sup>.

Por último, las metodologías que se usan para evaluar los niveles de vitamina B<sub>12</sub> pueden artefactuarse

Tabla 1. Formas de presentación clínica de las megaloblastosis

	Clásica	Enmascarada	Descompensación aguda	Megaloblastosis aguda	Atípica/subclínica
Sangre periférica	Megaloblastosis y anemia macrocítica	Anemia micro- o normocítica	Anemia macrocítica Trombocitopenia severa	Trombocitopenia o leucopenia severas	Normal
Factores de maduración	Disminuidos	Disminuidos	Disminuidos	Normales	Disminuidos o normales
Médula ósea	Megaloblastosis	Megaloblastosis ±	Megaloblastosis	Megaloblastosis	Megaloblastosis ±
Test de síntesis de timidina Homocisteína/ metilmalónico	Patológico y específico	Patológico ± específico	Patológico Específico	Patológico Específico	Patológico Específico
Periodo	Meses-años	Variable	1-3 semanas	1-3 semanas	Meses-años
Ejemplo	Anemia perniciosa	Ferropenia y anemia perniciosa	Anemia perniciosa e infección	Hepatopatía y tratamiento con triamterene	¿Defectos tubo neural, trombosis, demencia, etc.?

por la presencia de anticuerpos antifactor intrínseco<sup>(23)</sup> o por la formación de inmunocomplejos con las proteínas transportadores de la vitamina B<sub>12</sub><sup>(24)</sup>.

### Formas de presentación clínica de los déficits de factores de maduración

En la **Tabla 1** se resumen las diferentes formas de presentación clínica de estos déficits. La forma clásica de presentación como anemia macrocítica, cuyo prototipo sería la anemia perniciosa, o las formas de presentación aguda que se manifiestan con una pancitopenia de desarrollo rápido (asociada a la administración de fármacos inhibidores del folato, anestesia con óxido nitroso, etc., en un paciente con alguna patología previa) no se tratarán en este trabajo<sup>(1)</sup>.

La macrocitosis, el signo guía de la megaloblastosis, suele estar ausente en la neuropatía<sup>(25)</sup> por déficit de vitamina B<sub>12</sub> y siempre está ausente en la anemia megaloblástica enmascarada<sup>(7)</sup>. Incluso puede existir microcitosis. El caso más paradigmático sería la coexistencia de una anemia ferropénica y una anemia perniciosa, lo que es frecuente<sup>(3,7)</sup>. En la anemia ferropénica se puede encontrar una vitamina B<sub>12</sub> baja o en la zona gris en un 20% de los casos<sup>(7)</sup>. Como en la anemia ferropénica puede haber una vitamina B<sub>12</sub> baja sin un déficit real, en este caso la cuestión es si además de la ferropenia hay un déficit de vitamina B<sub>12</sub> o no. Es importante conocer si existe un déficit combinado, pues la orientación diagnóstica etiológica es diferente a la ferropenia aislada. La elevación de los metabolitos de la vitamina B<sub>12</sub> permite evaluar las dos situaciones<sup>(2,3,7)</sup>. Tiene un especial valor la Hcy por su fácil acceso<sup>(7)</sup>.

Dada la elevada frecuencia de la hipovitaminemia B<sub>12</sub> en la anemia ferropénica, la siguiente pregunta es si se debería realizar la determinación de los factores de maduración en todas las anemias ferropénicas. Esto implica un importante coste y muchas determinaciones innecesarias. Recientemente un estudio ha confirmado que se debería determinar la vitamina B<sub>12</sub> y anemia ferropénica en las personas más de 60 años, pues este punto de corte de edad tiene una alta sensibilidad para los casos con anemia ferropénica y déficit de vitamina B<sub>12</sub> (vitamina B<sub>12</sub> baja o en la zona gris e hiper-Hcy), aunque su especificidad es de aproximadamente un 20%<sup>(7)</sup>. Se precisan más estudios para comprobar la utilidad de ese punto de corte de la edad.

En las neuropatías la situación es muy similar, pero son mucho más infrecuentes. El estudio de los metabolitos nos pondrá de manifiesto el déficit en los casos con vitamina B<sub>12</sub> baja o en la zona gris<sup>(25)</sup>.

La forma de presentación subclínica (*subclinical cobalamin deficiency*) del déficit de vitamina B<sub>12</sub><sup>(1,2,12,26)</sup> se caracteriza porque los pacientes no presentan una sintomatología típica del déficit clínico de vitamina B<sub>12</sub>,

pero el estudio de laboratorio (metabolitos, test de síntesis de timidina, etc.) demuestra la presencia de un déficit de la vitamina<sup>(2,26)</sup>. En la mayoría de los casos las cifras de vitamina B<sub>12</sub> están en la zona gris (entre 150 y 200 pmol/L) o niveles muy próximos. Suelen ser personas de avanzada edad, y hasta en la mitad de los casos se observa una malabsorción de la vitamina B<sub>12</sub> unida a los alimentos (*food-vitamin B<sub>12</sub> malabsorption*)<sup>(12,26)</sup>. Su prevalencia es alta, como se ha comprobado recientemente en el estudio NHANES, que lo ha evaluado<sup>(27,28)</sup>. Queda por investigar cuál es su importancia clínica en relación con patologías como la demencia, la enfermedad tromboembólica, el envejecimiento, etc.

El déficit subclínico de vitamina B<sub>12</sub> es, pues, un problema de salud pública<sup>(2,27,28)</sup>, ya que un 5-15% de los pacientes mayores tienen la vitamina B<sub>12</sub> baja o en la zona gris, y en esa misma franja de edad la anemia perniciosa supone sólo el 2%. Del resto, muchos serían casos de déficit subclínico, pues los metabolitos están alterados<sup>(2)</sup>. Queda por determinar el papel de la malabsorción descrita antes, de determinados fármacos, como la metformina o el omeprazol, del *Helicobacter pylori*<sup>(2,29)</sup>, etc. Como se puede comprender, es esencial el estudio de los metabolitos para el diagnóstico del déficit subclínico y diferenciarlas de las hipovitaminemias B<sub>12</sub> no deficitarias. Un problema añadido es que muchas de estas personas de edad tienen insuficiencia renal, que eleva tanto la Hcy como el AMM; aunque en menor medida<sup>(2,4,25,26)</sup>. Probablemente el uso de diferentes puntos de corte diagnóstico en caso de insuficiencia renal podrían solventar en parte este problema diagnóstico.

### Déficit de vitamina B<sub>12</sub> subclínico y demencia

Varios estudios han comprobado una relación entre el deterioro progresivo de las capacidades cognitivas y alteraciones de los factores de maduración, especialmente de la vitamina B<sub>12</sub><sup>(7,17,20-22)</sup>. Se ha encontrado relación con los niveles de AMM, Hcy, vitamina B<sub>12</sub>, holo-TC y folato<sup>(17,20-22)</sup>.

Se han realizado intervenciones terapéuticas en grupos limitados de pacientes, suplementado con vitamina B<sub>12</sub> y/o folato a poblaciones en riesgo<sup>(18,19,22)</sup>. Los estudios no han sido capaces de demostrar de forma convincente si la suplementación provoca una mejoría en la capacidad cognitiva de los pacientes suplementados<sup>(18,19,22)</sup>. Algunos autores han cuestionado la utilidad de la suplementación con vitamina B<sub>12</sub>, dadas las especiales características de su metabolismo<sup>(30)</sup>.

En todo caso, ante un paciente con alteraciones cognitivas y en el que el estudio de laboratorio demuestre la presencia del déficit, hay que tratarlo y valorar la respuesta hematológica y neurológica. Son numerosos los casos en los que se observa una mejoría.

## **Déficit de vitamina B<sub>12</sub> y enfermedad tromboembólica (ETE)**

Desde hace varias décadas se conoce la relación entre hiper-Hcy y ETE<sup>(13-16)</sup>. Entre un 20% y un 25% de los pacientes con ETE presentan hiper-Hcy<sup>(16)</sup>. Esto llevó a realizar numerosos estudios con suplementación oral con folato y/o vitamina B<sub>12</sub> y/o vitamina B<sub>6</sub> en decenas de miles de personas<sup>(15)</sup>. Los resultados han demostrado que no hubo disminución de la ETE, aunque la Hcy disminuyó<sup>(13)</sup>. Sin embargo, en algunos metaanálisis recientes, incluyendo resultados de los últimos estudios con suplementación elevada oral de vitamina B<sub>12</sub> ( $\geq 1-2$  mg de vitamina B<sub>12</sub> por vía oral), sí parece observarse un cierto efecto protector sobre el accidente vascular cerebral<sup>(14,15)</sup>.

Se han reportado casos clínicos con déficit de vitamina B<sub>12</sub> por diferentes causas y ETE, estudios retrospectivos que demuestran una relación entre ETE y déficit de vitamina B<sub>12</sub> (un 20% de los casos con déficit de vitamina B<sub>12</sub> presentan ETE, y en la mayoría el diagnóstico es simultáneo) y estudios prospectivos de casos y controles en ambiente hospitalario en los que se demostró la moderada relación entre los niveles de vitamina B<sub>12</sub> y ETE. En un 17% de los casos con ETE hubo hipovitaminemia B<sub>12</sub>, observándose una disminución de la vitamina B12 en el 70% de los casos con hiper-Hcy y ETE. Además, en la mayoría la hiper-Hcy coincidía con una elevación del AMM, lo que confirmaba el déficit de vitamina B<sub>12</sub>. En el 80% de los casos con hiper-Hcy y ETE había un déficit de vitamina B<sub>12</sub> y/o insuficiencia renal, que serían la causa de la moderada hiper-Hcy. Cuando se investigó la causa del déficit de vitamina B<sub>12</sub> se objetivó una malabsorción. En la mayoría no había clínica relacionada con el déficit de vitamina B<sub>12</sub> (no tenían ni anemia ni macrocitosis)<sup>(16)</sup>.

Es decir, el déficit de vitamina B<sub>12</sub> es relativamente frecuente que en los casos con ETE y se relaciona con la hiper-Hcy. Parece existir una moderada relación entre el déficit de vitamina B<sub>12</sub> y la ETE. Queda por determinar cuál es realmente su posible papel en la ETE, pues dada la prevalencia del déficit de vitamina B<sub>12</sub> en la ETE se precisaría un número muy elevado de casos para demostrar su efecto protector. Quizás los estudios de seguimiento de estos pacientes puedan aclarar este aspecto.

## **Holotranscobalamina y déficit de vitamina B<sub>12</sub>**

La posible utilidad clínica de evaluar la holo-TC (vitamina B<sub>12</sub> “activa”) fue propuesta hace varias décadas, en un modelo que recordaba al de las fases de la ferropenia<sup>(31)</sup>. La disminución de la holo-TC, teóricamente, marcaría el comienzo de un estado vitamina B<sub>12</sub> deficitario<sup>(3,5)</sup>. Sin embargo, las metodologías antiguas no

permitían medir adecuadamente la holo-TC<sup>(2,4)</sup>, pero con la aparición de anticuerpos específicos se han superado estos problemas y hay disponibles metodologías comerciales para evaluar la holo-TC<sup>(5-7)</sup>.

Los resultados obtenidos con la holo-TC son controvertidos, mientras que varios estudios parecen demostrar que la holo-TC superaría a la determinación de la vitamina B<sub>12</sub> sérica como estudio inicial del metabolismo de esta vitamina, pues la holo-TC marcaría un estadio más inicial del déficit<sup>(5-7)</sup>. Sin embargo, otros no han encontrado grandes diferencias entre estudiar los niveles de vitamina B<sub>12</sub> o la holo-TC<sup>(21)</sup>. Algunos estudios han observado una falta de especificidad, pues se observan valores bajos de holo-TC en diferentes tipos de anemias (déficit de folato, déficit de hierro, diseritropoyesis, etc.)<sup>(32,33)</sup>. La automatización de esta metodología, que permite su generalización, sin duda aclarará el papel clínico de la determinación de la holo-TC.

Se ha desarrollado, midiendo la holo-TC antes y después de un tratamiento con vitamina B<sub>12</sub> oral, un test para valorar la absorción de la vitamina B<sub>12</sub> que podría sustituir al test de Schilling<sup>(34)</sup>.

## **Bibliografía**

1. Remacha A. Anemia carencial por déficit de factores vitamínicos. En: García-Conde J. Hematología. Madrid: Aran; 2003. pp. 201-18.
2. Carmel R. Biomarkers of cobalamin (vitamin B-12) status in the epidemiologic setting: a critical overview of context, applications, and performance characteristics of cobalamin, methylmalonic acid, and holotranscobalamin II. *Am J Clin Nutr* 2011; 94: 348S-58S.
3. Carmel R. How I treat cobalamin (vitamin B12) deficiency. *Blood* 2008; 112: 2214-21.
4. Green R. Indicators for assessing folate and vitamin B-12 status and for monitoring the efficacy of intervention strategies. *Am J Clin Nutr* 2011; 94 (suppl): 666S-72S.
5. Nexø E, Hoffmann-Lücke E. Holotranscobalamin, a marker of vitamin B-12 status: analytical aspects and clinical utility. *Am J Clin Nutr* 2011; 94: 359S-65S.
6. Heil SG, de Jonge R, de Rotte MC, van Wijnen M, Heiner-Fokkema RM, Kobold AC, et al. Screening for metabolic vitamin B12 deficiency by holotranscobalamin in patients suspected of vitamin B12 deficiency: a multicentre study. *Ann Clin Biochem* 2012; 49 (Pt 2): 184-9.
7. Schrempf W, Eulitz M, Neumeister V, Siegert G, Koch R, Reichmann H, et al. Utility of measuring vitamin B12 and its active fraction, holotranscobalamin, in neurological vitamin B12 deficiency syndromes. *J Neurol* 2011; 258: 393-401.
8. Remacha AF, Sardà MP, Canals C, Queralto JM, Zapico E, Remacha J, et al. Combined cobalamin and iron deficiency anemia: a diagnostic approach using a model based on age and homocysteine assessment. *Ann Hematol* 2013; 92: 527-31.
9. Remacha AF, Cadafalch J. Cobalamin deficiency in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Semin Hematol* 1999; 36: 75-87.
10. Hazra A, Kraft P, Selhub J, Giovannucci EL, Thomas G, Hoover RN, et al. Common variants of FUT2 are associated with plasma vitamin B12 levels. *Nat Genet* 2008; 40: 1160-2.
11. Lin X, Lu D, Gao Y, Tao S, Yang X, Feng J, et al. Genome-wide association study identifies novel loci associated with

- serum level of vitamin B12 in Chinese men. *Hum Mol Genet* 2012; 21: 2610-7.
12. David Smith A, Refsum H. Do we need to reconsider the desirable blood level of vitamin B12? *J Intern Med* 2012; 271: 179-82.
  13. Martí-Carvajal AJ, Solà I, Lathyris D, Karakitsiou DE, Simancas-Racines D. Homocysteine-lowering interventions for preventing cardiovascular events. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; 1: CD006612.
  14. Yang HT, Lee M, Hong KS, Ovbiagele B, Saver JL. Efficacy of folic acid supplementation in cardiovascular disease prevention: an updated meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur J Intern Med* 2012; 23: 745-54.
  15. Huang T, Chen Y, Yang B, Yang J, Wahlqvist ML, Li D. Meta-analysis of B vitamin supplementation on plasma homocysteine, cardiovascular and all-cause mortality. *Clin Nutr* 2012; 31: 448-54.
  16. Remacha AF, Souto JC, Piñana JL, Sardà MP, Queraltó JM, Martí-Fabregas J, et al. Vitamin B12 deficiency, hyperhomocysteinemia and thrombosis: a case and control study. *Int J Hematol* 2011; 93: 458-64.
  17. Schrempf W, Eulitz M, Neumeister V, Siegert G, Koch R, Reichmann H, et al. Utility of measuring vitamin B12 and its active fraction, holotranscobalamin, in neurological vitamin B12 deficiency syndromes. *J Neurol* 2011; 258: 393-401.
  18. Hoey L, Strain JJ, McNulty H. Studies of biomarker responses to intervention with vitamin B-12: a systematic review of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2009; 89 (suppl): 1981S-96S.
  19. Malouf R, Grimley Evans J. Folic acid with or without vitamin B12 for the prevention and treatment of healthy elderly and demented people. *Cochrane Database Syst Rev* 2008; (4): CD004514.
  20. Hooshmand B, Solomon A, Kåreholt I, Rusanen M, Hänninen T, Leiviskä J, et al. Associations between serum homocysteine, holotranscobalamin, folate and cognition in the elderly: a longitudinal study. *J Intern Med* 2012; 271: 204-12.
  21. Robinson DJ, O'Luanaigh C, Tehee E, O'Connell H, Hamilton F, Chin AV, et al. Associations between holotranscobalamin, vitamin B12, homocysteine and depressive symptoms in community-dwelling elders. *Int J Geriatr Psychiatry* 2011; 26: 307-13.
  22. Vogel T, Dali-Youcef N, Kaltenbach G, Andrès E. Homocysteine, vitamin B12, folate and cognitive functions: a systematic and critical review of the literature. *Int J Clin Pract* 2009; 63: 1061-7.
  23. Carmel R, Agrawal YP. Failures of cobalamin assays in pernicious anemia. *N Engl J Med* 2012; 367: 385-6.
  24. Yang DT, Cook RJ. Spurious elevations of vitamin B12 with pernicious anemia. *N Engl J Med* 2012; 366: 1742-3.
  25. Stabler SP. Vitamin B12 deficiency. *N Engl J Med* 2013; 368: 149-60.
  26. Carmel R. Subclinical cobalamin deficiency. *Curr Opin Gastroenterol* 2012; 28: 151-8.
  27. Bailey RL, Carmel R, Green R, Pfeiffer CM, Cogswell ME, Osterloh JD, et al. Monitoring of vitamin B-12 nutritional status in the United States by using plasma methylmalonic acid and serum vitamin B-12. *Am J Clin Nutr* 2011; 94: 552-61.
  28. Yetley EA, Pfeiffer CM, Phinney KW, Bailey RL, Blackmore S, Bock JL, et al. Biomarkers of vitamin B-12 status in NHANES: a roundtable summary. *Am J Clin Nutr* 2011; 94: 313S-321S.
  29. Hershko C, Skikne B. Pathogenesis and management of iron deficiency anemia: emerging role of celiac disease, helicobacter pylori, and autoimmune gastritis. *Semin Hematol* 2009; 46: 339-50.
  30. Carmel R. Mandatory fortification of the food supply with cobalamin: an idea whose time has not yet come. *J Inherit Metab Dis* 2011; 34: 67-73.
  31. Herbert V. Staging vitamin B-12 (cobalamin) status in vegetarians. *Am J Clin Nutr* 1994; 59 (5 Suppl): 1213S-22S.
  32. Wickramasinghe SN, Ratnayaka ID. Limited value of serum holo-transcobalamin II measurements in the differential diagnosis of macrocytosis. *J Clin Pathol* 1996; 49: 755-8.
  33. Goringe A, Ellis R, McDowell I, Vidal-Alaball J, Jenkins C, Butler C, Worwood M. The limited value of methylmalonic acid, homocysteine and holotranscobalamin in the diagnosis of early B12 deficiency. *Haematologica* 2006; 91: 231-4.
  34. Hvas AM, Morkbak AL, Hardlei TF, Nexø E. The vitamin B12 absorption test, CobaSorb, identifies patients not requiring vitamin B12 injection therapy. *Scand J Clin Lab Invest* 2011; 71: 432-8.

## Leucemia linfática crónica

FRANCESC BOSCH, SABELA BOBILLO, JULIA MONTORO, LAURA FOX, ANDRÉS LÓPEZ, DAVID VALCÁRCCEL, OLGA SALAMERO, PERE BARBA, MERCHE GIRONELLA, ANA MARÍN, PAU ABRISQUETA, MARTA CRESPO, NOELIA PURROY, CECILIA DEL CARPIO  
*Servicio de Hematología. Hospital Universitario Vall d'Hebron. Barcelona*

### Introducción

La leucemia linfática crónica (LLC) es un síndrome linfoproliferativo crónico caracterizado por la proliferación y acúmulo de linfocitos de estirpe B en sangre periférica y órganos hematopoyéticos. La LLC constituye la leucemia más frecuente de la población adulta de los países occidentales, con una incidencia de 4 casos por 100.000 habitantes/año. La mediana de edad al diagnóstico es de 72 años, únicamente una tercera parte de los casos se diagnostica antes de los 45 años de edad y es más prevalente en varones<sup>(1,2)</sup>. Para su diagnóstico se requiere la presencia durante más de 6 meses de 5.000/ $\mu$ L linfocitos B clonales CD5+ en sangre periférica<sup>(3,4)</sup>.

La mediana de supervivencia de la LLC es de 12 años, aunque el curso clínico es muy heterogéneo<sup>(1)</sup>. La gran mayoría de enfermos se diagnostica en estadios iniciales de la enfermedad. Aproximadamente una tercera parte de estos pacientes en estadio inicial no precisará tratamiento, con lo que estos enfermos presentarán una supervivencia que no difiere de la observada en la población normal de la misma edad y sexo. Por contra, el resto de los pacientes precisará tratamiento y su supervivencia se verá acortada por causas relacionadas con la LLC. La LLC es una enfermedad incurable hoy por hoy. El tratamiento estándar se basa en el empleo de combinaciones de quimioterapia con anticuerpos monoclonales, con las que se consigue una alta tasa de respuestas de larga duración. En los dos últimos años han hecho su aparición un conjunto de nuevos fármacos dirigidos a dianas biológicas que van a cambiar el paradigma de tratamiento de esta enfermedad y que han situado a la LLC como una de las enfermedades hematológicas de mayor interés biológico y terapéutico.

### Biología de la LLC

La LLC se caracteriza por la acumulación y proliferación de linfocitos clonales B maduros CD5+ en sangre periférica, médula ósea y órganos linfoides secundarios. Las teorías sobre el origen celular de la LLC han ido evolucionando a medida que, gracias fundamentalmente a los nuevos avances tecnológicos, se ha ido

obteniendo un conocimiento más preciso de la biología de la enfermedad. La teoría más reciente, basada en la comparación del inmunofenotipo y el perfil de expresión génica de las células de LLC con el de las diferentes subpoblaciones de linfocitos B normales, propone dos poblaciones linfocitarias diferentes, en función del estado mutacional de las inmunoglobulinas, como contrapartida celular normal de la LLC. De esta manera, las células de LLC con las inmunoglobulinas no mutadas (característica que confiere peor pronóstico) tendrían su origen en linfocitos maduros pregerminales CD5+/CD27-/CD38<sup>low</sup>, mientras que las células de LLC con inmunoglobulinas mutadas (relacionado con pronóstico favorable) tendrían su origen en linfocitos B posgerminales CD5+/CD27+/IgM<sup>+</sup><sup>(5)</sup>. Por otro lado, en relación al estado de diferenciación celular en el cual ocurriría la alteración inicial que posteriormente facilitará el desarrollo de una LLC, recientemente se ha descrito que las células madre hematopoyéticas de pacientes con LLC tienen la capacidad de generar poblaciones oligoclonales de linfocitos B maduros CD5<sup>+</sup><sup>(6)</sup>, característica de la linfocitosis B monoclonal, alteración no maligna que precede a la LLC en todos los casos<sup>(7)</sup>.

En cuanto a las alteraciones genéticas, no se ha descrito todavía ninguna anomalía genética o cromosómica común a todos los pacientes con LLC. Sin embargo, se pueden identificar diferentes alteraciones recurrentes en aproximadamente un 80% de los casos, siendo las más comunes la delección de 13q, de 11q, de 17p y la trisomía del cromosoma 12. Las delecciones de 17p y 11q se relacionan con un peor pronóstico y una mala respuesta al tratamiento<sup>(8,9)</sup>. Asimismo, diferentes trabajos recientes de secuenciación completa del genoma de la LLC han revelado la existencia de mutaciones recurrentes. Las más prevalentes son las mutaciones de SF3B1 (14% de los casos), TP53 (13%), NOTCH1 (10%), MYD88 (8%) y ATM (8%). Las mutaciones de SF3B1, TP53 y NOTCH1 se han relacionado con una peor tasa de respuesta al tratamiento<sup>(10-17)</sup>. Cabe destacar, además, que no sólo las alteraciones intrínsecas de las células de LLC, sino también las interacciones de éstas con el microambiente, juegan un papel relevante en la historia natural de esta enfermedad. Las células de LLC se encuentran mayoritariamente en tres compartimentos,

sangre periférica, médula ósea y ganglios linfáticos, donde reciben diferentes estímulos de supervivencia, proliferación y quimiorresistencia procedentes de diversas células accesorias y factores solubles. En la sangre periférica, donde las células de LLC pueden interactuar con linfocitos T y monocitos, es donde parecen recibir menos estímulos proliferativos. Por el contrario, las células de LLC que se encuentran en la médula ósea y los ganglios linfáticos están continuamente estimuladas. En la médula ósea, las células de LLC se hallan en contacto principalmente con las células estromales, mediante receptores de adhesión y citocinas solubles, las cuales transmiten señales de supervivencia y quimioatracción. En los ganglios linfáticos, las células de LLC interactúan estrechamente con linfocitos T, células presentadoras de antígenos y células dendríticas. En este compartimento las células de LLC reciben señales de proliferación, supervivencia, quimioatracción y quimiorresistencia. Además, las células de LLC en los ganglios linfáticos aparecen organizadas en estructuras histológicas denominadas *centros de proliferación* o *pseudofolículos*, en las cuales expresan marcadores de proliferación activa y se muestran agrupadas e interactuando con las células del estroma<sup>(18)</sup>. Finalmente, las células de LLC muestran características de activación de la vía del receptor de células B (BCR), especialmente en los ganglios linfáticos. La activación del BCR transmite mayoritariamente señales de supervivencia, proliferación, migración hacia los ganglios linfáticos y médula ósea y secreción de citocinas, convirtiendo esta vía de transmisión de señales en una atractiva diana terapéutica. En este sentido, la presencia de la proteína ZAP-70 explicaría la mayor agresividad que presentan la mitad de los casos en que está sobreexpresada<sup>(19)</sup>. La inactivación de esta vía mediante inhibidores de proteínas cinasas como BTK, SYK y PI3K está mostrando resultados clínicos muy prometedores<sup>(18)</sup>.

**Tabla 1. Criterios de LLC activa para indicar tratamiento (al menos uno de ellos)<sup>(3)</sup>**

- Fallo medular progresivo manifestado por la aparición o empeoramiento de anemia o trombocitopenia
- Esplenomegalia progresiva o masiva (> 6 cm por debajo del reborde costal)
- Conglomerados adenopáticos de gran tamaño (> 10 cm) o adenopatías de crecimiento progresivo
- Tiempo de duplicación linfocitaria ≤ 6 meses o incremento > 50% de la linfocitosis en 2 meses sin causa concomitante
- Anemia y/o trombocitopenia autoinmunes que no respondan al tratamiento inmunosupresor
- Pérdida de peso (> 10% en 6 meses), astenia (ECOG > 2), fiebre (> 38 °C sin infección durante > 2 semanas) o sudoración nocturna (> 1 mes)
- La linfocitosis aislada o la hipogammaglobulinemia sin infecciones de repetición no son criterios para indicar tratamiento

## Tratamiento de la LLC

El diagnóstico de LLC no conlleva necesariamente la administración de tratamiento. Existe un consenso internacional que establece que únicamente deben tratarse aquellos pacientes que presentan síntomas o complicaciones derivadas de la enfermedad<sup>(3)</sup>. A la hora de establecer la estrategia terapéutica de los pacientes con LLC hay que tener en consideración diversos factores. En primer lugar, la LLC sigue siendo una enfermedad incurable con un curso caracterizado por una secuencia a lo largo de muchos años de tratamientos y recaídas, lo que conlleva que las estrategias de tratamiento deben diseñarse a largo plazo, teniendo en cuenta que los pacientes precisarán diversas líneas de tratamiento. Por otro lado, esta enfermedad afecta a personas de edad avanzada, lo que conlleva que estos pacientes presenten enfermedades concomitantes que pueden condicionar una mayor toxicidad al tratamiento<sup>(20)</sup>. Finalmente, algunas alteraciones biológicas, en especial las mutaciones de TP53, se asocian a quimiorresistencia, por lo que es fundamental analizar su existencia antes de iniciar cualquier tratamiento.

## Tratamiento de primera línea

Las combinaciones de análogos de purinas, en general fludarabina, con agentes alquilantes y anticuerpos monoclonales han demostrado ser los tratamientos que obtienen una mayor tasa de respuestas y una duración más prolongada de las mismas. Por ello, el empleo de las combinaciones FCR (fludarabina, ciclofosfamida y rituximab) o R-FCM (rituximab, fludarabina, ciclofosfamida, mitoxantrone) se considera de elección en el tratamiento de los pacientes con buen estado general y pocas comorbilidades. Con estas combinaciones se obtienen tasas de respuesta global (RG) del 80-90% y de respuestas completas del 40%, en la mitad de las cuales no se detecta enfermedad residual (Tabla 2)<sup>(21-26)</sup>. Además, la mediana de duración de la respuesta se sitúa cerca de los 6 años. Por lo que respecta a la supervivencia, FCR mejora la misma con respecto a FC<sup>(22)</sup>, lo que demuestra la utilidad y actividad de la adición del rituximab a la quimioterapia. La toxicidad de estas combinaciones de quimioinmunoterapia es, por encima de todo, hematológica (neutropenias grado 3-4 en el 30% de enfermos) e infecciosa. Dicha toxicidad está en relación con las comorbilidades del enfermo, sobre todo el estado de la función renal, la predisposición a sobreinfecciones broncopulmonares o las hepatopatías víricas. Cabe destacar que la fludarabina se excreta por vía renal, por lo que la presencia de una disminución del aclaramiento de creatinina inferior a 60 mL/minuto debe obligar a reducir las dosis de dicho fármaco.

Con el objetivo de reducir la toxicidad hematológica se han ensayado otras combinaciones. Así, la combinación FCR-lite (fludarabina + ciclofosfamida + rituximab, con dosis reducidas de fludarabina y ciclofosfamida) ha obtenido muy buenos resultados en series pequeñas y muy seleccionadas. En algunos centros se viene usando desde hace años la combinación de fludarabina con rituximab, que evita la adición de ciclofosfamida<sup>(27)</sup>. Aunque parece que la toxicidad es menor, también lo sería la eficacia, aunque esto no se ha demostrado en estudios comparativos. Otra combinación empleada en otros centros es la de pentostatina, ciclofosfamida y rituximab (PCR), con buenos resultados, sobre todo en grupos de pacientes que por sus condiciones médicas no son candidatos a recibir FCR<sup>(25)</sup>.

La bendamustina es una molécula con acción dual (análogo de purina y agente alquilante). La bendamustina ha demostrado ser más activa que el clorambucilo en cuanto a la tasa de respuestas globales (68% vs. 31%) y duración de las mismas (mediana de 22 meses vs. 8 meses, respectivamente), aunque no mejora la supervivencia respecto este último<sup>(28)</sup>. Una de las potenciales ventajas de la bendamustina es que tendría menor toxicidad hematológica que la fludarabina y que su metabolismo es hepático y no renal, por lo que puede emplearse en enfermos no candidatos a recibir fludarabina. Esto ha llevado a que esté admitido el uso de la bendamustina para aquellos enfermos con LLC no candidatos a recibir fludarabina. Más prometedora parece la combinación de bendamustina con rituximab (BR) (Tabla 2)<sup>(26)</sup>. Si bendamustina + rituximab es comparable en términos de eficacia y toxicidad a FCR se dirimirá en los próximos meses con la aparición de los resultados de un estudio en fase III que compara BR frente a FCR.

Los pacientes con LLC tienen una mediana de edad al diagnóstico de 72 años<sup>(1)</sup>. Sin embargo, los pacientes ancianos no están bien representados en los ensayos clínicos. Los enfermos, por razones de edad, tienden a acumular comorbilidades que condicionan un aumento de la toxicidad de los tratamientos quimioterápicos<sup>(20)</sup>. Por ello, es importante tratar a los enfermos en función de su edad “biológica” en lugar de su edad “cronológica”

mediante la identificación de aquellos factores que convierten a los pacientes en frágiles (*slow-go* y *no-go*) y la cuantificación de las diversas comorbilidades mediante índices<sup>(29)</sup>. Así, aquellos enfermos con un aclaramiento de creatinina <60 mL/min sufrirán una mayor toxicidad hematológica si reciben tratamiento con análogos de las purinas, fármacos que poseen una eliminación renal. Por otro lado, aquellos pacientes con antecedentes de hepatitis B tienen un mayor riesgo de padecer una hepatitis grave cuando reciben tratamientos inmunosupresores con análogos de purinas.

La actividad de la combinación FCR en pacientes de edad avanzada está por definir. Parece que en algunos ensayos presentarían una tasa de respuestas inferior<sup>(21)</sup>, mientras que los pacientes ancianos *go-go* tratados con FCR presentan una tasa de respuestas y una toxicidad similar a la de los enfermos jóvenes<sup>(22)</sup>.

Diversos ensayos en fase II han investigado la actividad de clorambucil con rituximab en pacientes no candidatos a FCR. En comparación con controles históricos, la tasa de respuestas y la duración de las mismas parece superior en la combinación de clorambucil y rituximab, aunque también lo es la toxicidad<sup>(30)</sup>. Finalmente, los datos del estudio del grupo alemán que compara clorambucil frente a clorambucil + rituximab y clorambucil + obinutuzumab (GA101) en pacientes frágiles han sido presentados recientemente<sup>(31)</sup>. Los datos todavía provisionales demuestran una mayor eficacia en tasa de respuestas, incluyendo RC con ERM negativa, con la combinación obinutuzumab + clorambucil frente al clorambucil. Estos resultados abren la puerta al tratamiento con anticuerpos monoclonales y alquilantes en una importante proporción de enfermos con LLC que con anterioridad únicamente eran candidatos a tratamientos paliativos.

### Tratamiento de segunda línea de la LLC

Cuando un paciente con LLC recae tras el tratamiento, deben considerarse diversos aspectos fundamentales antes de decidir el mejor tratamiento:

**Tabla 2. Resultados de la inmunoterapia en el tratamiento de primera línea de pacientes con LLC y buen estado general**

	Tratamiento	N	RG (%)	RC (%)	SLP (mediana)	SG (mediana)
Tam et al. <sup>(21)</sup>	FCR	300	95	72	80 m	77% (6 a)
Hallek et al. <sup>(22)</sup>	FCR vs. FC	408 vs. 409	90 vs. 80	44 vs. 22	52 m vs. 33 m	87% (3 a) vs. 83% (3 a)
Bosch et al. <sup>(23)</sup>	R-FCM + R mantenimiento	81	90	77	75% (4 a)	94% (4 a)
Foon et al. <sup>(24)</sup>	FCR a dosis bajas	50	100	79	23 m	ND
Byrd et al. <sup>(27)</sup>	FR	104	84	38	36 m	85% (3 a)
Kay et al. <sup>(25)</sup>	PCR	33	91	41	30 m	ND
Fischer et al. <sup>(26)</sup>	BR	117	88	23	34 m	90% (2 a)

BR: bendamustina, rituximab; FCR: fludarabina, ciclofosfamida, rituximab; FR: fludarabina, rituximab; PCR: pentostatina, ciclofosfamida, rituximab; RC: respuestas completas; R-FCM: rituximab, fludarabina, ciclofosfamida, mitoxantrona; RG: respuestas globales; SG: supervivencia global; SLP: supervivencia libre de progresión.

1. ¿Existen factores biológicos que predicen resistencia al tratamiento [del(17p)]?
2. ¿Qué tratamiento había recibido el paciente?
3. ¿Cuál ha sido la duración de la respuesta?
4. ¿Qué tipo de comorbilidades presenta el enfermo?
5. ¿Cuáles son los deseos y expectativas del enfermo?

En base a la combinación de estas diferentes variables, habrá que decidir el tratamiento más adecuado. Así, los enfermos con pocas comorbilidades que han presentado una respuesta prolongada al tratamiento (>36 meses) pueden recibir de nuevo tratamiento con quimioinmunoterapia como FCR o BR si ya la habían recibido previamente<sup>(26,32)</sup>. Si el enfermo presenta un número de comorbilidades que desaconsejan el empleo de FCR, puede recibir tratamiento de rescate con clorambucil + rituximab o bendamustina sola o con rituximab. Cuando se considera que el paciente presenta una enfermedad refractaria, debe valorarse la posibilidad de llevar a cabo un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH). El European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) preparó unas indicaciones de consenso para el alo-TPH en LLC en las que se indicaba que ésta era una opción estratégica razonable para pacientes con LLC previamente tratada y con factores de alto riesgo<sup>(33)</sup>. El advenimiento de estrategias terapéuticas más eficaces, como el FCR, hace que estos criterios deban revisarse. No obstante, para pacientes con alteraciones de alto riesgo como del(17p), mutaciones de TP53 o refractariedad a quimioinmunoterapia<sup>(10)</sup>, el alo-TPH sigue siendo la única opción terapéutica, ya que las combinaciones con alemtuzumab, ofatumumab, corticoides, flavopiridol o lenalidomida no parece que obtengan una respuesta sostenida. Para pacientes refractarios, hay muchas evidencias que demuestran que el alo-TPH es capaz de controlar la enfermedad, sobre todo si los pacientes llegan al trasplante con enfermedad quimiosensible. Para los pacientes en recaída precoz (por ejemplo, en menos de 24-36 meses tras la quimioterapia) no hay datos sólidos que evalúen el papel del alo-TPH aunque, teniendo en cuenta que su pronóstico es tan desfavorable como los enfermos refractarios, el trasplante es una opción curativa razonable. Finalmente, para aquellos enfermos con enfermedad refractaria no candidatos a trasplante el pronóstico es muy malo a corto plazo, y la mayoría de alternativas terapéuticas producen un control de la enfermedad de muy corta duración.

### Los nuevos fármacos biológicos en el tratamiento de la LLC

A lo largo de la última década han sido numerosos los avances en el conocimiento de la enfermedad, en especial los referidos a los mecanismos de proliferación

de la LLC y de su interacción con el microambiente. Entre los conocimientos que más han llamado la atención se encuentra el importante papel que el receptor de células B (BCR) juega en la proliferación de esta enfermedad. Así, una fracción de células de LLC recibe estímulos derivados del microambiente en los llamados “nichos” de proliferación a través del BCR. La inhibición de esta vía de señales podría suponer un freno en la proliferación celular y un cambio en las integritas y moléculas de adhesión de la célula, con las consecuencias en su migración que ello conllevaría. Con este fundamento, en los últimos años se han ensayado un conjunto de fármacos que actúan a través de la vía del BCR y que van a cambiar el tratamiento de esta enfermedad en los próximos 12-24 meses. Los dos fármacos más desarrollados son el ibrutinib (inhibidor de tirosina cinasa de Bruton [BTK]) e idelalisib (inhibidor de PI3 cinasa delta) (Figura 1). Los fármacos que actúan a través de la vía del BCR actúan de manera similar y se caracterizan por inducir un buen control de la enfermedad con un bajo perfil de toxicidad. Producen inicialmente un descenso del tamaño de las adenopatías que va acompañado de un aumento de los recuentos linfocitarios que puede llegar a ser notable. A lo largo de semanas el recuento linfocitario va mejorando, desaparecen las citopenias y el paciente mejora su estado general. La toxicidades más importantes son pulmonares y gastrointestinales. No se conoce todavía el perfil de toxicidad a largo plazo, cuestión no baladí toda vez que estos fármacos deben administrarse de forma continua. Uno de los aspectos más destacados de estas drogas es su potente actividad incluso en casos previamente quimiorresistentes o con alteraciones de TP53<sup>(34)</sup>. Si estos medicamentos llegarán a sustituir terapias agresivas como el alo-TPH en el tratamiento de pacientes quimiorresistentes es algo que se dilucidará durante los próximos años.

### Conclusiones

En la última década se han producido enormes avances en el conocimiento de la biología de la LLC. Por primera vez, el espacio entre los conocimientos básicos y el tratamiento de esta enfermedad se ha estrechado enormemente, de tal forma que en hoy por hoy somos capaces de tratar a los pacientes en función de su riesgo clínico y biológico. Más notable ha sido la aparición de nuevos anticuerpos monoclonales y de inhibidores de tirosina cinasas con mecanismos de diana muy específicos y, por tanto, con una alta eficacia en el tratamiento de esta enfermedad. Estos nuevos fármacos ya están cambiando el paradigma de tratamiento de la LLC. En este prometedor futuro se conseguirá el control de la enfermedad con un coste tóxico muy bajo, lo que nos acercará a la curación de la LLC.



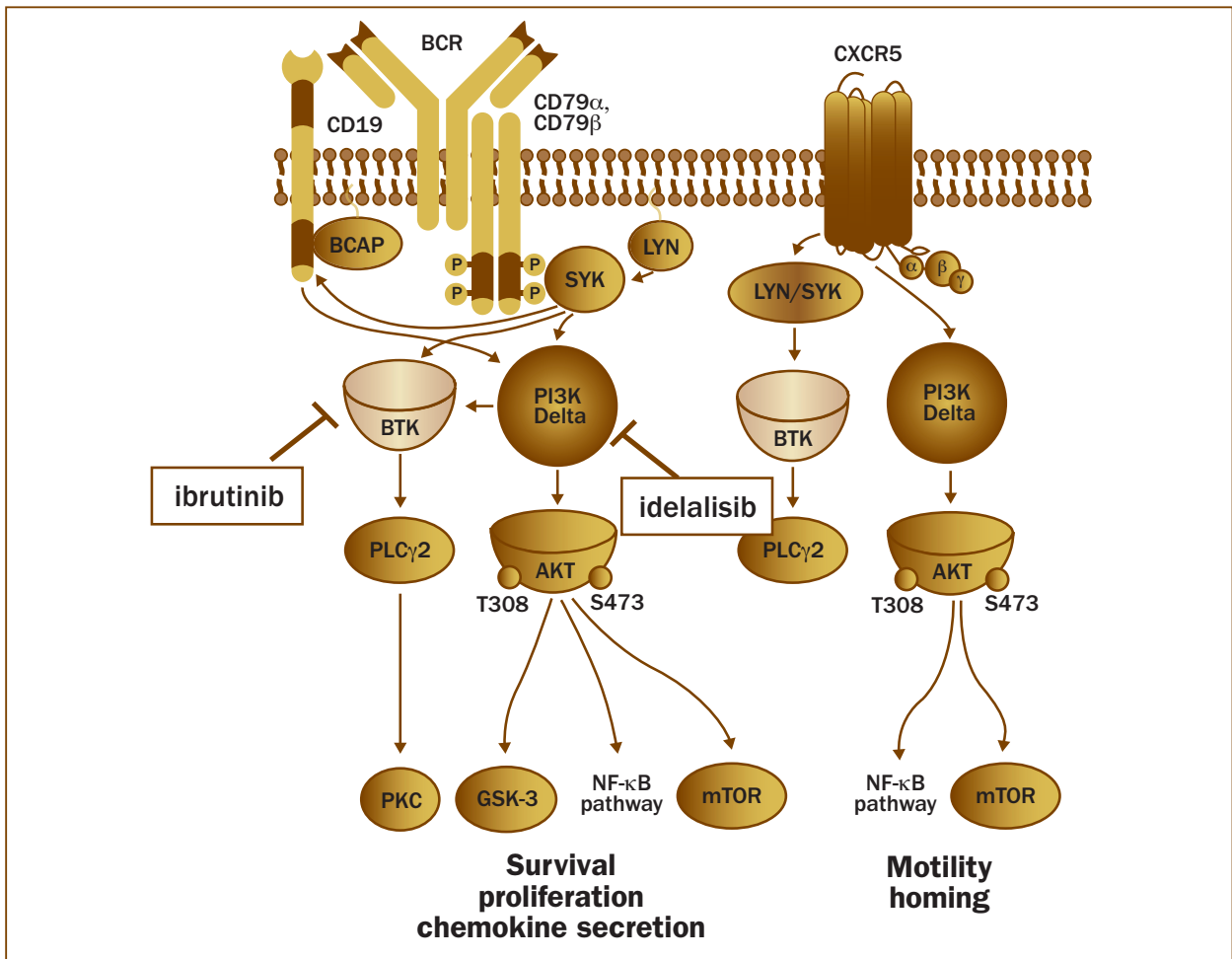


Figura 1. Mecanismo de señalización en células linfoides B a través de los receptores del BCR y de CXCR5. Se puede observar el conjunto de efectos que se producen a través de estas proteínas, y el potencial papel en su inhibición que producen ibrutinib e idelalisib.

## Bibliografía

1. Abrisqueta P, Pereira A, Rozman C, Aymerich M, Giné E, Moreno C, et al. Improving survival in patients with chronic lymphocytic leukemia (1980-2008): the Hospital Clinic of Barcelona experience. *Blood* 2009; 114 (10): 2044-50.
2. Rozman C, Bosch F, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia: a changing natural history? *Leukemia* 1997; 11 (6): 775-8.
3. 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; 111 (12): 5446-56.
4. Swerdlow SH, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. World Health Organization; 2008.
5. Seifert M, Sellmann L, Bloehdorn J, Wein F, Stilgenbauer S, Dürig J, et al. Cellular origin and pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2012; 209 (12): 2183-98.
6. Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, Shima T, Urata S, Yoshimoto G, et al. Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 2011; 20 (2): 246-59.
7. Shanafelt TDT, Ghia PP, Lanasa MCM, Landgren OO, Rawstron ACA. Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL): biology, natural history and clinical management. *Leukemia* 2010; 24 (3): 512-20.
8. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; 343 (26): 1910-6.
9. te Raa GD, Malcikova J, Pospisilova S, Trbusek M, Mraz M, Garff-Tavernier ML, et al. Overview of available p53 function tests in relation to TP53 and ATM gene alterations and chemoresistance in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2013; 54 (8): 1849-53.
10. Dreger P, Schnaiter A, Zenz T, Böttcher S, Rossi M, Paschka P, et al. TP53, SF3B1, and NOTCH1 mutations and outcome of allotransplantation for chronic lymphocytic leukemia: six-year follow-up of the GCLLSG CLL3X trial. *Blood* 2013; 121 (16): 3284-8.
11. 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* 2013; 27 (5): 1100-6.
12. Oscier DG, Rose-Zerilli MJ, Winkelmann N, Gonzalez de Castro D, Gomez B, Forster J, et al. The clinical significance of NOTCH1 and SF3B1 mutations in the UK LRF CLL4 trial. *Blood* 2013; 121 (3): 468-75.

13. 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; 44 (11): 1236-42.
14. Rossi D, Fangazio M, Rasi S, Vaisitti T, Monti S, Cresta S, et al. Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012; 119 (12): 2854-62.
15. Rossi D, Brusca A, Spina V, Rasi S, Khiabani H, Messina M, et al. Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood* 2011; 118 (26): 6904-8.
16. Fabbri G, Rasi S, Rossi D, Trifonov V, Khiabani H, Ma J, et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med* 2011; 208 (7): 1389-401.
17. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GR, Villamor N, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2011; 475 (7354): 101-5.
18. 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 (16): 3367-75.
19. Stevenson FK, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood* 2004; 103 (12): 4389-95.
20. Eichhorst BF, Busch R, Stilgenbauer S, Stauch M, Bergmann MA, Ritgen M, et al. First-line therapy with fludarabine compared with chlorambucil does not result in a major benefit for elderly patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009; 114 (16): 3382-91.
21. Tam CS, O'Brien S, Wierda W, Kantarjian H, Wen S, Do KA, et al. Long-term results of the fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab regimen as initial therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008; 112 (4): 975-80.
22. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2010; 376 (9747): 1164-74.
23. Bosch F, Abrisqueta P, Villamor N, Terol MJ, González-Barca E, Ferra C, et al. Rituximab, fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone: a new, highly active chemioimmunotherapy regimen for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2009; 27 (27): 4578-84.
24. Foon KA, Boyiadzis M, Land SR, Marks S, Raptis A, Pietragallo L, et al. Chemioimmunotherapy with low-dose fludarabine and cyclophosphamide and high dose rituximab in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2009; 27 (4): 498-503.
25. Kay NE, Wu W, Kabat B, LaPlant B, Lin TS, Byrd JC, et al. Pentostatin and rituximab therapy for previously untreated patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2010; 116 (9): 2180-7.
26. Fischer K, Cramer P, Busch R, Böttcher S, Bahlo J, Schubert J, et al. Bendamustine in combination with rituximab for previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol* 2012; 30 (26): 3209-16.
27. Byrd JC, Rai K, Peterson BL, Appelbaum FR, Morrison VA, Kolitz JE, et al. Addition of rituximab to fludarabine may prolong progression-free survival and overall survival in patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: an updated retrospective comparative analysis of CALGB 9712 and CALGB 9011. *Blood* 2005; 105 (1): 49-53.
28. Knauf WU, Lissichkov T, Aldaoud A, Liberati A, Loscertales J, Herbrecht R, et al. Phase III randomized study of bendamustine compared with chlorambucil in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2009; 27 (26): 4378-84.
29. Extermann M, Hurria A. Comprehensive geriatric assessment for older patients with cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25 (14): 1824-31.
30. Hillmen P, Gribben JG, Follows GA, Milligan DW, Sayala HA, Moreton P, et al. An open-label phase II study to investigate the safety and efficacy of rituximab plus chlorambucil in previously untreated patients with CD20-positive B-cell chronic lymphocytic leukaemia (CLL). 50th Annual Scientific Meeting of the British Society for Haematology; 2009.
31. Goede V, Fischer K, Humphrey K, Asikanius E. Obinutuzumab (GA101) plus chlorambucil (Clb) or rituximab (R) plus Clb versus Clb alone in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) and preexisting medical conditions (comorbidities): Final stage 1 results of the CLL11 (BO21004) phase III trial. *J Clin Oncol* 2013; 31 (15 Suppl): 7004.
32. García Marco JA, Giraldo Castellano P, López Jiménez J, Ríos Herranz E, Sastre Moral JL, Terol Casterá MJ, et al. [National guidelines for the management of patients with chronic lymphocytic leukemia]. *Med Clin (Barc)* 2013; 141 (4): 175.e1-8.
33. Dreger P, Corradini P, Kimby E, Michallet M, Milligan D, Schetelig J, et al. Indications for allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: the EBMT transplant consensus. *Leukemia* 2007; 21 (1): 12-7.
34. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Flinn IW, Burger JA, Blum KA, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2013; 369 (1): 32-42.

# Tratamiento actual de las infecciones fúngicas invasoras en pacientes hematológicos

ILDEFONSO ESPIGADO, MANUELA AGUILAR

Hospital Universitario Virgen del Rocío. Universidad de Sevilla.

Instituto de Biomedicina de Sevilla

## Introducción

Las innovaciones diagnósticas y terapéuticas producidas en los últimos años en las enfermedades oncohematológicas han ocasionado un aumento de supervivencia y curación, pero también del número de pacientes inmunodeprimidos y de la severidad de dicha inmunosupresión<sup>(1)</sup>. Como consecuencia, en esta población, la infección fúngica invasora (IFI) es una causa creciente de morbilidad y de mortalidad, a menudo superior al 50%, según el patógeno y la enfermedad. Estos resultados subóptimos, a pesar de los avances en los métodos diagnósticos y del aumento de antifúngicos eficaces, se relacionan con la carencia de técnicas suficientemente sensibles y específicas que permitan el diagnóstico precoz, y con la existencia de patrones epidemiológicos y de susceptibilidad cambiantes<sup>(1)</sup>. Así, aunque *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus* siguen siendo los agentes etiológicos más frecuentes, se ha descrito un incremento en la incidencia de otras especies de *Candida* y *Aspergillus* y de otros hongos patógenos de menor incidencia, llamados hongos emergentes, que incluyen *Trichosporon*, *Fusarium*, *Scedosporium* y mucorales<sup>(2)</sup>.

El conocimiento de que el retraso en el tratamiento de las IFI se relaciona con incremento de mortalidad, junto con la dificultad en establecer un diagnóstico preciso, fundamentan la utilización de marcadores diagnósticos subrogados y de la evaluación del riesgo del paciente de desarrollar una micosis invasora, para ayudar en la toma de decisiones terapéuticas. El mismo fundamento tiene la administración de antifúngicos en profilaxis a pacientes con alto riesgo de sufrir una IFI, o de forma empírica ante la posibilidad más o menos cierta de que el paciente pudiera estar desarrollando una micosis invasora<sup>(3,4)</sup>. El creciente reconocimiento de la importancia de los factores específicos del huésped ha determinado el desarrollo de estrategias focalizadas en la toma de decisiones individualizadas según las características del paciente<sup>(1,5)</sup>. En este texto se revisa brevemente la utilidad de definir factores de riesgo, los métodos y criterios diagnósticos, las estrategias antifúngicas y el tratamiento de las micosis invasoras más frecuentes.

## Factores de riesgo

La evaluación del riesgo individual de padecer una IFI puede permitir definir si el paciente debe o no recibir profilaxis y, en su caso, frente a qué germen, y puede ayudar a decidir la realización de pruebas diagnósticas y la necesidad de tratamiento empírico. De entre los factores de riesgo para desarrollo de IFI en pacientes hematológicos, los más importantes son el nivel de depresión celular inmune y la intensidad y duración de la neutropenia<sup>(6)</sup>. Un reciente consenso en nuestro país<sup>(6)</sup> propone clasificar a los pacientes en tres grandes grupos.

- **Alto riesgo:** presencia de neutropenia profunda (inferior a  $0,1 \times 10^9/L$ ) y prolongada (más de 14 días) o de deficiencia severa en la inmunidad celular como consecuencia de quimioterapia, radioterapia, infección citomegálica, enfermedad del injerto contra el huésped o tratamiento con corticosteroides, anti-TNF o alemtuzumab.
- **Riesgo intermedio:** pacientes con neutropenia de entre 7 y 14 días de duración.
- **Bajo riesgo:** pacientes con neutropenia inferior a 7 días.

Aunque esta clasificación puede ser útil por su simplicidad, los factores de riesgo descritos son más complejos y la valoración del riesgo de un paciente individual pudiera requerir una estrategia más sutil<sup>(7,8)</sup>. En la [Tabla 1](#) se resumen otros factores de riesgo para IFI en el paciente hematológico<sup>(7)</sup>.

## Criterios diagnósticos

Un grupo de consenso de la EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer) y el MSG (National Institute of Allergy and Infectious Diseases/Mycoses Study Group) actualizó en 2008 las definiciones de las infecciones fúngicas invasoras con fines clínicos y epidemiológicos<sup>(9)</sup>. Las definiciones asignan tres niveles de probabilidad diagnóstica de IFI (posible, probable y probada) en pacientes inmunocomprometidos con cáncer y en receptores de trasplante hematopoyético, estableciendo un marco formal para el diagnóstico de IFI con distinta certeza<sup>(7)</sup>. En la [Figura 1](#) se resumen los criterios diagnósticos de las IFI<sup>(9)</sup>.

**Tabla 1. Factores de riesgo para desarrollo de candidiasis invasora o aspergilosis invasora descritos al menos en una publicación<sup>(7)</sup>**

Factor de riesgo	Infección por levaduras	Infección por mohos
Enfermedad de base/alo-TPH	<ul style="list-style-type: none"> <li>· LMA</li> <li>· LLA</li> <li>· Receptor de alo-TPH</li> <li>· Disparidad HLA: incremento de riesgo de muerte por infección candidiásica en LLA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· LMA</li> <li>· LLA</li> <li>· Enfermedad hematológica más avanzada que 1RC</li> <li>· LMA con infección fúngica previa</li> <li>· Alo-TPH (especialmente con disparidad HLA)</li> <li>· Sobrecarga férrica</li> <li>· Ciertos polimorfismos genéticos</li> </ul>
Neutropenia	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Retraso de prendimiento</li> <li>· Neutropenia <math>&lt; 0,1 \times 10^9/L &gt; 3</math> semanas</li> </ul>	Incremento de riesgo de AI
EICH	EICH aguda	<ul style="list-style-type: none"> <li>· EICH aguda de moderada a severa incrementa el riesgo de AI en 4-6 veces</li> <li>· EICH crónica</li> </ul>
Uso de esteroides para tratar EICH	<ul style="list-style-type: none"> <li>· <math>&gt; 2</math> mg/kg <math>&gt; 2</math> semanas o <math>&gt; 1</math> mg/kg <math>&gt; 1</math> semana si neutrófilos <math>&lt; 1 \times 10^9/L &gt; 1</math> semana</li> <li>· LLA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Riesgo de AI se duplica</li> <li>· Esteroides más EICH moderada a severa: 33% de probabilidad de AI</li> <li>· LLA</li> </ul>
Edad	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Edades extremas (<math>&lt; 1</math> y <math>&gt; 70</math> años)</li> <li>· Incremento de riesgo por décadas en alo-TPH</li> </ul>	· Edad $> 40$ años en alo-TPH incrementa el riesgo de AI
Otros	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Tratamiento inicial de EICH con ciclosporina</li> <li>· ITcf más CF en acondicionamiento</li> <li>· Antibioterapia de amplio espectro</li> <li>· Catéteres intravasculares</li> </ul>	Infección por CMV
No uso de HEPA		Incremento de riesgo de AI

1RC: primera remisión completa; AI: aspergilosis invasora; AloTPH: trasplante de progenitores hematopoyéticos alogénico; EICH: enfermedad del injerto contra el huésped; HEPA: filtros de aire de alta eficiencia (*high efficiency particulate air*); HLA: complejo mayor de histocompatibilidad humano; ITcf: Irradiación total corporal fraccionada; LMA: leucemia mieloblástica aguda; LLA: leucemia linfoblástica aguda

## Métodos diagnósticos

Los métodos clásicos de diagnóstico histopatológico y cultivos están bien estandarizados, pero habitualmente proporcionan diagnósticos tardíos, lo que permitiría el aumento de carga fúngica antes de la instauración de tratamiento apropiado, disminuyendo la probabilidad de curación. Además, con frecuencia no es posible realizarlos debido a la dificultad de obtener muestras biópsicas en pacientes hematológicos por trombocitopenia asociada. La relación entre el retraso en iniciar el tratamiento y el incremento de mortalidad está bien establecido<sup>(9)</sup>. Por tanto, son necesarios marcadores diagnósticos subrogados estandarizados que permitan un diagnóstico más precoz e, idealmente, proporcionen información pronóstica y permitan monitorizar la respuesta al tratamiento. Actualmente está en investigación la combinación de distintos marcadores subrogados entre sí o con métodos clásicos.

### Diagnóstico de la infección por *Candida* spp.

La detección combinada de antígeno y anticuerpo de manano (Platelia<sup>®</sup>) puede ser útil para el diagnóstico

precoz<sup>(1)</sup>. La utilidad de la determinación de arabinitol (un metabolito de la mayoría de especies de *Candida*, pero no de *C. glabrata* ni *C. krusei*) o del ratio de D-arabinitol/L-arabinitol o D-arabinitol/creatinina en suero y/o en orina están en investigación<sup>(6)</sup>.

### Diagnóstico de la infección por *Aspergillus* spp.

La detección sérica del antígeno del galactomanano, componente de la pared celular de *Aspergillus* liberado al microambiente por el hongo durante su crecimiento e invasión tisular, es una técnica diagnóstica útil para el diagnóstico precoz cuando se acompaña de evidencia clínica y/o radiológica sugestiva de aspergilosis invasora en pacientes con alto riesgo de IFI<sup>(4,10)</sup>. Su utilidad como *screening* de IFI en población asintomática es controvertida y está limitada por falsos positivos y negativos<sup>(10)</sup>. Su sensibilidad es mayor cuando se determina en líquido de lavado broncoalveolar<sup>(11)</sup>.

B-glucano es un polisacárido de la pared celular de la mayoría de los hongos patógenos, con la notable excepción de especies de *Mucor* y *Cryptococcus*, por lo que es considerado un marcador panfúngico<sup>(1)</sup>. Tiene alta sensibilidad, especificidad y valor predictivo

Diagnóstico	Huésped	Criterios clínicos	Espécimen	Test
Probada	—	—	Estéril	Histología Citología Cultivo (antígeno de criptococo en SNC)
Probable	Susceptible • Neutropenia • Alo-TPH • Esteroides • Inmunosupresor	Alguno • Pulmonar • Bronquial • Sinusal • SNC  Imagen (TAC, ECO, RMN)	Espuito LAB Cepillado br. Aspirado sinusal	Citología Microscopía Cultivo
			Plasma Suero LAB LCR  Suero	AGA  B-D-glucano
Posible	Susceptible	Alguno	—	—

Figura 1. Criterios diagnósticos de infección fúngica invasora<sup>(7)</sup>.

Probada: detección del hongo en estudio histológico o cultivo de espécimen estéril tomado del sitio afectado; en el caso de *Cryptococcus neoformans* la detección del antígeno capsular o la positividad de la preparación de tinta china en LCR. Probable: evidencia micológica (cultivo, microscopía o test indirectos, como detección de antígeno de galactomanano), junto con síntomas o signos clínicos compatibles con IFI en un paciente de riesgo (definido por los llamados "factores del huésped"). Posible: síntomas o signos clínicos compatibles con IFI en un paciente susceptible. AGA: antígeno de galactomanano; Alo-TPH: trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos; Cepillado br.: cepillado bronquial; ECO: ecografía; LAB: lavado broncoalveolar; LCR: líquido cefalorraquídeo; RMN: resonancia magnética nuclear; SNC: sistema nervioso central; TAC: tomografía axial computarizada.

negativo<sup>(1,4)</sup>. Está extendido en EE UU, pero no en Europa.

La detección de ácidos nucleicos fúngicos mediante técnicas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) es un test sensible y rápido. Algunas técnicas de PCR podrían permitir una identificación a nivel de especies e identificar resistencias primarias o secundarias<sup>(1)</sup>. Sin embargo, la falta de estandarización actual de la metodología condiciona una variabilidad de sensibilidad y especificidad inaceptable para la práctica clínica<sup>(4)</sup>. Además, la técnica no permite distinguir por sí misma entre colonización y enfermedad y puede dar falsos positivos por fácil contaminación<sup>(1)</sup>. Por el momento es una técnica en investigación<sup>(1,4)</sup>.

## Estrategias antifúngicas

El lavado correcto de manos y el manejo adecuado de las vías venosas son esenciales para prevenir infecciones por *Candida* y otros gérmenes y son muy coste-efectivas. El aislamiento protector durante periodos de neutropenia profunda y la utilización de filtros de

alta eficacia (HEPA) en habitaciones con recambio de aire mediante presión positiva pueden ser de utilidad en determinados pacientes para reducir el riesgo de IFI. En la actualidad existen cuatro estrategias para la administración de antifúngicos en el manejo clínico de las micosis invasoras: profilaxis, tratamiento empírico, tratamiento anticipado y tratamiento dirigido<sup>(8,12)</sup> (Figura 2).

La **profilaxis antifúngica** se justifica cuando un determinado paciente tiene tan alto riesgo de IFI como para exponer a un individuo no infectado a la toxicidad del fármaco<sup>(7)</sup>. La profilaxis puede propiciar el desarrollo de especies resistentes<sup>(13)</sup>. El tratamiento empírico y el tratamiento anticipado se han desarrollado como opciones terapéuticas precoces para pacientes de riesgo en los que se sospecha una IFI.

El **tratamiento antifúngico empírico** (TAE) se refiere a la administración de tratamiento antifúngico en pacientes con sospecha de IFI (en particular, en pacientes con neutropenia prolongada y fiebre persistente o recurrente, a pesar de antibioterapia de amplio espectro, que es la forma de presentación clínica más frecuente), pero sin evidencia clínica, microbiológica o radiológica de infección fúngica<sup>(6,7)</sup>. En esta situación se recomienda elegir antifúngico dependiendo de la profilaxis recibida, de forma que en pacientes que hayan recibido profilaxis con fluconazol se iniciará con una equinocandina, voriconazol o anfotericina B, mientras que en los que hayan recibido profilaxis frente a hongos filamentosos se recomienda el cambio a un antifúngico de distinta clase, por la posibilidad de resistencia cruzada<sup>(8,12)</sup>. Ya que los síntomas de IFI no son específicos, el tratamiento empírico comporta inconvenientes similares a los de la profilaxis, tales como la exposición de una alta proporción de pacientes sin infección fúngica a la toxicidad relacionada con las drogas, gasto innecesario y emergencia de especies resistentes<sup>(8,12,13)</sup>. Incluso si el paciente tiene una infección fúngica, el régimen antifúngico empírico puede carecer de actividad contra el patógeno real<sup>(14)</sup>. A pesar de estos inconvenientes,

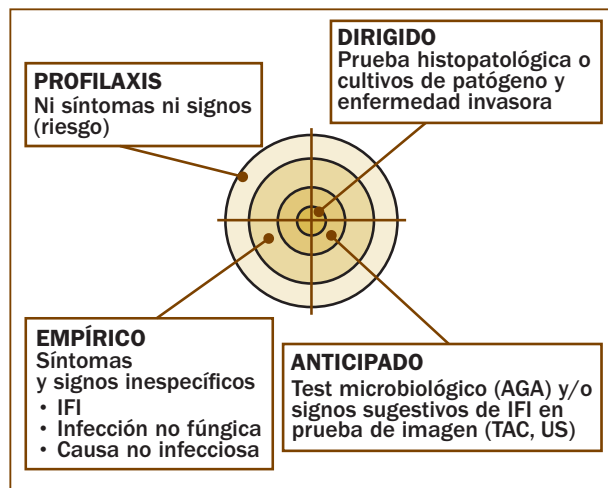


Figura 2. Formas de utilización de los fármacos antifúngicos en pacientes hematológicos<sup>(12)</sup>. En la profilaxis la mayoría de pacientes no habría necesitado recibirla. En el tratamiento empírico, los síntomas (por ejemplo, la fiebre) pueden ser causados por infección no fúngica o causa no infecciosa. En el tratamiento anticipado los test no son específicos. El tratamiento dirigido requiere un importante esfuerzo para el diagnóstico que suele ser difícil y tardío.

AGA: antígeno de galactomanano; IFI: infección fúngica invasora; TAC: tomografía computarizada; US: ultrasonidos.

el tratamiento empírico sigue siendo la aproximación terapéutica estándar actualmente aceptada<sup>(14)</sup>.

En los últimos años se han propuesto diferentes aproximaciones para seleccionar pacientes para recibir tratamiento antifúngico. Nuestro grupo ha desarrollado una estrategia diagnóstica y terapéutica individualizada para seleccionar aquellos pacientes que no necesitan TAE, basada en dos pasos: primero, la evaluación de la gravedad del episodio (sepsis severa o *shock* séptico); y segundo, la identificación de foco clínico susceptible de ser causado por IFI<sup>(15,16)</sup>. En los pacientes que no presentaron signos de severidad ni foco infeccioso no se indicó TAE y se continuó el proceso diagnóstico<sup>(16)</sup>. Esta aproximación individualizada ha sido validada en una relativamente extensa cohorte de pacientes con enfermedades hematológicas malignas, incluyendo pacientes de alto riesgo, y ha mostrado un valor predictivo negativo de 100% y una reducción de indicación de TAE del 38,8%<sup>(17)</sup>. La efectividad de esta aproximación es similar a la del TAE universal comunicada con las estrategias de ensayos clínicos controlados que la evalúan mediante el *end-point* compuesto por cinco criterios (tratamiento con éxito de la IFI basal, ausencia de IFI de brecha, supervivencia de siete días tras fin de tratamiento, no discontinuación prematura de tratamiento antifúngico y resolución de fiebre durante la neutropenia)<sup>(17,18)</sup>. Además, el número necesario de pacientes a tratar (NNT) para curar un episodio de IFI basal fue de 5,8 en esta aproximación

vs. 54,6 del TAE universal, tomando como referencia los tres ensayos clínicos de Walsh *et al.*<sup>(17,18)</sup>.

La guía de práctica clínica para el uso de agentes antimicrobianos en pacientes neutropénicos con cáncer de la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas, en su versión de 2010, sigue recomendando como tratamiento estándar de la neutropenia febril persistente el tratamiento antifúngico universal<sup>(14)</sup>. Y, aunque contempla como una alternativa aceptable no indicar TAE en aquellos pacientes clínicamente estables sin datos clínicos, radiológicos ni microbiológicos de IFI si están en un programa de seguimiento estructurado y reúnen criterios específicos predefinidos, la considera aún con una evidencia baja y como opción experimental<sup>(14)</sup> (Figura 3).

El **tratamiento anticipado** es el iniciado en pacientes con datos positivos de laboratorio (como el test del antígeno de galactomanano) con o sin signos radiológicos sugestivos de IFI, en los que no se ha identificado un patógeno causal en muestra obtenida de un sitio orgánico estéril o espécimen tisular<sup>(8,12,14)</sup>. Esta estrategia es reciente y se encuentra aún en desarrollo<sup>(14)</sup>. Permitiría un tratamiento más precoz que la terapia dirigida y podría reducir el número de pacientes sin IFI que reciben antifúngicos empíricos innecesariamente. Sin embargo, es una aproximación no estandarizada y los resultados de los estudios realizados son contradictorios, por lo que aún se requiere clarificar su papel en el manejo clínico de las IFI<sup>(19)</sup>. Un ensayo clínico aleatorizado reciente en el que se comparó el tratamiento empírico con el anticipado en pacientes con leucemia aguda y neutropenia febril de alto riesgo de IFI, demostró mortalidad similar en ambos grupos, aunque un sub-análisis sugería que el tratamiento empírico podría tener superiores tasas de supervivencia en pacientes con leucemias agudas que reciben quimioterapia de inducción<sup>(20)</sup>. En este estudio, el tratamiento anticipado se asoció a un 35% de reducción del coste de antifúngicos respecto al empírico<sup>(20)</sup>.

El **tratamiento dirigido** consiste en el empleo de antifúngicos cuando hay pruebas de enfermedad fúngica invasora<sup>(5)</sup>.

**Tratamiento dirigido de las candidiasis.** Las guías de la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA) recomiendan distintos antifúngicos en primera línea en función del uso previo de azoles, patrones de susceptibilidad local, datos de gravedad, comorbilidad, efectos secundarios potenciales de cada fármaco y especie de *Candida*<sup>(3)</sup>. En pacientes neutropénicos recomienda utilizar una equinocandina o anfotericina en primera línea, aunque fluconazol podría ser una alternativa razonable en pacientes estables sin exposición previa a azoles<sup>(3)</sup>. El tratamiento de la candidemia debe mantenerse al menos dos semanas tras la negativización de los hemocultivos y siempre que se hayan resuelto los signos y síntomas de infección<sup>(3)</sup>. En general, está indicada

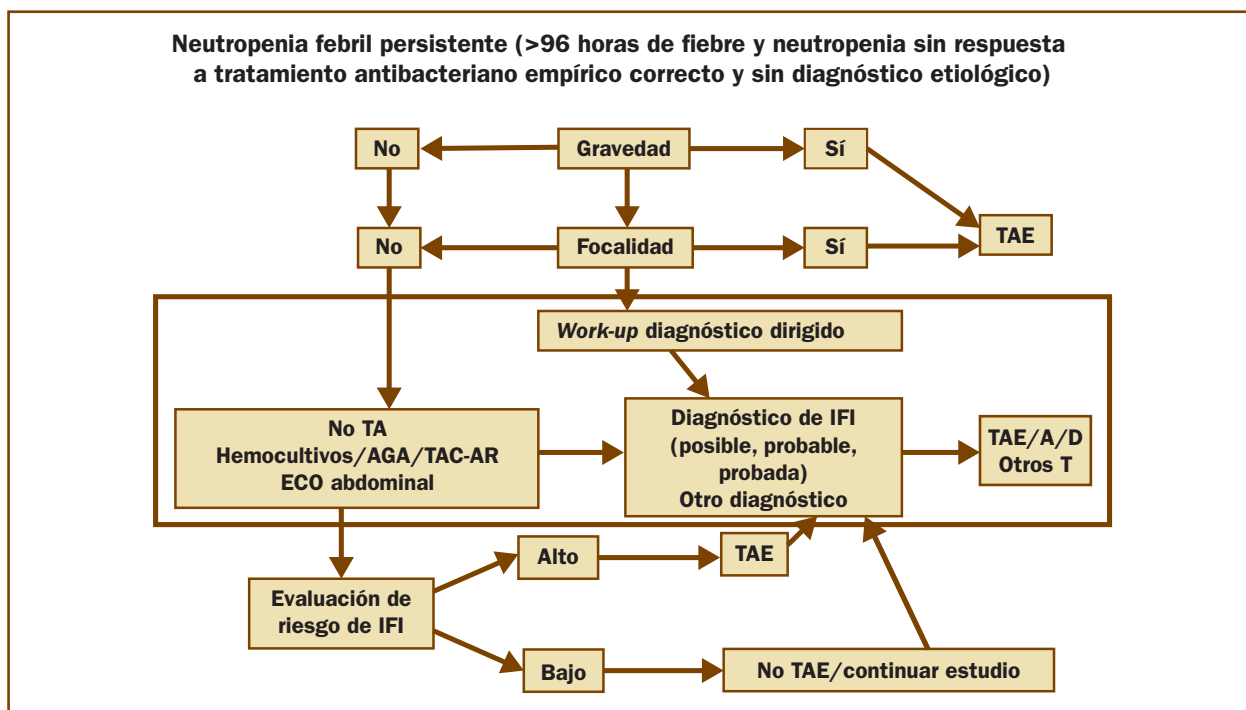


Figura 3. Estrategia de tratamiento antifúngico empírico en pacientes seleccionados<sup>(17)</sup>.

AGA: antígeno de galactomanano; ECO: ecografía; IFI: infección fúngica invasora; Otros T: otros tratamientos; TA: tratamiento antifúngico; TAC-AR: tomografía axial computarizada de alta resolución; TAE: tratamiento antifúngico empírico; TAE/A/D: tratamiento antifúngico empírico/anticipado/dirigido.

la retirada del catéter si se establece el diagnóstico de candidemia, ya que se asocia con menor tiempo de duración de la candidemia y con menor mortalidad. Sin embargo, en pacientes neutropénicos, en los que puede ser difícil diferenciar entre un origen gastrointestinal y una candidemia asociada a catéter, y en los que la retirada del mismo puede suponer un riesgo vital por la trombocitopenia asociada, es razonable conservarlo en ausencia de datos de gravedad, signos de infección en el catéter, candidemia persistente o infección por *Candida parapsilosis*<sup>(3)</sup>. Todos los pacientes con candidemia deben someterse a un examen de fondo de ojo, con el fin de detectar focos de endoftalmitis, por las importantes implicaciones que ésta tiene en cuanto a la elección del tratamiento antifúngico y su duración<sup>(3)</sup>. La candidiasis diseminada crónica o hepatoesplénica es un síndrome específico de pacientes con enfermedades malignas. Para su diagnóstico, la ecografía es menos sensible que la tomografía axial computarizada (TAC) y la resonancia magnética nuclear (RMN), pero es una prueba inicial útil<sup>(3)</sup>. La evidencia publicada sobre su tratamiento es anecdótica y se ha propuesto que anfotericina liposomal puede ser una buena opción por su acumulación en el retículo endotelial, seguida de terapia "secuencial" con fluconazol. Se aconseja un tratamiento no inferior a 8 semanas<sup>(9)</sup>. Se ha considerado como un síndrome de reconstitución inmune que puede ser tratado al inicio con esteroides concomitantes<sup>(21)</sup>.

### Tratamiento dirigido de las aspergilosis

El tratamiento de elección de la aspergilosis invasora en el paciente hematológico es voriconazol, siendo la anfotericina B liposomal la alternativa terapéutica<sup>(4)</sup>. No hay datos que demuestren que el tratamiento combinado con dos antifúngicos en primera línea sea más eficaz, por lo que no se recomienda su uso<sup>(1,4)</sup>. No obstante, en circunstancias concretas como afectación del sistema nervioso central, pulmonar extensa o desarrollo de insuficiencia respiratoria, puede estar justificado asociar anfotericina B liposomal o una candina, aunque existe bajo grado de evidencia actualmente para esta recomendación<sup>(1)</sup>.

No hay evidencia publicada consistente para el tratamiento de rescate tras el fracaso de la primera línea. En esta situación la mayoría de las opciones terapéuticas han demostrado respuestas globales pobres, con escaso porcentaje de respuestas completas<sup>(1)</sup>, y especialmente hay poca evidencia sobre el tratamiento de rescate cuando ha fracasado el tratamiento en primera línea con voriconazol. Para la elección del tratamiento antifúngico de rescate se deben considerar factores como el perfil de toxicidad específica asociada a los distintos fármacos, la vía de administración y la penetración en los distintos órganos y tejidos. El tratamiento combinado puede ser una opción de rescate en pacientes seleccionados, aunque hay pobre

evidencia publicada para esta recomendación. Si se utilizan azoles de espectro extendido por vía oral, podría ser útil determinar niveles plasmáticos del fármaco para un mejor ajuste de dosis<sup>(1,17)</sup>.

### Hongos emergentes. Mucormicosis

Otros hongos que causan infección invasora con menor pero creciente frecuencia en pacientes hematológicos son los llamados “emergentes”. La mucormicosis es la entidad de mayor relevancia clínica. Los principales factores de riesgo de mucormicosis en los pacientes hematológicos son la neutropenia severa y prolongada, el tratamiento crónico con corticoides a altas dosis, la enfermedad del injerto contra el huésped severa, enfermedad hematológica activa, sobrecarga férrica, hiperglicemia mal controlada y uso previo de voriconazol o equinocandinas<sup>(1)</sup>. Debe sospecharse ante un cuadro sugestivo de IFI por hongos filamentosos, con test de galactomanano negativo, en presencia de alguno o varios de los factores de riesgo y que no responde a tratamiento empírico. En pacientes hematológicos, las formas de presentación características son la sino-pulmonar (con

nódulos pulmonares múltiples y afectación pleural en TAC torácica; es sugestiva la afectación por celulitis de la pared torácica, adyacente a una zona de infarto pulmonar) y la rino-órbita-cerebral (con pansinusitis, especialmente si existe implicación etmoidal y destrucción ósea, o lesiones necróticas en paladar duro o cornetes nasales)<sup>(1)</sup>. Para ser eficaz, el tratamiento debe ser precoz, lo que requiere de alta sospecha clínica. El tratamiento es multimodal, siendo imprescindible el desbridamiento quirúrgico radical, la corrección cuando sea posible de los factores predisponentes y el tratamiento antifúngico apropiado<sup>(1)</sup>. El tratamiento óptimo no está bien definido en ausencia de estudios prospectivos. El tratamiento de elección es la anfotericina B, y se aconsejan dosis altas mientras sean toleradas<sup>(1)</sup>. Aunque hay mayor experiencia con anfotericina B convencional, en general se prefiere el uso de la formulación liposomal por su mejor perfil de seguridad. Posaconazol ha sido utilizado en pacientes con posibilidad de vía oral y adecuada absorción intestinal, asociado a anfotericina B como tratamiento de primera línea, y también como tratamiento de rescate, como tratamiento “secuencial” y en profilaxis secundaria<sup>(1)</sup>. Se aconseja la determinación de niveles séricos de posaconazol, si se

**Tabla 2. Resumen de espectro de actividad *in vitro* de los antifúngicos contra hongos patógenos<sup>(6)</sup>**

Especies	Actividad antifúngica							
	Fluconazol	Itraconazol	Voriconazol	Posaconazol	Caspofungina	Micafungina	Anidulafungina	Anfotericina
<i>Candida</i> spp.								
<i>C. albicans</i>	++	+++	++++	++++	+++	++++	++++	+++
<i>C. parapsilosis</i>	++	+++	+++	+++	++		++	+++
<i>C. tropicalis</i>	++	+++	+++	+++	+++	+++	++++	+++
<i>C. glabrata</i>	--	++	++	++	+++	+++	+++	+++
<i>C. krusei</i>	--	+++	+++	+++	+++	+++	++++	++
<i>Cryptococcus</i> spp.	+	+++	+++	+++	-	-	-	+++
var. <i>neoformans</i>	+++ <sup>(1)</sup>	+++	+++	+++	--			+++
var. <i>gattii</i>	+++ <sup>(1)</sup>	+++	+++	+++	--			+++
<i>Aspergillus</i> spp.	-- <sup>(2)</sup>							
<i>A. fumigatus</i>		+++	+++	+++	+++	++++	++++	+++
<i>A. flavus</i>		+++	+++	+++	+++	++++	++++	++
<i>A. terreus</i>		+++	+++	+++	+++	++++	++++	--
<i>A. niger</i>		++	++	+++	+++	++++	++++	+++
Todos los zigomicetos		--	--	++				++
<i>Rhizopus</i> spp.	--	++	-	+++	--			+++
<i>Mucor</i> spp.	-- <sup>(1)</sup>	-	-	++	--			+++
<i>Absidia</i> spp.		+++	--	+++				+++

Concentraciones mínimas inhibitorias que causan inhibición del 90% (CMI<sub>90</sub>): +++++: ≤ 0,1 µg/mL; ++++: ≤ 1,0 µg/mL; ++: ≤ 4,0 µg/mL; +: ≤ 8 µg/mL; -: > 8 µg/mL; --: 16 µg/mL.

<sup>(1)</sup> Datos de CMI<sub>90</sub>

<sup>(2)</sup> CMI<sub>90</sub> de fluconazol para todos los mohos: 256 µg/mL



dispone de la tecnología<sup>(1,6)</sup>. Las equinocandinas no muestran actividad antimucoral *in vitro*, pero sí una modesta actividad en modelos animales. Su posible utilidad en la clínica no está determinado<sup>(4)</sup>.

## Resumen y conclusiones

En el abordaje del paciente con IFI, o sospecha o riesgo de tenerla, el clínico debe individualizar las decisiones diagnósticas y terapéuticas, al objeto de optimizar los resultados. A pesar del avance de los métodos diagnósticos y de la incorporación de fármacos eficaces, el diagnóstico precoz sigue siendo difícil y la mortalidad persiste elevada. La estrategia óptima de prevención y tratamiento de estas infecciones aún no está bien definida. Los esfuerzos futuros deben dirigirse al desarrollo de aproximaciones orientadas al diagnóstico (lo que requiere mejorar la especificidad de los test) y a incrementar la adherencia clínica a sistemáticas de diagnóstico y tratamiento estandarizadas que integren, por una parte, requerimientos mínimos de diagnóstico y, por otra, algoritmos de tratamiento basados en evidencia científica.

## Bibliografía

- Kontoyiannis DP. Invasive mycoses: strategies for effective management. *Am J Med* 2012; 125 (1 Suppl): S25-38.
- Kontoyiannis DP, Marr KA, Park BJ, Alexander BD, Anaissie EJ, Walsh TJ, et al. Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001-2006: overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. *Clin Infect Dis* 2010; 50: 1091-100.
- Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK Jr, Calandra TF, Edwards JE Jr, et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 503-35.
- Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 327-60.
- De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 1813-21.
- Barberán J, Mensa J, Vallejo Llamas C, Jarque Ramos I, García Ruiz JC, Cabrera Marín JR, et al. Recommendations for the treatment of invasive fungal infection caused by filamentous fungi in the hematological patient. *Rev Esp Quimioter* 2011;24 (4): 263-270.
- Cornely OA, Aversa F, Cook P, Jones B, Michallet M, Shea T, et al. Evaluating the role of prophylaxis in the management of invasive fungal infections in patients with hematologic malignancy. *Eur J Haematol* 2011; 87 (4): 289-301.
- Mikolajewska A, Schwartz S, Ruhnke M. Antifungal treatment strategies in patients with haematological diseases or cancer: from prophylaxis to empirical, pre-emptive and targeted therapy. *Mycoses* 2012; 55 (1): 2-16.
- Morrell M, Fraser VJ, Kollef MH. Delaying the empiric treatment of candida bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3640-5.
- Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2006; 42 (10): 1417.
- Maertens J, Maertens V, Theunissen K, Meersseman W, Meersseman P, Meers S, et al. Bronchoalveolar lavage fluid galactomannan for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic diseases. *Clin Infect Dis* 2009; 49 (11): 1688.
- Ruping MJ, Vehreschild JJ, Cornely OA. Patients at high risk of invasive fungal infections: when and how to treat. *Drugs* 2008; 68: 1941-62.
- Pfaller MA. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med* 2012; 125 (1 Suppl): S3-13.
- Freifeld AG, Bow EJ, Sepkowitz KA, Boeckh MJ, Ito JI, Mullen CA, et al. Clinical practice 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 (4): 427-31.
- Cisneros JM, Espigado I, Rivero A, Lozano DL, Parra J, Collado AR, et al. Empirical antifungal therapy in selected patients with persistent fever and neutropenia. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005; 23 (10): 609-14.
- Aguilar-Guisado M, Espigado I, Cordero E, Noguera M, Parody R, Pachón J, et al. Empirical antifungal therapy in selected patients with persistent febrile neutropenia. *Bone Marrow Transplant* 2010; 45 (1): 159-64.
- Aguilar-Guisado M, Martín-Peña A, Espigado I, Ruiz Pérez de Pipaon M, Falantes J, de la Cruz F, et al. Universal antifungal therapy is not needed in persistent febrile neutropenia: a tailored diagnostic and therapeutic approach. *Haematologica* 2012; 97 (3): 464-71.
- Walsh TJ, Teppler H, Donowitz GR, Maertens JA, Baden LR, Dmoszynska A, et al. Caspofungin versus liposomal amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with persistent fever and neutropenia. *N Engl J Med* 2004; 351 (14): 1391-402.
- Maertens J, Theunissen K, Verhoef G, Verschakelen J, Lagrou K, Verbeken E, et al. Galactomannan and computed tomography-based preemptive antifungal therapy in neutropenic patients at high risk for invasive fungal infection: a prospective feasibility study. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 1242-50.
- Cordonnier C, Pautas C, Maury S, Vekhoff A, Farhat H, Suarez F, et al. Empirical versus preemptive antifungal therapy for high-risk, febrile, neutropenic patients: a randomized, controlled trial. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 1042-51.
- Legrand F, Lecuit M, Dupont B, Bellaton E, Huerre M, Rohrlach PS, et al. Adjuvant corticosteroid therapy for chronic disseminated candidiasis. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 696-702.

# Papel de la PET/TC en el diagnóstico y seguimiento de las hemopatías malignas

XAVIER SETOAIN

Servicio de Medicina Nuclear.

Hospital Clínic. Barcelona

## Introducción

La tomografía por emisión de positrones (PET) es una técnica de imagen funcional en la que se inyecta al paciente un análogo de la glucosa (2-fluoro-2-desoxi-D-glucosa [FDG]) marcada con flúor 18, que es un emisor de positrones. Este trazador permite evaluar la actividad glucolítica, que está aumentada en las neoplasias malignas, entre ellas los síndromes linfoproliferativos y puede cuantificarse fácilmente utilizando el índice de captación o *standard uptake value* (SUV).

## Estadificación: linfomas

El papel de la PET con FDG en los linfomas fue controvertido, debido a que el grado de captación de FDG en el linfoma no Hodgkin (LNH) es muy variable<sup>(1)</sup>. Nuestros resultados en la estadificación inicial de 129 pacientes con linfomas demostraron mayor captación de FDG en los linfomas agresivos (SUV promedio de 14) que en los LNH indolentes (SUV promedio de 5,4) ( $p < 0,01$ ) (Figura 1)<sup>(2)</sup>.

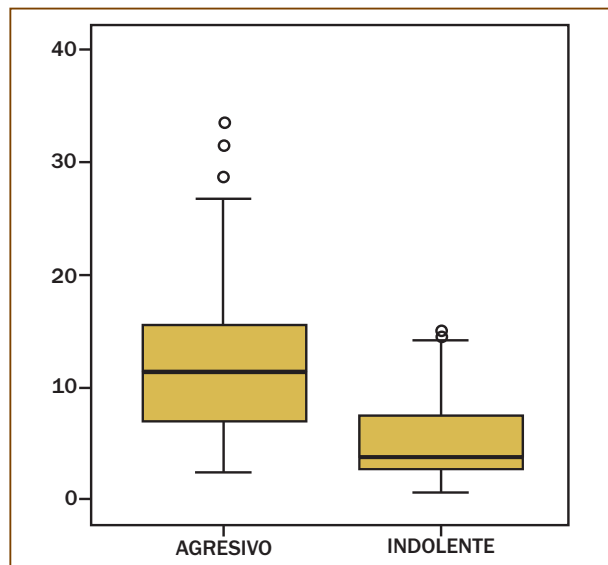


Figura 1. Diagrama de cajas que representa la distribución del  $SUV_{máx}$  en los pacientes con linfomas agresivos e indolentes. La caja representa los valores  $SUV_{máx}$  promedio y el cuartil superior e inferior.

Tabla 1. Nivel de recomendación del PET en diferentes subtipos histológicos de linfomas

PET indicado por su elevada sensibilidad
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Todos los linfomas agresivos</li> <li>- Linfoma difuso de células grandes</li> <li>- Linfoma de Burkitt</li> <li>- Linfoma anaplásico</li> <li>- Linfoma del manto</li> <li>· Enfermedad de Hodgkin</li> <li>· Linfoma folicular (único linfoma indolente)</li> </ul>
PET no indicado por su menor sensibilidad
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Linfoma linfocítico/leucemia linfática crónica (LLC)</li> </ul>
Datos insuficientes
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Linfomas T</li> <li>· Linfoma marginal/asociado a mucosas (MALT)</li> <li>· Linfomas cutáneos</li> <li>· Resto de linfomas menos frecuentes</li> </ul>

La menor actividad metabólica de glucosa en los linfomas indolentes ha llevado a cuestionar la utilidad de la PET en este grupo de pacientes. Sin embargo, recientes trabajos<sup>(1,3)</sup> demuestran que en el linfoma folicular la sensibilidad de la PET en la estadificación oscila entre el 91% y el 97%. Nuestra propia experiencia con 100 pacientes demuestra que la PET captaba FDG en el 100% de casos, con un  $SUV_{máx}$  promedio de 6,9 (rango: 2-24). La PET/TC detectó más lesiones que la tomografía computarizada (TC) en 27 casos, modificó la estadificación de Ann Arbor en 13 pacientes (12%), pero no cambió el tratamiento en ningún caso<sup>(4)</sup>, por lo que parece evidente que el PET puede emplearse con garantías en este tipo de linfoma indolente. No sucede lo mismo con otros linfomas indolentes menos frecuentes y con índices de captación de glucosa más bajos. Estos mismos trabajos<sup>(1,3)</sup> demuestran que la captación de glucosa en otros linfomas indolentes es muy variable y claramente inferior a la del linfoma folicular. En la Tabla 1 se resume la recomendación de la PET previo al tratamiento en función de la sensibilidad de la PET en los tipos histológicos más frecuentes<sup>(5)</sup>.

Con cierta frecuencia, los linfomas indolentes pueden transformarse en un linfoma agresivo, generalmente a un linfoma difuso de células grandes (LDCG). En estos casos, un SUV exageradamente alto en un paciente con un linfoma indolente debe

sugerir una posible transformación a linfoma de alto grado, donde las imágenes de la PET se han empleado para guiar la biopsia hacia la lesión más activa.

La prueba de imagen empleada en los últimos treinta años para la estadificación de los linfomas es la TC. Sus principales limitaciones son su menor sensibilidad en la enfermedad extraganglionar, en ganglios linfáticos de tamaño conservado, así como su incapacidad para diferenciar inflamación de infiltración tumoral en ganglios linfáticos de tamaño patológico. La PET con FDG puede mostrar captación patológica de glucosa en ganglios infracentimétricos, pero tiene una escasa resolución anatómica. La introducción de sistemas híbridos PET/TC<sup>(6,7)</sup> solventa las principales limitaciones de ambas técnicas aisladas, al mejorar la resolución anatómica de la PET y demostrar la presencia de actividad tumoral en ganglios de pequeño tamaño. Nuestros datos<sup>(8)</sup>, extraídos de un estudio prospectivo y una muestra homogénea de 40 pacientes con LDCG-B, demuestran que la PET detectaba más lesiones que la TC en 11 pacientes (27,5%), generalmente al mostrar captación aumentada de FDG en ganglios infracentimétricos. En 6 de los 40 casos (15%) la PET aumentó el estadio, pero únicamente se cambió la estrategia terapéutica en un caso (2,5%), que pasó de enfermedad localizada a avanzada. El trabajo de La Fougere *et al.*<sup>(9)</sup> demuestra que la sensibilidad y la especificidad de la PET/TC en la estadificación de los linfomas es del 97% y 100%, respectivamente, claramente mejor que la de la PET aislada o la de la TC aislada. Sin embargo, puesto que la TC con contraste intravenoso sigue siendo la exploración imprescindible para la estadificación, en el momento actual se están realizando las dos exploraciones, ya sea en días y equipos diferentes o, de forma simultánea, el mismo día y empleando únicamente el equipo de PET/TC. Nuestro grupo está analizando la concordancia entre PET/TC y TC de baja dosis y sin contraste intravenoso con PET/TC realizada con contraste intravenoso en la estadificación inicial de 62 pacientes con linfoma. Los resultados son esperanzadores, al demostrar una concordancia excelente, superior al 90% en todos los territorios ganglionares con un coeficiente kappa >0,8<sup>(10)</sup>. Estos resultados orientan a que, salvo excepciones, como son los pacientes que realizarán tratamiento con radioterapia, la estadificación inicial de los linfomas se podría realizar con PET/TC sin necesidad de realizar la TC con contraste intravenoso.

La PET/TC adquiere especial relevancia en la detección de la afectación extraganglionar. La sensibilidad y especificidad global de la TC en la enfermedad extraganglionar es del 50% y 90% respectivamente, mientras que la de la PET/TC es del 88% y 100% respectivamente<sup>(11)</sup>. Sin embargo, la evaluación individual por linfomas u órganos es muy variable, ya que en el linfoma MALT gástrico o en el linfoma intestinal, por la propia captación fisiológica de glucosa en estos órga-

nos, la sensibilidad de la PET es inferior al 50%. Sin embargo, en otros órganos como el bazo o la médula ósea, la sensibilidad de la PET/TC es muy superior a la de la TC y su detección suele aumentar el estadio y podría suponer cambios terapéuticos.

La capacidad de la PET en detectar la infiltración de la médula ósea es controvertida, principalmente por los malos resultados publicados en el metaanálisis de Pakos<sup>(12)</sup>, por los diferentes patrones de captación de FDG (focal o difuso) y por la diferente captación entre los linfomas agresivos y los indolentes. Recientes trabajos<sup>(13)</sup> apuntan que, en la enfermedad de Hodgkin (EH) y en los LNH agresivos, el patrón de captación focal o multifocal es incluso más sensible que la biopsia de médula ósea. Por su alto valor predictivo negativo en la EH, en los pacientes con PET/TC sin lesiones óseas se podría evitar la biopsia de médula ósea, especialmente en los casos en que no vaya a suponer un cambio en la estrategia terapéutica. En cambio, el patrón de hipercaptación difusa de la médula ósea es menos sensible y más habitual en los linfomas indolentes.

### Estadificación: mieloma múltiple

La seriada ósea ha venido siendo la exploración habitual para estadificar las lesiones líticas óseas del mieloma múltiple. Recientemente, otras técnicas de imagen han demostrado utilidad y se está planteando sustituir la seriada ósea por pruebas como la TC de baja dosis, la resonancia magnética (RM) o incluso la PET/TC. La RM detecta pequeñas lesiones en la médula ósea con una alta sensibilidad, siendo la exploración de referencia para lesiones de columna y pelvis. Sin embargo, no abarca todo el campo de imagen y las lesiones focales tardan en desaparecer, por lo que no es la mejor técnica para valorar la respuesta terapéutica. La PET/TC con FDG permite el estudio del cuerpo entero en una única exploración y detecta tanto lesiones medulares como extramedulares con elevada sensibilidad (80%) y especificidad (100%)<sup>(14)</sup>. Zamagni *et al.*<sup>(15)</sup> comparan la PET con la seriada ósea y la RM en 46 pacientes con diagnóstico reciente de mieloma, y demuestran que la PET/TC es superior a la radiología en el 46% de casos, con una sensibilidad del 92% vs. 61% y detecta lesiones fuera del campo de imagen de la RM en el 34% de casos. Por otro lado, la sensibilidad de la PET en columna es inferior a la RM en el 30% de pacientes.

### Valoración de la respuesta terapéutica: linfomas

La valoración precoz de la respuesta terapéutica se realiza durante el tratamiento quimioterápico, y su propósito es confirmar la efectividad del tratamiento y excluir la posibilidad de progresión o no respuesta.

**Tabla 2. Criterios de respuesta terapéutica a mitad y al final del tratamiento con PET/TC**

Valoración de respuesta precoz en interim-PET (mitad de tratamiento)	Resultado PET	Valoración de remisión con PET al final del tratamiento	Resultado PET/TC
Respuesta metabólica completa (RMC)	DC 1, 2, 3	Respuesta metabólica completa (RMC)	DC 1, 2, 3
		Respuesta metabólica completa con masa residual (RMCr)	DC 1, 2, 3 con masa residual en la TC
Respuesta metabólica parcial (RMP)	DC 4,5 con captación inferior a la basal	Enfermedad metabólica residual (EMR)	DC 4,5 y lesión/masa residual de cualquier tamaño, sin nuevas lesiones
No respuesta metabólica o enfermedad en progresión metabólica (NRM/EPM)		Enfermedad en progresión metabólica (EPM)	DC 4,5 y nuevas lesiones activas o aumento de captación en lesiones previas y/o aumento > 50% de las lesiones

DC: criterios Deauville

La escala de cinco puntos de Deauville clasifica la captación de la PET en:

1: no captación; 2: captación < mediastino; 3: captación > mediastino, pero < hígado; 4: captación discretamente > hígado; 5: captación marcada > hígado o nuevas lesiones. Recientemente se ha visto que esta escala puede agruparse en captación inferior al hígado (1, 2, 3) (PET negativa) o captación superior al hígado (4, 5) (PET positiva).

Puesto que los cambios metabólicos detectados en la PET preceden a los cambios estructurales o de tamaño de la TC, la PET suele ser más precoz y más precisa. Así pues, la PET intermedia o interim-PET permite una valoración precoz de la respuesta terapéutica después de dos o tres ciclos de quimioterapia con mayor precisión que la TC<sup>(16)</sup>. Puesto que la respuesta al tratamiento es el principal factor pronóstico, se ha demostrado que la interim-PET es un elemento predictor de la respuesta. Así pues, los pacientes con interim-PET positiva tienen un periodo libre de enfermedad y una supervivencia más corta que los pacientes que la presentan negativa<sup>(17)</sup>. La capacidad de la interim-PET en predecir la respuesta terapéutica de forma precoz ha potenciado su utilización en la “terapia adaptada a la respuesta” que permite escalar o de-escalar la pauta terapéutica de acuerdo a la respuesta individual de cada paciente. Para este fin, los criterios de valoración de respuesta/no respuesta terapéutica con PET/TC han de ser claros (PET positiva o negativa) y deben estar validados y estandarizados en todos los centros de medicina nuclear. Pronto se vio que los criterios de valoración empleados al final del tratamiento<sup>(18)</sup> que utilizan la actividad mediastínica como nivel de referencia producían demasiados falsos positivos de la interim-PET. Frente a estos criterios, aparece la valoración cualitativa de cinco puntos de Deauville (Tabla 2)<sup>(19)</sup> y una semicuantitativa que compara el SUV de la interim-PET con el SUV de la PET basal ( $\Delta$ SUV)<sup>(20)</sup>.

La escala de cinco puntos de Deauville es la que ha tenido una mayor aceptación por su simplicidad, su reproducibilidad y sus excelentes resultados en la predicción de la respuesta al final del tratamiento y en la predicción del periodo libre de enfermedad y la supervivencia global<sup>(17,19)</sup>.

La reducción del valor del SUV en la lesión residual en comparación con una región diana del estudio basal tiene resultados similares si se aplica un valor de  $\Delta$ SUV > 66%, pero el método es algo más complejo y, por tanto, menos práctico para la rutina asistencial.

$$\text{Reducción SUV (\%)} = \frac{100 \times \text{SUV}_{\text{máx}} (\text{interim-PET}) - \text{SUV}_{\text{máx}} (\text{PET basal})}{\text{SUV}_{\text{máx}} (\text{PET basal})}$$

En el momento actual se están llevando a cabo numerosos ensayos clínicos que utilizan el resultado de la interim-PET para cambiar o continuar el régimen terapéutico, cuyos resultados demostrarán, en un futuro cercano, la utilidad de la interim-PET para estratificar la terapia en los linfomas.

La **valoración de la respuesta terapéutica al final del tratamiento** con PET/TC se realizaba de forma visual, empleando como captación de referencia el *pool* sanguíneo del mediastino en las lesiones grandes (>2 cm) y la captación del tejido circundante en las pequeñas (<2 cm)<sup>(18)</sup>. Estos criterios consiguieron eliminar la remisión completa incierta (CRu) de los pacientes con enfermedad residual en la TC. De forma que los pacientes con masa residual sin actividad metabólica de glucosa al final del tratamiento son considerados en respuesta completa. Sin embargo, dentro del grupo de casos PET negativa al final del tratamiento, parece que el pronóstico de los casos con lesión residual en la TC es algo peor que el de los pacientes sin lesión residual. Por lo tanto, actualmente se ha propuesto volver a distinguir al grupo de pacientes PET negativa en respuesta metabólica completa (RMC) de aquellos que tienen lesión/masa residual en la TC (RMCr). Sin embargo, estos criterios están en controversia, ya que la escala de cinco puntos de Deauville puede también emplearse para valorar la respuesta al final del tratamiento. Esta escala emplea el hígado como captación de referencia para interpretar la PET positiva o negativa. La validación de esta escala se está realizando en el momento actual, y los resultados aún no han sido publicados. La evaluación de la respuesta terapéutica con la escala de Deauville es más sencilla, ya que la medición no depende del tamaño de la lesión de la PET y emplea los mismos criterios en la valoración intermedia y en la final. En la Tabla 2 se describen los criterios de res-

puesta metabólica al final o a mitad de tratamiento empleando la escala de cinco puntos de Deauville.

Debe tenerse en cuenta que una PET negativa tiene un alto valor predictivo negativo (>95%), pero no puede excluir la presencia de enfermedad microscópica. Por otro lado, una PET/TC positiva al finalizar el tratamiento no es siempre indicativa de fracaso terapéutico, ya que hay lesiones inflamatorias que pueden mostrar aumento de captación de FDG, como ocurre con frecuencia en las adenitis mesentéricas y en la esteatonecrosis mesentérica, que suelen requerir confirmación con biopsia.

En los pacientes con EH o LDCG refractarios o en recidiva, la PET/TC realizada durante la quimioterapia de rescate y antes del trasplante de progenitores hematopoyéticos tiene valor pronóstico. Un metaanálisis<sup>(21)</sup> de 12 estudios PET/TC y 630 pacientes (187 EH y 313 LDCG) informa de una sensibilidad del 69% (56-81%) y una especificidad del 81% (73-87%). La supervivencia a 2-5 años y el periodo libre de enfermedad es mayor en los pacientes PET negativa (75-82%) que en los PET positiva (31-41%)<sup>(22)</sup>. Por tanto, la PET/TC puede distinguir los pacientes que tendrán buen pronóstico tras el trasplante de aquellos que podrían beneficiarse de estrategias terapéuticas alternativas.

### Valoración de la respuesta terapéutica: mieloma múltiple

En la valoración de la respuesta terapéutica, las lesiones óseas activas se negativizan en la PET/TC tras finalizar el tratamiento con quimioterapia, y esta respuesta correlaciona con la supervivencia y el periodo libre de enfermedad, por lo que la PET/TC puede tener valor pronóstico<sup>(23)</sup>.

### Bibliografía

- Elstrom R, Guan L, Baker G, Nakhoda K, Vergilio JA, Zhuang H, et al. Utility of FDG-PET scanning in lymphoma by WHO classification. *Blood* 2003; 101: 3875-6.
- Cañete FM, Setoain X, Rubí S, Colomo L, López A, Fuster D, et al. The role of FDG-PET imaging for assessing the aggressiveness of lymphomas. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2009; 36: S241
- Tsakamoto N, Kojima M, Hasegawa M, Oriuchi N, Matsushima T, Yokohama A, et al. The usefulness of (18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography ((18)F-FDG-PET) and a comparison of (18)F-FDG-pet with (67)gallium scintigraphy in the evaluation of lymphoma: relation to histologic subtypes based on the World Health Organization classification. *Cancer* 2007; 110: 652-9.
- Setoain X, Gainza E, Rodriguez S, Trampal C, Navales I, Fuster D, et al. Role of PET/CT in patients with follicular lymphoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2012; 39: 584.
- Wong CY, Thie J, Parling-Lynch KJ, Zakalik D, Margolis JH, Gaskill M, et al. Glucose-normalized standardized uptake value from (18)F-FDG PET in classifying lymphomas. *J Nucl Med* 2005; 46: 1659-63.
- Blodgett TM, Meltzer CC, Townsend DW. PET/CT: form and function. *Radiology* 2007; 242: 360-85.
- von Schulthess GK, Steinert HC, Hany TF. Integrated PET/CT: current applications and future directions. *Radiology* 2006; 238: 405-22.
- Fuertes S, Setoain X, López-Guillermo A, Montserrat E, Fuster D, Paredes P, et al. The value of positron emission tomography/computed tomography (PET/CT) in the staging of diffuse large B-cell lymphoma. *Med Clin (Barc)* 2007; 129: 688-93.
- La Fougère C, Hundt W, Bröckel N, Pfluger T, Haug A, Scher B, et al. Value of PET/CT versus PET and CT performed as separate investigations in patients with Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2006; 33: 1417-25.
- Navales I, Rubí S, Setoain X, Rodríguez S, Ayuso C, Domenech B, et al. Could we avoid contrast-enhanced full-dose CT in lymphoma patients? *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010; 37: S436.
- Paes FM, Kalkanis DG, Sideras PA, Serafini AN. FDG PET/CT of extranodal involvement in non-Hodgkin lymphoma and Hodgkin disease. *Radiographics* 2010; 30: 269-91.
- Pakos EE, Fotopoulos AD, Ioannidis JP. 18F-FDG PET for evaluation of bone marrow infiltration in staging of lymphoma: a meta-analysis. *J Nucl Med* 2005; 46 (6): 958-63.
- Hutchings M. The role of bone marrow biopsy in Hodgkin lymphoma staging: "to be, or not to be, that is the question"? *Leuk Lymphoma* 2012; 53 (4): 523-4.
- van Lameren-Venema D, Regelink JC, Riphagen II, Zweegman S, Hoekstra OS, Zijlstra JM. 18F-fluoro-deoxyglucose positron emission tomography in assessment of myeloma-related bone disease: a systematic review. *Cancer* 2012; 118 (8): 1971-81.
- Zamagni E, Nanni C, Patriarca F, Englaro E, Castellucci P, Geatti O, et al. A prospective comparison of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography-computed tomography, magnetic resonance imaging and whole-body planar radiographs in the assessment of bone disease in newly diagnosed multiple myeloma. *Haematologica* 2007; 92 (1): 50-5.
- Spaepen K, Stroobants S, Dupont P, Vandenberghe P, Thomas J, de Groot T, et al. Early restaging positron emission tomography with (18) F-fluorodeoxyglucose predicts outcome in patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 2002; 13: 1356-63.
- Fuertes S, Setoain X, López-Guillermo A, Carrasco JL, Rodríguez S, Rovira J, et al. Interim FDG PET/CT as a prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2013; 40 (4): 496-504.
- Juweid ME, Wiseman GA, Vose JM, Ritchie JM, Menda Y, Wooldridge JE, et al. Response assessment of aggressive non-Hodgkin's lymphoma by integrated International Workshop Criteria and fluorine-18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4652-61.
- Biggi A, Gallamini A, Chauvie S, Hutchings M, Kostakoglu L, Gregianin M, et al. International validation study for interim PET in ABVD-treated, advanced-stage Hodgkin lymphoma: interpretation criteria and concordance rate among reviewers. *J Nucl Med* 2013; 54 (5): 683-90.
- Itti E, Lin C, Dupuis J, Paone G, Capacchione D, Rahmouni A, et al. Prognostic value of interim 18F-FDG PET in patients with diffuse large B-cell lymphoma: SUV-based assessment at 4 cycles of chemotherapy. *J Nucl Med* 2009; 50: 527-33.
- Terasawa T, Dahabreh IJ, Nihashi T. Fluorine-18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in response assessment before high-dose chemotherapy for lymphoma: a systematic review and meta-analysis. *Oncologist* 2010; 15 (7): 750-9.
- Moskowitz CH, Yahalom J, Zelenetz AD, Zhang Z, Filippa D, Teruya J, et al. High-dose chemo-radiotherapy for relapsed or refractory Hodgkin lymphoma and the significance of pre-transplant functional imaging. *Br J Haematol* 2010; 148 (6): 890-7.
- Bartel TB, Haessler J, Brown TL, Shaughnessy JD Jr, van Rhee F, et al. F18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the context of other imaging techniques and prognostic factors in multiple myeloma. *Blood* 2009; 114 (10): 2068-76.

# Uso de factores de crecimiento en la medicina transfusional

MARÍA LUISA LOZANO, PASTORA INIESTA, JOSÉ RIVERA, VICENTE VICENTE

*Servicio de Hematología.*

*Hospital Universitario Morales Meseguer. Murcia*

## Introducción

El empleo de los factores de crecimiento hematopoyético ha posibilitado trascendentales cambios en la práctica médica, con importantes implicaciones en la hemoterapia actual. Estas glicoproteínas reguladoras juegan un papel importante en el crecimiento, supervivencia y diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas, así como en la activación funcional de células maduras. La presente revisión aborda el impacto del empleo de factores de crecimiento hematopoyético, fundamentalmente agentes estimuladores de la eritropoyesis (AEE), factor de crecimiento de colonias granulocíticas (G-CSF) y agonistas del receptor de la trombopoyetina en la medicina transfusional.

## Agentes estimuladores de la eritropoyesis

La eritropoyetina (EPO) recombinante ha tenido un impacto importante en la calidad de vida de pacientes con anemia secundaria a enfermedad renal, a cáncer en tratamiento citostático y a síndromes mielodisplásicos (SMD). Analizaremos a continuación de forma más pormenorizada el empleo de este agente en estas indicaciones y en otros contextos relacionados con la hemoterapia, como el trasplante de progenitores hematopoyéticos y la donación de sangre autóloga.

## Enfermedad renal crónica

Desde hace muchos años, se reconoce que el empleo de AEE en pacientes con enfermedad renal evolucionada y anemia se asocia a una mejora de parámetros clínicos y fisiológicos, a una reducción de la transfusión de hematíes y a una mejor calidad de vida<sup>(1)</sup>. Así, en pacientes con enfermedad renal crónica (ERC), el empleo de EPO o darbepoyetina se ha convertido en el tratamiento estándar de la anemia, a pesar de los datos que sugieren que niveles de hemoglobina cerca de los rangos de normalidad en comparación con anemia moderada no resultan en un beneficio clínico significativo, y además se asocian a un incremento en el riesgo de complicaciones. En el metaanálisis más reciente (27 ensayos, 10.452 pacientes)<sup>(2)</sup>, la compara-

ción de niveles de hemoglobina en rango superior de la normalidad se asociaron a un incremento en ictus (RR: 1,51), hipertensión (RR: 1,67) y trombosis (RR: 1,33). Además, el mantenimiento de niveles de hemoglobina de 11-12 g/dL vs. 9,5-10,5 g/dL en pacientes en hemodiálisis resulta desde el punto de vista económico en un coste por año de vida ajustado a calidad (QALY) de 50.000-60.000 dólares<sup>(3)</sup>. Por todo ello, las guías de una de las principales fundaciones en nefrología (KDIGO, Kidney Disease Improving Global Outcomes)<sup>(4)</sup> sugieren restringir el empleo de AEE para pacientes con enfermedad renal (con o sin diálisis) sólo si los niveles de hemoglobina caen por debajo de 10 g/dL, para mantener cifras  $\leq 11,5$  g/dL. Se recomienda en estos pacientes mantener una saturación de transferrina de 20-50% y niveles de ferritina de 100-500 ng/mL, la administración subcutánea en pacientes prediálisis o en diálisis peritoneal, y bien subcutánea o intravenosa en aquellos en hemodiálisis. En pacientes con anemia crónica se recomienda evitar transfusiones de hematíes para minimizar los riesgos potenciales asociados a su uso y evitar, siempre que sea posible, el empleo de estos concentrados en enfermos candidatos a trasplante renal para minimizar el peligro de aloinmunización. Las transfusiones pueden ser, sin embargo, necesarias cuando la terapia con AEE es ineficaz (por ejemplo, hemoglobinopatías, fallo medular, resistencia) o asociada a riesgos elevados (por ejemplo, enfermedad tumoral o trombosis previa).

Las eritropoyetinas biosimilares alfa (Binocrit<sup>®</sup>), zeta (Retacrit<sup>®</sup>) y theta (Eporatio<sup>®</sup>) están aprobadas para su empleo en pacientes con ERC.

Peginesatide, un péptido sintético nuevo que estimula el receptor de la EPO, fue aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) en marzo de 2012 para tratar la anemia de pacientes con ERC. Sin embargo, en febrero de 2013 este agente fue retirado del mercado, tras haber sido empleado durante casi un año en más de 25.000 pacientes, debido a graves reacciones de hipersensibilidad en el 0,2% de los pacientes, y con resultado de fallecimiento en un 0,02% de los enfermos tratados.

En 2007 se autorizó en Europa la eritropoyetina beta pegilada (peg-EPO, Mircera<sup>®</sup>). Su mayor vida media permite su administración quincenal durante la fase de corrección y mensual en el periodo de

mantenimiento. La eficacia, seguridad y tolerancia de la peg-EPO se ha estudiado y comparado con otros AEE en seis ensayos en fase III, en anemia relacionada con la ERC. En dichos estudios se observó que peg-EPO presenta un perfil de seguridad y eficacia similar al de los otros AEE, y recientemente se ha estimado también equivalencia de costes<sup>(5)</sup>.

### Pacientes con cáncer

La anemia en pacientes con cáncer, excluidos los sangrados, suele ser debida fundamentalmente al propio tumor, o a quimioterapia o radioterapia. Sin embargo, el empleo de AEE en este contexto es controvertido, puesto que se ha asociado a un incremento de eventos tromboembólicos, a un acortamiento de la supervivencia (sobre todo en pacientes en los que la anemia no se debe a quimioterapia) y a progresión del tumor. Múltiples metaanálisis han analizado los beneficios y efectos adversos de estos agentes, y la revisión más reciente de Cochrane de 91 ensayos que incluyen 20.102 participantes llegó a la conclusión<sup>(6)</sup> de que los pacientes con cáncer que no reciben quimioterapia durante el tratamiento con AEE tienen un riesgo relativo de mortalidad de 1,35 vs. 1,10 en aquellos con EPO en tratamiento con citostáticos. Por ello, las recomendaciones de EMA (European Medicines Agency), FDA, ASCO/ASH (American Society of Clinical Oncology/American Society of Hematology) y NCCN (National Comprehensive Cancer Network) establecen que este tratamiento se debe restringir a pacientes en tratamiento activo con quimioterapia, con niveles de hemoglobina  $<10$  g/dL. Además, hay que tener en cuenta el incremento del riesgo de eventos tromboembólicos (RR: 1,52), por lo que hay que valorar balance riesgo/beneficio en pacientes con trombosis previa, cirugía, inmovilización o mieloma múltiple tratados con talidomida/lenalidomida y adriamicina/corticoides. El metaanálisis también establece que estos agentes disminuyen de manera significativa el número de transfusiones de hematíes, una media de un concentrado respecto al grupo control. La darbepoyetina y la EPO parecen ser igual de eficaces, y es importante mantener saturaciones de transferrina  $\geq 20\%$  y concentraciones de ferritina  $\geq 100$  ng/mL. En estos pacientes, hay que interrumpir el tratamiento si tras 8 semanas la hemoglobina no se ha incrementado más de 1-2 g/dL o si no hay reducción de las necesidades transfusionales. Respecto al papel de los AEE en la progresión del tumor, una revisión reciente sugiere que estos agentes tienen poco efecto en la progresión de la enfermedad en pacientes con quimioterapia, y los datos preclínicos disponibles no aportan evidencias de peso que apoyen un papel de estos agentes en el crecimiento tumoral de forma directa o indirecta<sup>(7)</sup>.

### Síndromes mielodisplásicos

La actividad de EPO/darbepoyetina es muy diferente en las dos categorías de SMD según la puntuación pronóstica de IPSS, grupos de bajo riesgo (bajo e intermedio I) y de alto riesgo (intermedio II y alto), siendo efectiva casi exclusivamente en el primer grupo. A pesar de que han estado disponibles durante más de dos décadas y de las recomendaciones de varias guías y documentos de consenso, los AEE no han sido aprobados por la FDA ni por la EMA para el tratamiento de la anemia en SMD. Dicha autorización se decidirá según los resultados de dos ensayos clínicos aleatorizados y doble ciego en marcha, que comparan la eficacia de la eritropoyetina alfa (NCT01381809) y de la darbepoyetina (NCT01362140) frente a placebo. Aunque diversos estudios han mostrado que la EPO mejora la calidad de vida de estos pacientes, hasta ahora no hay evidencia de un incremento en la tasa de supervivencia.

La anemia del SMD suele tratarse con transfusiones de hematíes; sin embargo, este tratamiento en ocasiones no se considera como primera línea terapéutica sintomática debido a las posibles complicaciones (sobrecarga férrica, aloinmunización, reacciones transfusionales, etc.). Hay que valorar el tratamiento con EPO, en aquellos pacientes que presenten niveles endógenos de EPO  $<500$  mU/mL, particularmente en aquellos con un IPSS bajo o intermedio I con pocos requerimientos transfusionales ( $<2$  unidades/mes). Un metaanálisis de estudios rigurosos seleccionados ha mostrado que la tasa de respuesta a los AEE en monoterapia empleando los criterios de IWG (Internacional Working Group) es de un 57,6%. A dosis equivalentes no existen diferencias en la respuesta entre los nueve estudios que utilizaron eritropoyetina alfa y los ocho que usaron la darbepoyetina<sup>(8)</sup>. Aunque este tratamiento no debe ser mantenido de forma indefinida si no se objetiva beneficio, la tasa de respuesta es significativamente mayor en pacientes tratados durante periodos más largos (26 semanas) que en los que lo hacen sólo 3 meses<sup>(9)</sup>. En caso de falta de incrementos de hemoglobina se puede plantear incremento de dosis de EPO (60,000-80,000 U/semana) o de darbepoyetina (300  $\mu$ g/semana) o asociar G-CSF. Aunque el empleo de biosimilares de EPO es cada vez mayor, hasta el momento sólo hay un estudio que está analizando su utilidad en SMD, cuyos resultados todavía no están aún disponibles.

### Trasplante de progenitores hematopoyéticos

A pesar de las recomendaciones de las diferentes sociedades médicas para el empleo de AEE en diferentes enfermedades hematológicas y oncológicas, no

existen criterios bien definidos acerca de su uso en pacientes con neoplasias mieloides y en pacientes sometidos a trasplante alogénico. Un estudio prospectivo reciente indica que, aunque los AEE en este contexto no tienen impacto en la supervivencia, sí resultan en un beneficio económico, en una mejora de la calidad de vida de los pacientes y en una reducción discreta de la transfusión de concentrados de hemáties en leucemia aguda y en trasplante alogénico (4 y 3 unidades, respectivamente)<sup>(10)</sup>. En el contexto de la movilización de progenitores hematopoyéticos, la adición de EPO al G-CSF tras quimioterapia en un pequeño número de pacientes con mieloma ha mostrado una mejora en la eficiencia de recolección de células CD34, además de asociarse a menores requerimientos transfusionales postrasplante y a menos días de antibióticos, con un balance final beneficioso respecto al coste<sup>(11)</sup>.

### Enfermo quirúrgico

Dependiendo de la edad del paciente y de la posibilidad de transfusión de éste, el coste-eficacia de la transfusión autóloga oscila entre 235.000 y más de 23 millones de dólares por QALY<sup>(12)</sup>, claramente superior al límite que se considera razonable. La EPO alfa, beta y zeta están aprobadas para esta indicación; la alfa y la zeta se pueden indicar junto a suplementos férricos para disminuir la exposición a las transfusiones de sangre alogénica en adultos sin déficit de hierro antes de la cirugía mayor ortopédica electiva<sup>(13)</sup>, a un coste inferior que la donación de sangre autóloga<sup>(14)</sup>.

### Factor estimulador de colonias granulocíticas

El trasplante de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica, tanto autólogo como alógeno, es una alternativa atractiva que ha desplazado al uso de médula ósea, ya que permite reducir los costes y la mortalidad. La movilización generalmente se lleva a cabo con factor estimulador de colonias granulocíticas (G-CSF) con o sin quimioterapia.

Cuando se emplea en trasplante autólogo o alogénico, G-CSF (filgrastim) se administra a una dosis de 10 µg/kg/día s.c., con comienzo de las aféresis en el quinto día hasta que se alcanza la cantidad de células deseada. Un estudio prospectivo ha comparado el uso de 5 vs. 10 µg/día tras quimioterapia, sin que se aprecien diferencias concluyentes entre ambos esquemas<sup>(15)</sup>. La forma pegilada de G-CSF (pegfilgrastim), aunque no autorizada para su uso en este contexto, ha mostrado una cinética de movilización muy similar a la de filgrastim en donantes sanos<sup>(16)</sup>. Varios

ensayos clínicos también han investigado la combinación de quimioterapia y dosis única de pegfilgrastim en la movilización de pacientes con linfoma o mieloma. Los resultados muestran una eficacia similar frente a G-CSF no conjugado en términos de recuento de células CD34+, células recolectadas e injerto tras infusión. Sin embargo, el número de pacientes en estos ensayos ha sido bajo, y los resultados siempre se han comparado con los obtenidos en controles no aleatorizados<sup>(17)</sup>. Lenograstim es una forma glicosilada de G-CSF. Diferentes estudios prospectivos han evidenciado resultados de movilización discordantes. Un análisis *post hoc* del empleo de este agente en donantes sanos indicó que podría haber una mejor movilización sólo en varones<sup>(18)</sup>. No obstante, una reciente revisión sistemática de la evidencia clínica disponible no encuentra diferencias entre lenograstim y filgrastim en movilización tanto de donantes sanos como de pacientes<sup>(19)</sup>.

En 2008, el biosimilar de G-CSF XM02 (ratiograstim, tevagrastim y biograstim) fue aprobado por la EMA para la movilización de progenitores hematopoyéticos. Diversos estudios han analizado la eficacia y seguridad de los biosimilares respecto al G-CSF de referencia en pacientes, con datos similares en cuanto a células CD34+, células nucleadas recogidas y reconstitución hematológica, a expensas de un menor coste<sup>(20,21)</sup>. Sin embargo, existe una experiencia limitada en el empleo de G-CSF biosimilar en donantes sanos. Por ello, diferentes sociedades científicas (SIMTI, SIE, SIES, GITMO y WMDA)\* recomiendan que no se empleen biosimilares en la movilización de donantes sanos fuera de ensayos, y sólo considerarlos en la rutina cuando exista suficiente evidencia acerca de su eficacia y seguridad<sup>(22)</sup>.

SCF (ancestim) existe tanto como forma soluble como molécula de superficie en las células estromales de médula ósea. Se une a *c-kit* en las células madre hematopoyéticas y modula la proliferación y la adhesión. Como agente único, SCF tiene poca eficacia en movilización; sin embargo, tanto en modelos animales<sup>(23)</sup> como en humanos<sup>(24)</sup> se ha demostrado sinergia entre SCF y G-CSF. El SCF se administra a dosis de 20 µg/kg/día s.c., comenzando 4 días antes del G-CSF y se continúa junto al G-CSF hasta el final de las colectas mediante aféresis. En enfermos con fallos de movilización previos, SCF más G-CSF con o sin quimioterapia permite una adecuada movilización en aproximadamente el 50% de los pacientes<sup>(25)</sup>. En aquellos que han recibido fludarabina, SCF junto

\* Società Italiana Medicina Trasfusionale e Immunoematologia, Società Italiana di Ematologia, Società Italiana di Ematologia Sperimentale, Gruppo Italiano per il Trapianto di Midollo Osseo, World Marrow Donor Association.



a altas dosis de G-CSF resultó en un 63% de éxito de movilización, casi el doble de la descrita en controles históricos que emplearon sólo G-CSF<sup>(26)</sup>. Este agente, sin embargo, no está disponible en muchos países, entre ellos España.

Sargramostim (GM-CSF) no es más eficaz que el G-CSF solo, no exhibe sinergia con este último y tiene importantes toxicidades relacionadas con la dosis<sup>(27)</sup>, por lo que actualmente su uso es escaso.

### Agonistas del receptor de la trombopoyetina

Aunque la presencia de una citocina con efectos específicos sobre la trombopoyesis fue sugerido en 1958, la clonación de la trombopoyetina (TPO) no se produjo hasta 1994. Teniendo en cuenta la eficacia de G-CSF y de la EPO en promover la hematopoyesis específica de línea, existía una gran esperanza en que los agentes trombopoyéticos tuvieran un importante potencial terapéutico en las diferentes patologías que cursan con trombocitopenia. Los primeros agentes que se desarrollaron fueron formas recombinantes de la TPO humana, la rHuTPO (basada en la molécula completa) y también su forma pegilada, PEG-rHuMGDF (consistente en los primeros 163 aminoácidos de la molécula unida químicamente al polietilenglicol). Aunque los ensayos clínicos mostraron un efecto inequívoco sobre la cifra de plaquetas en voluntarios sanos<sup>(28)</sup>, el desarrollo de estas moléculas se interrumpió, debido a la inducción de trombocitopenia por generación de anticuerpos, en aproximadamente un 8% de los sujetos tratados. Se desarrollaron entonces dos agonistas del receptor de TPO que no compartían homología con la TPO endógena<sup>(1)</sup>: romiplostim (Nplate<sup>®</sup>), un análogo peptídico de la trombopoyetina que se administra por vía subcutánea semanalmente (1-10 µg/kg, media 3-4 µg/kg); y eltrombopag<sup>(2)</sup> (Revolade<sup>®</sup>), una molécula oral no peptídica que se administra diariamente a dosis de 25, 50 o 75 mg (media 50 mg). Ambos fueron aprobados en 2009 y 2010 por la FDA y la EMA, para el tratamiento de pacientes adultos con trombocitopenia inmune primaria (PTI) en base a los resultados de estudios multicéntricos aleatorizados controlados con placebo, incluso en pacientes esplenectomizados y refractarios<sup>(29,30)</sup>. En noviembre de 2012 y en julio de 2013, la FDA y la EMA, respectivamente, aprobaron el empleo de eltrombopag en pacientes con hepatitis C para inicio/mantenimiento de interferón. Esta aprobación de eltrombopag se ha basado en dos estudios en fase III aleatorizados con placebo que incluyen a más de 1.500 pacientes (ENABLE 1 y 2), que muestran que el eltrombopag eleva la cifra de plaquetas para permitir el tratamiento antiviral con peginterferón alfa 2b y ribavirina en un 94% de pacientes.

No obstante, se observó en los pacientes tratados una tasa más elevada de eventos hepatobiliares transitorios (13% vs. 6% en placebo) y de complicaciones tromboembólicas (4% vs. <1% con placebo).

### Usos potenciales de los agonistas del receptor de la trombopoyetina en medicina transfusional

En la actualidad sólo existen estudios aleatorizados del empleo de romiplostim o eltrombopag en PTI, trombocitopenia en contexto de hepatitis C, anemia aplásica y en síndrome mielodisplásico/leucemia aguda.

### Síndromes mielodisplásicos y leucemia aguda

Los agentes trombopoyéticos podrían aliviar la trombocitopenia, el sangrado y los requerimientos transfusionales de pacientes con SMD. Aunque previamente se había mostrado que romiplostim incrementa el recuento plaquetario y reduce la necesidad de transfusiones en pacientes con SMD bajo tratamiento de soporte<sup>(31)</sup> o con agentes hipometilantes<sup>(32)</sup>, las dudas generadas sobre el posible incremento en la tasa de transformación de leucemia aguda y de fibrosis medular dieron lugar al cierre prematuro de un ensayo multicéntrico, y la seguridad del fármaco está siendo reanalizada actualmente. A pesar de que algunos blastos leucémicos expresan el receptor de TPO, estudios previos *in vitro* han mostrado que eltrombopag no estimula el crecimiento de células leucémicas o mielodisplásicas, sino que, al contrario, podría presentar un efecto antileucémico<sup>(33)</sup>. Adicionalmente, estudios preliminares *in vivo* muestran que este agente puede reducir los requerimientos transfusionales en pacientes trombocitopénicos con SMD y leucemia aguda sin tratamiento citostático. No obstante, el efecto beneficioso en términos de incremento de plaquetas se observa sólo en 1 de cada 4 pacientes tratados<sup>(34)</sup>, a expensas de un coste elevado. Existen en la actualidad estudios en marcha para establecer la seguridad y eficacia de este agonista en este contexto.

### Anemia aplásica

Un ensayo reciente en fase II que incluye 25 pacientes muestra que la administración de eltrombopag a pacientes con anemia aplásica resulta en incrementos significativos de plaquetas, de serie eritroide o mieloides en el 44% de los pacientes, con normalización de la celularidad de la médula ósea y de la hematopoyesis trilineal durante la administración del fármaco. El 36% de los pacientes no precisaron transfusiones de plaquetas durante el ensayo, observándose un

incremento medio de  $44 \times 10^9/L$  plaquetas. Además, el 12% de los pacientes que previamente eran dependientes de transfusiones de hematíes no requirieron soporte con este hemoderivado<sup>(35)</sup>. Sin embargo, otros factores de crecimiento, como el G-CSF y la EPO no han mostrado beneficio en esta enfermedad, posiblemente porque las células hematopoyéticas no tienen receptores para estas citocinas, aunque sí para la TPO.

### Patologías en las que se analiza la potencial utilidad de agonistas de primera generación del receptor de TPO

La cirugía cardíaca, el trasplante hepático y otras cirugías mayores consumen cerca del 40% de los concentrados de plaquetas. Hasta el momento, en *cirugía cardíaca* sólo se han realizado estudios animales que muestran que la administración de PEG-rHuMGDF reduce el sangrado y la trombocitopenia<sup>(36)</sup>. Aunque no hay disponibles trabajos publicados, existe experiencia aislada de pacientes con trombocitopenia crónica a los que se ha administrado agonistas de segunda generación del receptor de la TPO antes de una cirugía de *bypass* coronario, artroplastia de cadera o trasplante cardíaco. En este escenario hay que valorar el coste de este tratamiento respecto a concentrados de plaquetas, al igual que el riesgo tromboembólico en pacientes ya predispuestos a este tipo de complicaciones.

A nivel de su aplicación en procesos de aféresis, se ha analizado la utilidad del empleo simultáneo de rHuTPO y de G-CSF en la *capacidad de movilización de progenitores hematopoyéticos a sangre periférica*. El empleo de esta citocina en pacientes oncológicos se asoció a un incremento de 24 veces en el número de células CD34<sup>(37)</sup> y de 6 veces en el número de pacientes que consiguen una cifra de  $3 \times 10^6/kg$  células CD34+ en una única aféresis<sup>(38)</sup> sin toxicidades relevantes. Cuando se emplea la forma pegilada de este agente, PEG-rHuMGDF, en *donantes de plaquetas por aféresis*, se observa una estimulación de la producción de plaquetas a los 12-15 días de su administración, que redundan en un mayor contenido en el producto respecto a aféresis de donantes no tratados, y secundariamente en superiores recuentos y mayores intervalos de tiempo hasta la siguiente transfusión profiláctica de plaquetas en los pacientes receptores<sup>(39)</sup>. No se han desarrollado, sin embargo, estudios que analicen la potencial utilidad de los nuevos agonistas en este contexto. En bancos de sangre, la TPO puede ser empleada en combinación o no con otros factores de crecimiento hematopoyético (por ejemplo, ligando de flt-3, IL-3) para inducir *in vitro* la expansión de progenitores de cordón umbilical o de sangre periférica<sup>(40)</sup>, o para favorecer la diferenciación megacariocítica y la producción de plaquetas<sup>(41)</sup>.

### Patologías en las que se analiza la potencial utilidad de agonistas de segunda generación del receptor de TPO

Recientemente se ha evaluado el beneficio del uso de eltrombopag en *enfermedad hepática avanzada* y en *trombocitopenias congénitas*, y también se han llevado a cabo también estudios que examinan la posible ventaja del empleo de romiplostim en la *trombocitopenia inducida por quimioterapia*. Respecto a la potencial utilidad de la administración de eltrombopag a pacientes con cirrosis o enfermedad hepática avanzada, un estudio aleatorizado ha mostrado que, aunque este agonista reduce la necesidad de transfusiones plaquetarias antes de procedimientos invasivos, su uso se asoció a una mayor incidencia de trombosis venosa portal, lo que resultó en una terminación prematura del ensayo<sup>(42)</sup>. El empleo de este agente en pacientes con *trombocitopenia relacionada con mutaciones el gen MYH9*, que generalmente cursa con trombocitopenias moderadas, ha mostrado que incrementa las cifras de plaquetas y reduce la sintomatología de sangrado<sup>(43)</sup>, aunque no se ha relacionado con el impacto transfusional de estos enfermos.

La *trombocitopenia secundaria* a quimioterapia es muy relevante en términos de la logística de los centros de transfusión y bancos de sangre, ya que los pacientes en tratamiento citostático consumen aproximadamente un 25% del total de los concentrados de plaquetas que se producen. En el caso de tumores sólidos, un ensayo que emplea un régimen de quimioterapia intensivo en pacientes con cáncer de ovario ha mostrado que rHuTPO elevó el nadir del recuento plaquetario, redujo la duración de la trombocitopenia y disminuyó un 50% las necesidades de transfusiones de plaquetas<sup>(44)</sup>. También se han ensayado, en un estudio preliminar, la administración semanal de romiplostim a pacientes con trombocitopenia en el curso de tratamientos citostáticos por diversos tumores sólidos. Esta terapia incrementa las cifras de plaquetas de los enfermos con un adecuado perfil de seguridad (tasa de desarrollo de episodios trombóticos similar a la observada en esta población). En dicho trabajo, no obstante, no se analiza el impacto de esta respuesta a nivel de requerimientos transfusionales<sup>(45)</sup>.

A diferencia de lo que parece observarse en tumores sólidos, la administración de PEG-rHuMGDF tras quimioterapia de consolidación a pacientes con leucemia aguda mieloblástica<sup>(46)</sup> o tras tratamiento de acondicionamiento en trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos<sup>(47)</sup> ha mostrado resultados desalentadores, no consiguiendo incrementos en las cifras de plaquetas ni una reducción en los requerimientos transfusionales de éstas.

## Conclusión

En los últimos veinte años, el desarrollo y aplicación de factores de crecimiento nos ha permitido, entre otros beneficios, sustituir la fuente de progenitores hematopoyéticos empleados para trasplante y hacer un uso más sensato de los AEE para el tratamiento de la anemia en diversos contextos. A pesar del entusiasmo inicial suscitado por el uso de agonistas del receptor de TPO en el tratamiento de las trombocitopenias, es poco probable que estos agentes vayan a tener un impacto mayor sobre las transfusiones de plaquetas, puesto que su utilidad es limitada en el contexto agudo. Estos fármacos sí que podrían ofrecer un beneficio en aplasia medular, en quimioterapia no mieloablativa en pacientes oncológicos, aunque seguramente no en el contexto de la leucemia aguda ni en trasplante hematopoyético. En el momento actual, cuando la sangre es más segura que nunca y conociendo que los recursos económicos son limitados, las nuevas estrategias terapéuticas deberán basarse en principios de eficacia, seguridad y coste-efectividad, contando siempre con la posibilidad de inclusión de pacientes en ensayos clínicos.

## Bibliografía

1. Eschbach JW, Abdulhadi MH, Browne JK, Delano BG, Downing MR, Egrie JC, et al. Recombinant human erythropoietin in anemic patients with end-stage renal disease: results of a phase III multicenter clinical trial. *Ann Intern Med* 1989; 111: 992-1000.
2. Palmer SC, Navaneethan SD, Craig JC, Johnson DW, Tonelli M, Garg AX, et al. Meta-analysis: erythropoiesis-stimulating agents in patients with chronic kidney disease. *Ann Intern Med* 2010; 153: 23-33.
3. Tonelli M, Winkelmayer WC, Jindal KK, Owen WF, Manns BJ. The cost-effectiveness of maintaining higher hemoglobin targets with erythropoietin in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2003; 64: 295-304.
4. KDIGO clinical practice guidelines for anemia in chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* 2012; 2: 288-335.
5. Padullés-Zamora N, Comas-Sugrañes D, Pineda-Yuste MM, Jódar-Masanés R, Martínez-Castelao A. Use of methoxy polyethylene glycol-epoetin beta in stage 3,4 or 5 non-dialysis chronic kidney disease. *Nefrología* 2012; 32: 221-7.
6. Tonia T, Mettler A, Robert N, Schwarzer G, Seidenfeld J, Weingart O, et al. Erythropoietin or darbepoetin for patients with cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 12: CD003407
7. Aapro M, Jelkmann W, Constantinescu SN, Leyland-Jones B. Effects of erythropoietin receptors and erythropoiesis-stimulating agents on disease progression in cancer. *Br J Cancer* 2012; 106: 1249-58.
8. Moyo V, Lefebvre P, Duh MS, Yektashenas B, Mundle S. Erythropoiesis-stimulating agents in the treatment of anemia in myelodysplastic syndromes: a meta-analysis. *Ann Hematol* 2008; 87: 527-36.
9. Terpos E, Mougiou A, Kouraklis A, Chatzivassili A, Michalis E, Giannakoulas N, et al. Prolonged administration of erythropoietin increases erythroid response rate in myelodysplastic syndromes: a phase II trial in 281 patients. *Br J Haematol* 2002; 118: 174-80.
10. Michallet M, Goldet K, Sobh M, Morisset S, Chelghoum Y, Thomas X, et al. Prospective study of erythropoietin use on quality of life and cost effectiveness in acute myeloid leukemia and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation patients. *Cancer* 2013; 119: 107-14.
11. Hart C, Grassinger J, Andreesen R, Hennemann B. EPO in combination with G-CSF improves mobilization effectiveness after chemotherapy with ifosfamide, epirubicin and etoposide and reduces costs during mobilization and transplantation of autologous hematopoietic progenitor cells. *Bone Marrow Transplant* 2009; 43: 197-206.
12. Etchason J, Petz L, Keeler E, Calhoun L, Kleinman S, Snider C, et al. The cost effectiveness of preoperative autologous blood donations. *N Engl J Med* 1995; 332: 719-24.
13. Feagan BG, Wong CJ, Kirkley A, Johnston DW, Smith FC, Whitsitt P, et al. Erythropoietin with iron supplementation to prevent allogeneic blood transfusion in total hip joint arthroplasty. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 2000; 133: 845-54.
14. Couvret C, Laffon M, Baud A, Payen V, Burdin P, Fuscuardi J. A restrictive use of both autologous donation and recombinant human erythropoietin is an efficient policy for primary total hip or knee arthroplasty. *Anesth Analg* 2004; 99: 262-71.
15. André M, Baudoux E, Bron D, Canon JL, D'Hondt V, Fassotte MF, et al. Phase III randomized study comparing 5 or 10 microg per kg per day of filgrastim for mobilization of peripheral blood progenitor cells with chemotherapy, followed by intensification and autologous transplantation in patients with nonmyeloid malignancies. *Transfusion* 2003; 43: 50-7.
16. Kroschinsky F, Hölig K, Poppe-Thiede K, Zimmer K, Orde-mann R, Blechschmidt M, et al. Single-dose pegfilgrastim for the mobilization of allogeneic CD34+ peripheral blood progenitor cells in healthy family and unrelated donors. *Haematologica* 2005; 90: 1665-71.
17. Kroschinsky F, Hölig K, Ehninger G. The role of pegfilgrastim in mobilization of hematopoietic stem cells. *Transfus Apher Sci* 2008; 38: 237-44.
18. Fischer JC, Frick M, Wassmuth R, Platz A, Punzel M, Wernet P. Superior mobilisation of haematopoietic progenitor cells with glycosylated G-CSF in male but not female unrelated stem cell donors. *Br J Haematol* 2005; 130: 740-6.
19. Sourgens H, Lefrère F. A systematic review of available clinical evidence -filgrastim compared with lenograstim. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2011; 49: 510-8.
20. Schmitt M, Xu X, Hilgendorf I, Schneider C, Borchert K, Gläser D, et al. Mobilization of PBSC for allogeneic transplantation by the use of the G-CSF biosimilar XM02 in healthy donors. *Bone Marrow Transplant* 2013; 48 (7): 922-5.
21. Sivgin S, Karakus E, Kaynar L, Kurnaz F, Pala C, Keklik M, et al. The comparison of Filgrastim (Neupogen®), biosimilar filgrastim (Leucostim®) and Lenograstim (Granocyte®) as a first line peripheral blood stem cell mobilization strategy in autologous hematopoietic stem cell transplantation: A single center experience from Turkey. *Transfus Apher Sci* 2013; 48 (3): 315-20.
22. Liunbruno GM, Petrini C. Ethical issues and concerns about the use of biosimilar granulocyte colony-stimulating factors for the mobilisation of stem cells in normal donors. *Blood Transfus* 2012; 10: 550-2.
23. Briddell RA, Hartley CA, Smith KA, McNiece IK. Recombinant rat stem cell factor synergizes with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in vivo in mice to mobilize peripheral blood progenitor cells that have enhanced repopulating potential. *Blood* 1993; 82: 1720-3.
24. Begley CG, Bassar R, Mansfield R, Thomson B, Parker WR, Layton J, et al. Enhanced levels and enhanced clonogenic capacity of blood progenitor cells following administration of

- stem cell factor plus granulocyte colony-stimulating factor to humans. *Blood* 1997; 90: 3378-89.
25. To LB, Bashford J, Durrant S, MacMillan J, Schwarer AP, Prince HM, et al. Successful mobilization of peripheral blood stem cells after addition of ancestim (stem cell factor) in patients who had failed a prior mobilization with filgrastim (granulocyte colony-stimulating factor) alone or with chemotherapy plus filgrastim. *Bone Marrow Transplant* 2003; 31: 371-8.
  26. Morgan SJ, Seymour JE, Grigg A, Matthews JP, Prince HM, Wolf MM, et al. Predictive factors for successful stem cell mobilization in patients with indolent lymphoproliferative disorders previously treated with fludarabine. *Leukemia* 2004; 18: 1034-8.
  27. Gazitt Y. Comparison between granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the mobilization of peripheral blood stem cells. *Curr Opin Hematol* 2002; 9: 190-8.
  28. Kuter DJ, Goodnough LT, Romo J, DiPersio J, Peterson R, Tomita D, et al. Thrombopoietin therapy increases platelet yields in healthy platelet donors. *Blood* 2001; 98: 1339-45.
  29. Kuter DJ, Bussel JB, Lyons RM, Pullarkat V, Gernsheimer TB, Senecal FM, et al. Efficacy of romiplostim in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura: a double-blind randomized controlled trial. *Lancet* 2008; 371: 395-403.
  30. Bussel JB, Provan D, Shamsi T, Cheng G, Psaila B, Kovaleva L, et al. Effect of eltrombopag on platelet counts and bleeding during treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura: a randomized, double blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2009; 373: 641-8.
  31. Sekeres MA, Kantarjian H, Fenaux P, Becker P, Boruchov A, Guerci-Bresler A, et al. Subcutaneous or intravenous administration of romiplostim in thrombocytopenic patients with lower risk myelodysplastic syndromes. *Cancer* 2011; 117: 992-1000.
  32. Kantarjian HM, Giles FJ, Greenberg PL, Paquette RL, Wang ES, Gabrilove JL, et al. Phase 2 study of romiplostim in patients with lower intermediate-risk myelodysplastic syndrome receiving azacitidine therapy. *Blood* 2010; 116: 3163-70.
  33. Roth M, Will B, Simkin G, Narayanagari S, Barreyro L, Bartholdy B, et al. Eltrombopag inhibits the proliferation of leukemia cells via reduction of intracellular iron and induction of differentiation. *Blood* 2012; 120: 386-94.
  34. Mittelman M, Assouline S, Briasoulis E, Alonso A, García Delgado R, O'Gorman P, et al. Eltrombopag treatment of thrombocytopenia in advanced myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia: results of the 8-week open-label part of an ongoing study. *American Society of Hematology* 2012, comunicación 633.
  35. Olnes MJ, Scheinberg P, Calvo KR, Desmond R, Tang Y, Dumitriu B, et al. Eltrombopag and improved hematopoiesis in refractory aplastic anemia. *N Engl J Med* 2012; 367: 11-9.
  36. Nakamura M, Toombs CE, Duarte IG, Ronson RS, Schmarkey LS, Katzmark SL, et al. Recombinant human megakaryocyte growth and development factor attenuates post-bypass thrombocytopenia. *Ann Thorac Surg* 1998; 66: 1216-23.
  37. Basser RL, Rasko JE, Clarke K, Cebon J, Green MD, Grigg AP, et al. Randomized, blinded, placebo-controlled phase I trial of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor with filgrastim after dose-intensive chemotherapy in patients with advanced cancer. *Blood* 1997; 89: 3118-28.
  38. Somlo G, Sniecinski I, ter Veer A, Longmate J, Knutson G, Vuk-Pavlovic S, et al. Recombinant human thrombopoietin in combination with granulocyte colony-stimulating factor enhances mobilization of peripheral blood progenitor cells, increases peripheral blood platelet concentration, and accelerates hematopoietic recovery following high-dose chemotherapy. *Blood* 1999; 93: 2798-806.
  39. Goodnough LT, Kuter DJ, McCullough J, Slichter SJ, DiPersio J, Romo J, et al. Prophylactic platelet transfusions from healthy apheresis platelet donors undergoing treatment with thrombopoietin. *Blood* 2001; 98: 1346-51.
  40. Piacibello W, Sanavio F, Garetto L, Severino A, Bergandi D, Ferrario J, et al. Extensive amplification and self-renewal of human primitive hematopoietic stem cells from cord blood. *Blood* 1997; 89: 2644-53.
  41. Thon JN, Italiano JE. Platelet formation. *Semin Hematol* 2010; 47: 220-6.
  42. Afdhal NH, Giannini EG, Tayyab G, Mohsin A, Lee JW, Andriulli A, et al. Eltrombopag before procedures in patients with cirrhosis and thrombocytopenia. *N Engl J Med* 2012; 367: 716-24.
  43. Balduini CL, Pecci A, Savoia A. Recent advances in the understanding and management of MYH9-related inherited thrombocytopenias. *Br J Haematol* 2011; 154: 161-74.
  44. Vadhan-Raj S, Verschraegen CE, Bueso-Ramos C, Broxmeyer HE, Kudelka AP, Freedman RS, et al. Recombinant human thrombopoietin attenuates carboplatin-induced severe thrombocytopenia and the need for platelet transfusions in patients with gynecologic cancer. *Ann Intern Med* 2000; 132: 364-8.
  45. Parameswaran R, Soff GA. Romiplostim in a case series of chemotherapy-induced thrombocytopenia. *American Society of Hematology* 2011; comunicación 1170.
  46. Geissler K, Yin JA, Ganser A, Sanz MA, Szer J, Raghavachar A, et al. Prior and concurrent administration of recombinant human megakaryocyte growth and development factor in patients receiving consolidation chemotherapy for de novo acute myeloid leukemia — a randomized, placebo-controlled, double-blind safety and efficacy study. *Ann Hematol* 2003; 82: 677-83.
  47. Schuster MW, Beveridge R, Frei-Lahr D, Abboud CN, Cruickshank S, Macri M, et al. The effects of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor (PEG-rHuMGDF) on platelet recovery in breast cancer patients undergoing autologous bone marrow transplantation. *Exp Hematol* 2002; 30: 1044-50.

# La beta-2-glicoproteína en la patogénesis del síndrome antifosfolípido

VÍCTOR ARQUEROS, CHARI LÓPEZ-PEDRERA, FRANCISCO VELASCO

Servicio de Hematología. Instituto Maimónides de Investigación Biomédica (IMIBIC).

Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba

## Definición y etiología

El síndrome antifosfolípido (SAF) es un estado pro-trombótico de naturaleza autoinmune que puede afectar al sistema vascular (venoso y/o arterial), o bien presentar complicaciones obstétricas. Su diagnóstico requiere la presencia de un criterio clínico y otro de laboratorio (Tabla 1)<sup>(1)</sup>. Estos últimos

**Tabla 1. Criterios establecidos para el diagnóstico del SAF**

Criterios clínicos	Trombosis vascular	≥ 1 episodio de trombosis arterial y/o venosa confirmada por imagen o histopatología
	Clasificación según presencia o ausencia de factores de riesgo adicional:	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Primer episodio IAM o ictus después de 55 años (varones) o 65 (mujeres) en presencia de factor de riesgo para enfermedad cardiovascular</li> <li>Neoplasias, inmovilización prolongada, cirugía, anticonceptivos, síndrome nefrótico</li> <li>Trombofilias congénitas</li> </ul>	
	Morbilidad obstétrica	<ul style="list-style-type: none"> <li>≥ 1 muerte intrauterina (&gt; 10.ª semana de gestación) de fetos de morfología normal</li> <li>≥ 1 nacimientos prematuros (&lt; 34.ª semana de gestación) de neonatos normales debido a eclampsia/preeclampsia severa o insuficiencia placentaria severa</li> <li>≥ 3 abortos tempranos (&lt; 10.ª semana de gestación) excluyendo causas maternas anatómicas u hormonales, y causas cromosómicas</li> </ul>
Criterios de laboratorio	Presencia de aCL (IgG y/o IgM) en título moderado o alto en al menos 2 determinaciones separadas más de 12 semanas	
	Detección de AL en al menos 2 determinaciones separadas más de 12 semanas	
	Presencia de aβ <sub>2</sub> -GPI (IgG y/o IgM) en al menos 2 determinaciones separadas más de 12 semanas	

### Otras recomendaciones:

- Estudiar la presencia de aPL al menos 12 semanas después del episodio clínico
- No diagnosticar SAF si al detectar la presencia de aPL la clínica ocurrió hace > 5 años
- No usar el término "SAF secundario", sino "SAF asociado a"
- Patologías y datos de laboratorio que no se incluyen en el diagnóstico: enfermedad valvular cardíaca, livedo reticularis, trombocitopenia y/o nefropatía asociada a aPL; presencia de, entre otros anticuerpos, aCL-IgA, aβ<sub>2</sub>-GPI-IgA o aPT

están representados por los anticuerpos antifosfolípido (aPL) detectados por técnicas de ELISA (anticuerpos anticardiolipina [aCL] y antibeta-2-glicoproteína I [anti-β<sub>2</sub>-GPI]), y por los aPL detectados por técnicas coagulativas (anticoagulante circulante lupus-like [AL]). Dicho fenómeno está producido por la interferencia de algunos anticuerpos sobre los test de coagulación fosfolípido-dependientes.

El SAF es el más común de los trastornos tromboticos adquiridos<sup>(2)</sup>. En consecuencia, el Subcomité para los Anticuerpos Antifosfolípido de la Sociedad de Trombosis y Hemostasia ha ofrecido unas recomendaciones sobre la selección de pacientes en los que está indicado descartar, con distinto grado de idoneidad, la presencia del SAF (Tabla 2)<sup>(3,4)</sup>.

Aunque la presencia de aPL es necesaria para atribuir un evento trombotico al síndrome, la forma en que estos anticuerpos realmente conducen a la trombosis es aún un área para la investigación. Uno de los primeros estudios, realizado en 1990, identificó la principal diana antigénica de este grupo heterogéneo de anticuerpos como la proteína del plasma β<sub>2</sub>-GPI<sup>(5)</sup>. La especificidad anti-β<sub>2</sub>-GPI de los aPL está relacionada con la fisiopatología del SAF, habiéndose demostrado mediante estudios clínicos y epidemiológicos que los anticuerpos anti-β<sub>2</sub>-GPI son un factor de riesgo significativo de morbilidad para desarrollar trombosis y de mortalidad en adultos jóvenes<sup>(6,7)</sup>.

Es importante, también, entender por qué este componente fisiológico de la sangre humana se convierte en un objetivo de autoanticuerpos patógenos. Por ello, actualmente, uno de los principales retos en el SAF es desenmascarar el mecanismo específico de la producción de los anti-β<sub>2</sub>-GPI, el cual permitirá una mejor comprensión de la fisiopatología de este síndrome.

## Beta-2-glicoproteína

La β<sub>2</sub>-GPI es una proteína con un polipéptido de cadena única con una masa molecular de aproximadamente 50 kDa. Su concentración en plasma es de aproximadamente 200 μg/mL<sup>-1</sup> y su lugar principal de síntesis es el hígado<sup>(8)</sup>. La β<sub>2</sub>-GPI se compone de cinco

**Tabla 2. Recomendaciones para la elección de pacientes en los cuales realizar pruebas de laboratorio para el SAF**

<b>Alta idoneidad</b>	Pacientes no ancianos con tromboembolismo venoso inexplicable; trombosis arterial en pacientes jóvenes (<50 años); trombosis en sitios inusuales; pérdida tardía del embarazo; cualquier trombosis o morbilidad en el embarazo en pacientes con una enfermedad autoinmunitaria
<b>Moderada idoneidad</b>	Mujeres jóvenes con pérdida recurrente espontánea y temprana del embarazo; tromboembolismo venoso provocado; pacientes asintomáticos que casualmente presentan un TTPa prolongado
<b>Baja idoneidad</b>	Pacientes de edad avanzada con tromboembolismo venoso o arterial

TTPa: tiempo de tromboplastina parcial activado

dominios (DI-V). Cada uno de los primeros cuatro dominios contiene cuatro cisteínas, con puentes disulfuro que unen la primera a la tercera y la segunda a la cuarta. El quinto dominio tiene una cola extra de 20 aminoácidos, con una terminación inusual en una cisteína que forma un enlace disulfuro en forma de bucle con una cisteína extra, encontrándose a medio camino entre las posiciones estándar segunda y tercera de la cisteína<sup>(9)</sup>. El dominio V es crítico para la unión de  $\beta_2$ -GPI a los fosfolípidos aniónicos<sup>(10)</sup>.

Aunque la función de la  $\beta_2$ -GPI está aún por definir, una considerable cantidad de trabajos apoyan un papel regulador en la coagulación, la fibrinólisis, la angiogénesis y la apoptosis. Se espera seguir avanzando en el descubrimiento de nuevas funciones de la  $\beta_2$ -GPI a raíz de los recientes hallazgos sobre el efecto de la modificación por oxidación postraduccional de esta proteína, que se produce en condiciones de estrés oxidativo.

Se han identificado otras dianas antigénicas distintas de la  $\beta_2$ -GPI en pacientes con SAF, incluyendo<sup>(11)</sup>: la protrombina, el activador del plasminógeno tisular (t-PA), la plasmina, la anexina A2 y la trombina. La  $\beta_2$ -GPI y la protrombina son los blancos antigénicos principales en el SAF, y parece razonable afirmar que los mecanismos fisiopatológicos dominantes tienden a involucrar a anticuerpos dirigidos contra estos antígenos.

## Fisiopatología

Una serie de hallazgos recientes sugieren que el SAF se caracteriza por un aumento del estrés oxidativo. La actividad paraoxonasa, que explica las propiedades antioxidantes de las lipoproteínas de colesterol de alta densidad, evitando la oxidación de las de baja densidad (LDL), se redujo significativamente en las personas con el síndrome. Los niveles plasmáticos del complejo  $\beta_2$ -GPI/LDL oxidado están elevados en

personas con el SAF, en comparación con los controles sanos.

Dicho estrés juega un papel directo en la estructura y función de  $\beta_2$ -GPI en pacientes con el síndrome. La  $\beta_2$ -GPI purificada se compone de cuatro dominios que contienen dos puentes disulfuro cada uno y un quinto dominio que contiene un puente disulfuro adicional que liga la cisteína (Cys) 288 con Cys326 (Figura 1). En personas sanas, la forma tiol libre de  $\beta_2$ -GPI predomina en el plasma, caracterizada por un puente disulfuro roto en Cys32 y Cys60, y otro en Cys288 y Cys326. El primer par de tioles libres está cerca del epítipo para las células B en el dominio I, y el último se encuentra cerca del epítipo para las células T en el dominio V. Los puentes disulfuro en estas localizaciones se rompen por la tiorredoxina-1-oxidoreductasa y la proteína disulfido-isomerasa (PDI). Bajo condiciones de estrés oxidativo, los enlaces disulfuro se forman en estos sitios desenmascarando el epítipo crítico para las células B.

La proporción plasmática relativa de  $\beta_2$ -GPI oxidada, en comparación con la forma tiol libre, fue significativamente mayor en los pacientes con el SAF que en los pacientes con enfermedad autoinmune, pero sin dicho síndrome. Asimismo, pacientes con el síndrome que eran positivos tanto para AL y para anticuerpos anti- $\beta_2$ -GPI tenían niveles significativamente más altos de  $\beta_2$ -GPI oxidada que los pacientes que fueron positivos para anticuerpos anti- $\beta_2$ -GPI únicamente.

La relación entre estrés oxidativo y SAF también ha sido puesta de manifiesto por nuestro grupo. En este sentido hemos observado que monocitos de pacientes con SAF presentaban, junto a marcadores protrombóticos, un incremento en la producción de peróxido nuclear Nrt2, actividad enzimática antioxidante, disminución del glutatión intracelular y un potencial de membrana mitocondrial alterado. Una perturbación oxidativa que puede ser prevenida mediante el tratamiento con coenzima Q<sup>(10)</sup> (CoQ10)<sup>(12)</sup>.

Por otra parte, la  $\beta_2$ -GPI puede existir en una forma circular, con el dominio I interactuando con el dominio V. En esta forma, el epítipo crítico está oculto del sistema inmunitario. Cuando se une a una superficie fosfolipídica aniónica a través del dominio V, la forma circular se abre presentando una configuración en forma de anzuelo, exponiendo el epítipo del dominio I y permitiendo que los autoanticuerpos anti- $\beta_2$ -GPI se unan a él (Figura 2). La presencia de la forma circular todavía no se ha demostrado directamente en el plasma humano; sin embargo, las evidencias apuntan a su presencia *in vivo*. La unión del dominio I con los anticuerpos anti- $\beta_2$ -GPI se indujo en ratones a los que se administró la proteína H (derivada de *Streptococcus pyogenes*). La proteína H cambia la conformación de la  $\beta_2$ -GPI de circular a la forma abierta, teóricamente más inmunogénica *in vitro*.

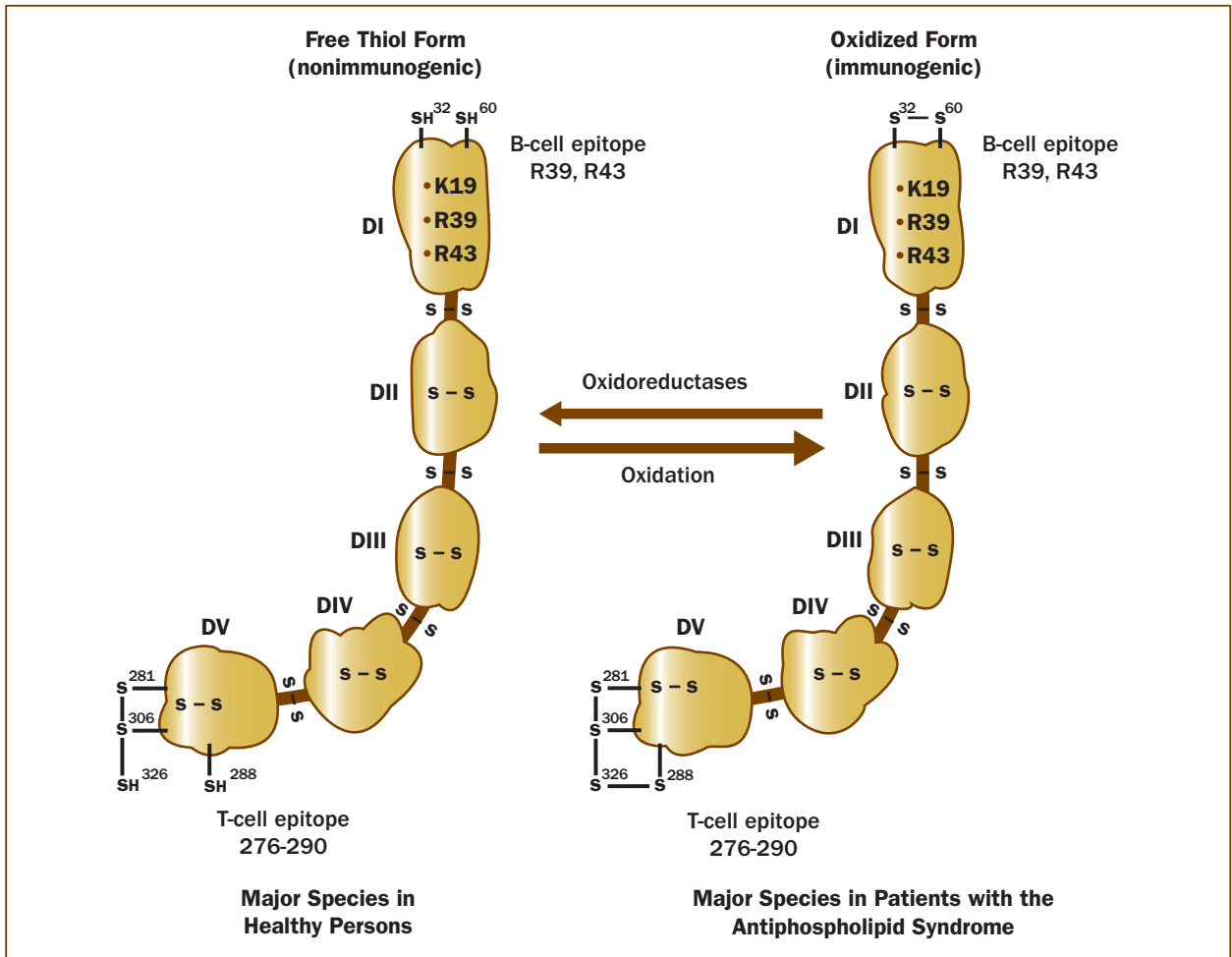


Figura 1. Representación esquemática de la estructura cristalina (configuración en anuelo) de la  $\beta_2$ -glicoproteína I (adaptada de Bill Giannakopoulos et al.; N Engl Journal Med 2013, 368: 11).

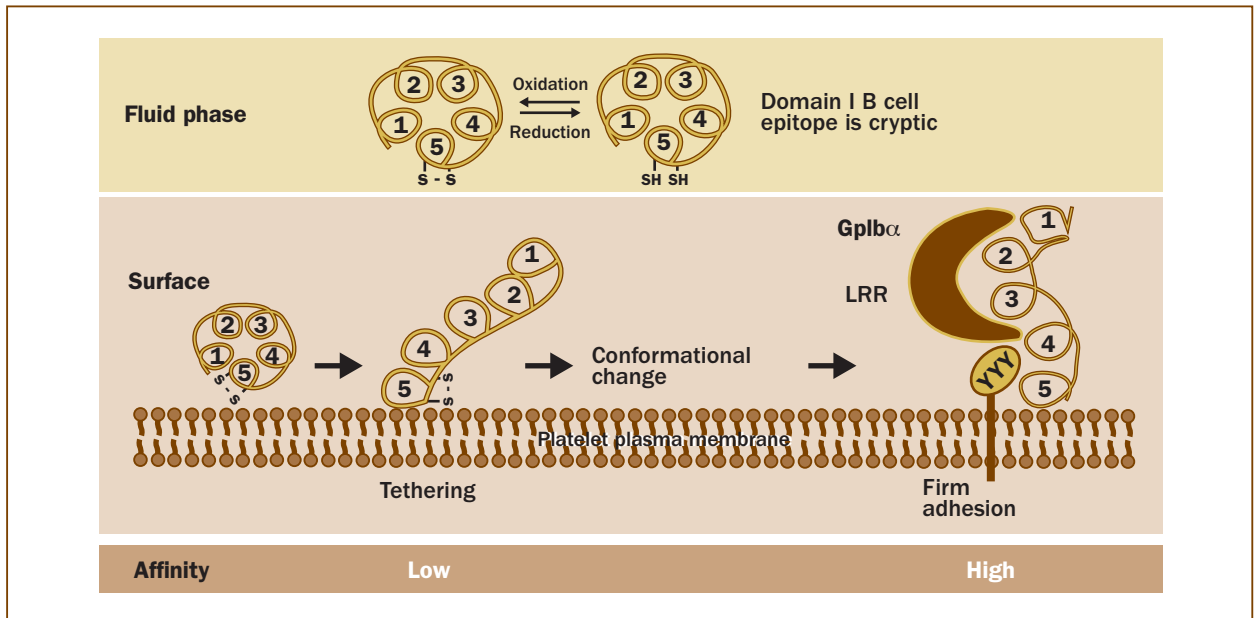


Figura 2. Modelo hipotético de conformación de la unión de  $\beta_2$ -GPI a receptores de la superficie celular exponiendo los principales epítomos del dominio I a células B (adaptada de Passam FH, et al. J Thromb Haemost 2011; 9 (Suppl. 1): 275-82).

Sin embargo, a pesar de estos conocimientos, los anticuerpos de pacientes con SAF que se infunden en ratones no promueven la formación de trombos en ausencia de una lesión de la pared endotelial de los vasos. Un hallazgo que sugiere la necesidad de un modelo de “dos hitos” para que se produzcan las complicaciones trombóticas: un “primer hito”, que estaría representado por una lesión celular inicial, y un “segundo hito”, cuyo resultado es un estado de hipercoagulabilidad con un incremento en la formación de trombos. En este sentido, se ha demostrado que la estimulación celular es un paso clave para permitir la formación de complejos inmunes de  $\beta_2$ -GPI sobre la superficie de la célula.

No obstante, aunque la infección, la cirugía y el estrés oxidativo se han reconocido como factores desencadenantes, en la mayoría de los casos de trombosis asociadas al SAF el estímulo original no está identificado.

Recientemente, Bill Giannakopoulos *et al.*<sup>(13)</sup>, en una excelente revisión, han puesto en evidencia distintos mecanismos patogénicos, los cuales abren la posibilidad a nuevas dianas terapéuticas.

### Síntesis endotelial de óxido nítrico

El óxido nítrico derivado del endotelio desempeña un papel importante en la función endotelial sana. Es producido por la conversión enzimática de la L-arginina por la sintetasa endotelial del óxido nítrico. La reducción de la expresión y la actividad de esta enzima pueden influir en la generación de iones superóxido y peroxinitrito.

Los pacientes con SAF tienen deteriorada la respuesta vascular dependiente del endotelio, lo que sugiere que la actividad de la sintetasa endotelial de óxido nítrico es anormal, y presentan niveles plasmáticos descendidos de nitrito.

En un modelo murino, los autoanticuerpos anti- $\beta_2$ -GPI sobre el dominio I disminuyen el óxido nítrico biodisponible mediante antagonismo de la actividad de su sintetasa endotelial, provocando así la adhesión de los monocitos al endotelio<sup>(14)</sup>. La relajación arterial dependiente del óxido nítrico endotelial se inhibió por los autoanticuerpos anti- $\beta_2$ -GPI en estos ratones, lo que refleja perturbaciones vasculares similares a las de los humanos con anticuerpos antifosfolípido.

En este sentido, las estatinas –inhibidores de 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzimaA (HMG-CoA) reductasa– bloquean las propiedades trombogénicas de los aPL *in vitro* e *in vivo*. Así, estos hipolipemiantes pueden ser protectores en el SAF debido en parte a su sobre-regulación sobre la sintetasa endotelial de óxido nítrico.

Se están llevando a cabo una serie de estrategias para interrumpir la formación de los complejos inmunes de  $\beta_2$ -GPI en las superficies celulares. Una

molécula dimérica A1-A1 bloquea la formación de moléculas de complejos inmunes de  $\beta_2$ -GPI en las superficies de fosfolípidos aniónicos. Los ratones tratados con A1 monomérico soluble están protegidos de los efectos trombogénicos de los autoanticuerpos anti- $\beta_2$ -GPI, proporcionando la evidencia para el principio de que los dímeros A1-A1 tienen valor terapéutico. La infusión del dominio I sintético de  $\beta_2$ -GPI se mostró protectora en un modelo murino frente a la trombosis inducida por autoanticuerpos anti- $\beta_2$ -GPI.

### Células endoteliales y monocitos

Los aPL pueden sobreregular la expresión en la superficie celular de moléculas proadhesivas y procoagulantes, como el factor tisular<sup>(15)</sup>. Los autoanticuerpos anti- $\beta_2$ -GPI pueden inducir la señalización por medio de un complejo multiproteína sobre la superficie de la célula endotelial, que incluye la anexina A2 (unida por  $\beta_2$ -GPI), el receptor *Toll-like 4* (TLR-4), calreticulina y nucleolina.

Se ha demostrado que la  $\beta_2$ -GPI está co-localizada con la anexina A2 y TLR-4 en los grupos de lípidos de los monocitos. Los autoanticuerpos anti- $\beta_2$ -GPI estimulan los monocitos para aumentar la expresión del factor tisular y el factor de necrosis tumoral  $\beta$  (TNF- $\beta$ ). La expresión inducida del factor tisular en monocitos por el autoanticuerpo antifosfolípido está mediada a través de una serie de vías de señalización intracelular, recientemente identificadas por nuestro grupo<sup>(16)</sup>.

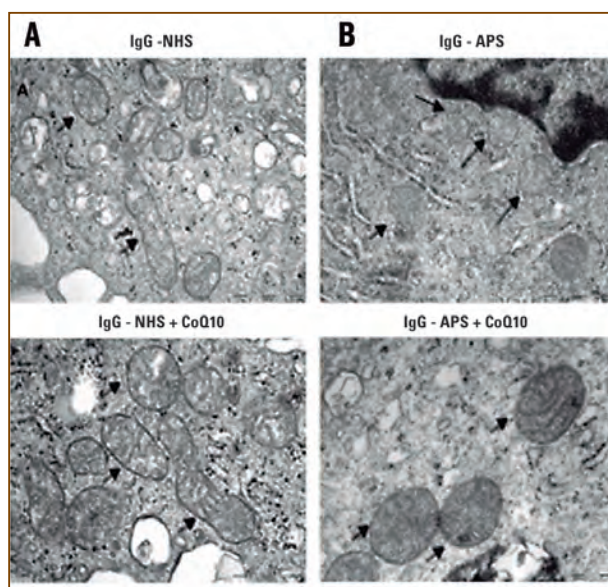
Los autoanticuerpos de pacientes con SAF también pueden interrumpir, como hemos señalado más arriba, la función mitocondrial de los monocitos y los neutrófilos (Figura 3), lo que conduce a la generación de diversas sustancias intracelulares oxígeno-reactivas y la subsiguiente expresión de factores procoagulantes, como el factor tisular (FT).

### Factor tisular

El FT es el iniciador clave de la vía extrínseca de la coagulación. Se encuentra en las superficies y micropartículas celulares en una forma inactiva. En la lesión del vaso que conduce a la exposición de fosfatidilserina, el FT se convierte en una forma activa, lo que le permite unirse al factor VIIa, que conduce a la activación de los factores IX y X. La relevancia del FT en la patogénesis del SAF está apoyada por resultados *in vitro* e *in vivo* en estudios murinos.

Estudios elaborados en nuestro laboratorio han puesto de manifiesto que en los monocitos de pacientes con SAF y trombosis hay una mayor expresión de FT que en los de pacientes con SAF, pero sin eventos trombóticos<sup>(15)</sup>.





**Figura 3. Protección del daño mitocondrial por la coenzima Q10: (A) en presencia de inmunoglobulina normal; (B) en presencia de inmunoglobulina de SAF (adaptada de Pérez-Sánchez C, et al. Blood 2012; 119: 5859-70).**

De esta forma, la PDI, un regulador extracelular de intercambio tiólico asociado a la expresión del factor tisular en la superficie celular, y sus inhibidores podrían jugar un importante papel terapéutico en la regulación del FT en la patogénesis del síndrome antifosfolípido.

### Factor XI

Se ha descubierto un vínculo entre el SAF y la activación disregulada del factor XI. El factor XI es una proenzima que se escinde a su forma activa (factor XIa) por el factor XIIa. El factor XIa es responsable de la activación del factor IX, conduciendo en última instancia a una explosión de la generación de trombina. El factor XI puede ser un sustrato de la tiorredoxina-1-oxidoreductasa y de la PDI, cuya diana son los enlaces disulfuro intracatenarios Cys118-Cys147 y Cys362-Cys482 del factor XI y el enlace intercatenario entre Cys321-Cys321, generando tioles libres en estas posiciones<sup>(17)</sup>. En un estudio, los pacientes con SAF tenían niveles significativamente más altos de la forma tiol libre del factor XI que en los controles emparejados por edad y sexo. Los inhibidores de la PDI y el factor XIa son eficaces en el tratamiento de la trombosis en modelos animales, pero sus mecanismos de acción requieren una exploración más amplia. La inhibición del factor XI proporciona protección contra la trombosis, sin asociarse con un mayor riesgo de sangrado en estos modelos, haciendo del factor XI una atractiva diana terapéutica.

### Plaquetas

La  $\beta_2$ -GPI puede interactuar con el receptor de glicoproteína Ib $\beta$  del factor de von Willebrand y el receptor 2 de la apolipoproteína E. Esto permite a los autoanticuerpos anti- $\beta_2$ -GPI entrecruzarse con estos receptores, lo que conduce al aumento de la activación plaquetaria, la liberación de tromboxano A2, y un aumento de la adhesividad de las plaquetas. El factor 4 plaquetario, una proteína catiónica liberada por las plaquetas activadas, puede facilitar la dimerización de  $\beta_2$ -GPI, permitiendo la formación de complejos inmunes patógenos en la superficie de las plaquetas.

### Anexina A5 e hidroxiclороquina

En un modelo de patogénesis del SAF, la anexina A5 se une a la fosfatidilserina de las superficies celulares, formando un escudo que inhibe la formación de complejos procoagulantes<sup>(18)</sup>. Un estudio *in vitro* ha demostrado que los autoanticuerpos anti- $\beta_2$ -GPI pueden interrumpir el escudo, exponiendo a la fosfatidilserina procoagulante y, por lo tanto, predisponiendo a la trombosis. La hidroxiclороquina inhibe la capacidad de los complejos inmunes  $\beta_2$ -GPI para interrumpir la matriz de anexina A5 en la superficie de células endoteliales, disminuyendo la trombosis *in vivo* en un modelo murino.

### Complemento y neutrófilos

Otros estudios murinos *in vivo*, que implican la activación de la vía clásica del complemento en la trombosis asociada con el SAF, fueron la base para el uso de eculizumab (inhibidor de la fracción C5), que puede prevenir la microangiopatía trombótica asociada al síndrome como complicación del trasplante renal, y para tratar a los pacientes con SAF catastrófico agudo. La activación del complemento por los aPL genera C5a, que se une y activa los neutrófilos, lo que lleva a la expresión del FT. Sobre la base de los estudios murinos, C3 y C5 se han propuesto como posibles dianas terapéuticas para el tratamiento del SAF obstétrico<sup>(19)</sup>.

### Alteración de la inmunidad innata

La prevalencia de la positividad del AL entre los pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) es del 30%, y su presencia en estos pacientes se asocia con un mayor riesgo de trombosis (*odds ratio*: 5,6). El 40% de los pacientes con SAF también tienen LES, y el 37% de los pacientes con LES tienen autoanticuerpos

anti- $\beta_2$ -GPI. Estos hallazgos sugieren que existe una superposición en la patogénesis de estas dos entidades.

La relación entre los dos trastornos está apoyada por el desarrollo espontáneo de autoanticuerpos anti- $\beta_2$ -GPI de dominio I y el desarrollo de un síndrome similar al SAF humano en un modelo murino (ratones machos NZW x BXSB F1) de lupus. Los anticuerpos de los pacientes con el SAF son capaces de regular positivamente la expresión de los receptores TLR-7 y TLR-8 en las células dendríticas y monocitos, respectivamente, así como su translocación desde el retículo endoplásmico al endosoma, sensibilizando las células a los ligandos TLR-7 y TLR-8. Estos efectos dependen de la absorción de aPL en el endosoma, la activación de la NADPH oxidasa y la generación de iones superóxido.

La inhibición de TLR-7 y TLR-8 puede ser una diana terapéutica atractiva en los pacientes con LES y aPL. De acuerdo con esta idea, la hidroxiclороquina se ha demostrado que inhibe a TLR-7<sup>(20)</sup>, y que está asociada con una probabilidad reducida para la persistencia de anticuerpos antifosfolípido en pacientes con LES.

A la luz de estos resultados, podemos decir que en el SAF no sólo encontramos distintos anticuerpos, sino que también existen numerosos mecanismos patogénicos responsables del mismo. Un mejor conocimiento de estos mecanismos y de su interrelación nos permitirá diseñar nuevas estrategias terapéuticas frente a las complicaciones trombóticas.

## Agradecimientos

*Este trabajo ha sido financiado en parte por un proyecto de la Junta de Andalucía: P08-CVI-04234.*

## Bibliografía

1. Elstrom R, Guan L, Baker G, Nakhoda K, Vergilio JA, Zhuang H, et al. Utility of FDG-PET scanning in lymphoma by WHO classification. *Blood* 2003; 101: 3875-6.
1. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 295-306.
2. Passam FH, Giannakopoulos B, Mirarabshahi P, Krilis SA. Molecular pathophysiology of the antiphospholipid syndrome: the role of oxidative post-translational modification of beta 2 glycoprotein I. *J Thromb Haemost* 2011; 9 (Suppl. 1): 275-82.
3. Rand JH, Wolgast LR. Dos and don'ts in diagnosing antiphospholipid syndrome. Pearls and pitfalls in the hematology lab: clotting and bleeding. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012; 2012: 455-9.
4. Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, et al. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 1737-40.
5. de Groot PG, Urbanus RT. The significance of autoantibodies against  $\beta_2$ -glycoprotein I. *Blood* 2012; 120 (2): 266-74.
6. Meroni PL, Peyvandi F, Foco L, Bernardinelli L, Fetiveau R, Mannucci PM, et al. Anti-beta 2 glycoprotein I antibodies and the risk of myocardial infarction in young premenopausal women. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 2421-8.
7. Urbanus RT, Siegerink B, Roest M, Rosendaal FR, de Groot PG, Algra A. Antiphospholipid antibodies and risk of myocardial infarction and ischaemic stroke in young women in the RA-TIO study: a case-control study. *Lancet Neurol* 2009; 8: 998-1005.
8. Lozier J, Takahashi N, Putnam FW. Complete amino acid sequence of human plasma beta 2-glycoprotein I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81: 3640-4.
9. Miyakis S, Giannakopoulos B, Krilis SA. Beta 2 glycoprotein I — function in health and disease. *Thromb Res* 2004; 114: 335-46.
10. Hunt JE, Simpson RJ, Krilis SA. Identification of a region of beta 2-glycoprotein I critical for lipid binding and anti-cardiolipin antibody cofactor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 2141-5.
11. Giannakopoulos B, Passam F, Rahgozar S, Krillis SA. Current concepts on the pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2007; 109: 422-30.
12. Perez-Sanchez C, Ruiz-Limon P, Aguirre MA, Bertolaccini ML, Khamashta MA, Rodriguez-Ariza A, et al. Mitochondrial dysfunction in antiphospholipid syndrome: implications in the pathogenesis of the disease and effects of coenzyme Q(10) treatment. *Blood* 2012; 119: 5859-70.
13. Giannakopoulos B, Krilis SA. The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med* 2013; 368: 1033-44.
14. Ramesh S, Morrell CN, Tarango C, Thomas GD, Yuhanna IS, Girardi G, et al. Antiphospholipid antibodies promote leukocyte-endothelial cell adhesion and thrombosis in mice by antagonizing eNOS via  $\beta_2$ GPI and apoER2. *J Clin Invest* 2011; 121: 120-31.
15. Cuadrado MJ, López-Pedraza Ch, Khamashta M, Torres A, Hughes GR, Velasco F, et al. Thrombosis in primary antiphospholipid syndrome: a pivotal role for monocyte tissue factor expression. *Arthritis Rheum* 1997; 40 (5): 834-41.
16. López-Pedraza C, Buendía P, Cuadrado MJ, Siendones E, Aguirre MA, Barbarroja N, et al. Antiphospholipid antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome induce monocyte tissue factor expression through the simultaneous activation of NF-kappaB/Rel proteins via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, and of the MEK-1/ERK pathway. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 301-11.
17. Giannakopoulos B, Gao L, Qi M, Wong JW, Yu DM, Vlachoyiannopoulos PG, et al. Factor XI is a substrate for oxidoreductases: enhanced activation of reduced FXI and its role in antiphospholipid syndrome thrombosis. *J Autoimmun* 2012; 39: 121-9.
18. Rand JH, Wu XX, Andree HA, Lockwood CJ, Guller S, Scher J, et al. Pregnancy loss in the antiphospholipid antibody syndrome — a possible thrombogenic mechanism. *N Engl J Med* 1997; 337: 154-60. [Erratum, *N Engl J Med* 1997; 337:1327.]
19. Holers VM, Girardi G, Mo L, Guthridge JM, Molina H, Pierangeli SS, et al. Complement C3 activation is required for antiphospholipid antibody-induced fetal loss. *J Exp Med* 2002; 195: 211-20.
20. Kuznik A, Bencina M, Svajger U, Jeras M, Rozman B, Jerala R. Mechanism of endosomal TLR inhibition by antimalarial drugs and imidazoquinolines. *J Immunol* 2011; 186: 4794-804.

# Manejo hemostático de la hemorragia crítica

ENRIC CONTRERAS<sup>(1)</sup>, RAFAEL PARRA<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Banc de Sang i Teixits. Hospital Universitari Joan XXIII. Tarragona

<sup>(2)</sup> Unidad de Coagulopatías Congénitas. Banc de Sang i Teixits. Barcelona

## Introducción

La definición más utilizada de *hemorragia masiva* es la **pérdida de un volumen sanguíneo en 24 horas**. En el adulto, un volumen sanguíneo representa aproximadamente el 7% de su peso ideal, y en los niños el 8%. Existen definiciones alternativas de ayuda en situaciones agudas que incluyen la **pérdida del 50% de la volemia en menos de 3 horas, hemorragias superiores a 150 mL/min** (3 litros en 20 minutos), o bien la **administración de más de 4 concentrados de hematíes en un periodo inferior a 1 hora**<sup>(1)</sup>.

Entre las situaciones con mayor riesgo de sufrir una hemorragia masiva se encuentran determinadas cirugías, los politraumatismos y las hemorragias digestivas y obstétricas. Cabe recordar que, en el caso de los pacientes politraumáticos, la hemorragia masiva se ha convertido en la principal causa de muerte potencialmente controlable.

Para el manejo de estos pacientes se requiere un abordaje multidisciplinar, que incluye especialistas de medicina intensiva, anestesia, banco de sangre, hematología, laboratorio y cirugía. Es recomendable que el centro disponga de un protocolo de transfusión masiva propio, en el que consten aspectos tales como quién ha de iniciar el protocolo, qué componentes sanguíneos se deben transfundir y qué parámetros de laboratorio hay que monitorizar<sup>(2)</sup>.

Aunque los pacientes que necesitan una transfusión masiva no forman un grupo uniforme, hay objetivos comunes que deben ser atendidos prioritariamente<sup>(3)</sup>:

- Tratar el foco hemorrágico.
- Mantener la perfusión tisular (cristaloides/coloides).
- Optimizar la oxigenación tisular (hematíes).
- Evitar la acidosis y la hipotermia.
- Corregir la hemostasia.

## Coagulopatía asociada a hemorragia crítica

La coagulopatía que suele acompañar a una hemorragia masiva es un factor independiente asociado a mortalidad.

La fisiopatología de la coagulopatía asociada a hemorragia masiva en pacientes que previamente eran hemostáticamente competentes es muy compleja. El

inicio de la coagulopatía está liderado por la propia hemorragia, que conduce a la pérdida de factores de coagulación y de plaquetas, pero en su progresión intervienen numerosos factores<sup>(4-8)</sup>.

## Activación de la coagulación

En los casos en los que la hemorragia masiva es secundaria a traumatismo, la exposición de superficie endotelial rica en tromboplastina induce la activación de la coagulación, hecho que puede desencadenar una coagulopatía de consumo. En las etapas iniciales, los pacientes con traumatismos importantes presentan un estado de hipercoagulabilidad por este motivo. La presencia de tejidos lesionados puede potenciar la acción del activador tisular del plasminógeno, hecho que puede ayudar a desencadenar un estado de hiperfibrinólisis.

## Hemodilución

La administración de grandes cantidades de fluidos intravenosos para restablecer la volemia produce una hipocoagulabilidad por dilución. La hemodilución no es relevante hasta que no se ha administrado el equivalente a una volemia. El primer factor de la coagulación que presenta reducciones significativas suele ser el fibrinógeno. Se detectan niveles críticos (inferiores a 1 g/L) cuando se ha repuesto el equivalente a 1,5 volemias. Es importante tener en cuenta que algunas de las soluciones usadas en resucitación (hidroxi-etil almidón, dextrano, gelatinas) interfieren, además, en la función plaquetaria y en la polimerización de la fibrina, hechos que pueden agravar la coagulopatía. Las soluciones salinas hipertónicas presentan efecto anticoagulante e interfieren en la normal función de las plaquetas.

## Hipotermia

Se define como hipotermia a una temperatura corporal <35 °C. La hipotermia puede estar producida por múltiples factores:

- Temperatura de los fluidos de reposición.
- Pérdida de calor corporal *in situ* en los casos de politraumatismos.
- Disminución de la producción de calor secundaria al shock.
- Pérdida de calor pleural y/o peritoneal en casos de cirugía torácica o abdominal.

Los mecanismos de influencia de la hipotermia en la coagulopatía son diversos:

- Enlentecimiento global de todas las reacciones enzimáticas, entre las que se encuentran las de la coagulación. A 35 °C todos los factores de la coagulación ven reducida su actividad. El factor XI y el XII presentan una actividad del 65% a esta temperatura.
- Alteración en la función plaquetaria mediante inhibición de la interacción entre el factor von Willebrand y las glicoproteínas plaquetarias.
- Disminución del recuento de plaquetas.
- Estímulo de la fibrinólisis.

### Acidosis

La acidosis, que se produce como consecuencia del déficit de perfusión tisular, inhibe la actividad enzimática y afecta a toda la cascada de la coagulación. Los estudios de Meng *et al.* mostraron que una disminución del pH de 7,4 a 7,0 provocaba una reducción de la actividad del 90% del factor VIIa, del 55% del complejo factor VIIa-factor tisular (FT) y del 70% del complejo factor Xa-factor Va. Por otra parte, la acidosis dificulta la polimerización de la fibrina y disminuye la consistencia del coágulo formado.

### Hipocalcemia

Disminución del calcio ionizado. Las unidades de componentes sanguíneos contienen citrato como sustancia anticoagulante. La transfusión masiva infunde cantidades importantes de citrato, que actúa como quelante del calcio. La disponibilidad de calcio ionizado es esencial para la formación y estabilización del polímero de fibrina. Por otra parte, la disminución del calcio intraplaquetario influye negativamente en la actividad de las plaquetas.

### Anemia

Aunque se desconoce cuál es el nivel óptimo de hemoglobina o hematocrito que favorece una hemostasia normal, es conocido que la anemia influye negativamente en la hemostasia. En condiciones normales, los hematíes circulan por el centro de los vasos sanguíneos, hecho que favorece que las plaquetas se sitúen

cerca de las paredes del vaso (marginación). En casos de anemia, este fenómeno no se produce, hecho que dificulta su acción en el lugar de la lesión vascular.

### Soporte transfusional

En los pacientes con hemorragia masiva, la tríada letal (hipotermia, acidosis y coagulopatía) tiene un impacto directo en la morbimortalidad. La utilización precoz de componentes sanguíneos y hemoderivados es fundamental para mejorar la evolución de estos pacientes<sup>(9)</sup>. A continuación se detallan los productos disponibles, dosis y formas de monitorización:

#### Plasma fresco congelado

La utilización del plasma fresco congelado (PFC) se basa en que el déficit de factores de coagulación es la causa primaria de coagulopatía en transfusión masiva, debido a la dilución de los factores de coagulación como consecuencia de la reposición de volumen con cristaloides, coloides y transfusión de hematíes.

Los productos disponibles son: PFC procedente de fraccionamiento de una unidad de sangre total con un volumen de 200-300 mL, sometido a inactivación viral, y PFC de aféresis con un volumen de 300-600 mL y cuarentenado.

La pauta de tratamiento, monitorización y dosis es la siguiente:

- Si ratio TP/INR > 1,5 o ratio TTPa > 1,5, administrar PFC, ya que se correlacionan con un aumento del sangrado microvascular. Se monitoriza clínica y analíticamente. Administrar PFC tras reposición de 1-1,5 volemias de sangre. Dosis: 10-15 mL/kg, guiado por analítica.

En estudios recientes sobre transfusión masiva (algunos basados en la experiencia en guerras) se ha relacionado una disminución de la mortalidad con una proporción de transfusión de PFC : concentrado de hematíes (CH) de 1:1, aunque la evidencia disponible relacionada con la utilización de paquetes de componentes sanguíneos en la hemorragia masiva es aún escasa.

#### Concentrado de plaquetas

Las plaquetas son elementos formes de la sangre responsables de la hemostasia primaria. Sus niveles normales en sangre periférica son 150-350 × 10<sup>9</sup>/L. La alteración cuantitativa o funcional de las plaquetas conlleva una mayor tendencia hemorrágica. En el inicio de un proceso hemorrágico agudo, la médula ósea y el bazo liberan plaquetas a la circulación. El nivel

de plaquetas desciende en la fase tardía del sangrado. En casos de coagulación intravascular diseminada y/o hiperfibrinólisis, se produce una alteración del funcionalismo plaquetario. La pauta de tratamiento, monitorización y dosis es la siguiente:

- En los pacientes con hemorragia aguda, se aconseja transfundir plaquetas si la cifra es inferior a  $50 \times 10^9/L$ . En la hemorragia aguda por politraumatismo, se recomienda mantener la cifra de plaquetas por encima de  $100 \times 10^9/L$ , sobre todo cuando existe afectación del SNC. Se ha demostrado una mayor supervivencia en los pacientes con hemorragia masiva que reciben plaquetas de forma temprana, junto a CH y PF. Un *pool* de plaquetas (mezcla o aféresis) es suficiente para pacientes de hasta 100 kg de peso. Cada unidad aumenta el recuento plaquetario en aproximadamente 30.000-50.000 plaquetas (siempre que no existan factores de hiperconsumo: hemorragia, infección...).

## Tratamiento farmacológico

Además de la transfusión de hematíes, plasma y plaquetas, existen otros productos farmacológicos que se han utilizado en el tratamiento de la coagulopatía de la hemorragia masiva<sup>(10-14)</sup>.

### Fibrinógeno

La hipofibrinogenemia es un componente habitual de la coagulopatía que acompaña a la hemorragia masiva. Durante la reposición, el fibrinógeno es el primer factor que disminuye hasta niveles críticos, aunque la hipofibrinogenemia no contribuye probablemente a la hemorragia hasta niveles de fibrinógeno  $< 1$  g/L.

Los niveles de fibrinógeno se han correlacionado con la evolución de la hemorragia. Así, en la hemorragia posparto, el nivel de fibrinógeno es el único parámetro de la coagulación que indica de manera independiente la progresión hacia la hemorragia grave; niveles  $< 2$  g/L tienen un valor predictivo positivo del 100%. En la cirugía coronaria, las pérdidas sanguíneas y la necesidad de transfusión están inversamente relacionadas con el nivel preoperatorio de fibrinógeno.

En la monitorización del tratamiento con fibrinógeno, el tromboelastograma es preferible a la determinación de niveles en el laboratorio, ya que éstos tienen tendencia a sobrestimar la concentración de fibrinógeno real.

Indicación: hemorragia en presencia de niveles de fibrinógeno  $< 1,5-2$  g/L.

*Dosis recomendada para un adulto de 70 kg:* concentrado de fibrinógeno: 40-60 mg/kg, que aumenta el

fibrinógeno en 0,7-1 g/L; o crioprecipitado: 8-10 unidades (cada unidad contiene entre 140 y 360 mg de fibrinógeno), que aumenta el fibrinógeno en 0,5-0,7 g/L.

No existe evidencia de superioridad de una fuente de fibrinógeno sobre la otra<sup>(15)</sup>. Hay que recordar también que con cada unidad de plasma transfundida se administran 0,5 g de fibrinógeno.

No se ha demostrado un aumento de trombosis venosa con la administración de fibrinógeno.

### Ácido tranexámico

Es un derivado sintético de la lisina que inhibe competitivamente la plasmina y el plasminógeno. El estudio prospectivo CRASH-2<sup>(16)</sup>, que incluye más de 20.000 pacientes traumáticos en 274 centros, ha demostrado que la utilización precoz de ácido tranexámico ( $< 3$  horas del accidente) reduce la mortalidad en estos pacientes con hemorragia grave.

Asimismo, numerosos estudios<sup>(17)</sup> han demostrado la eficacia del ácido tranexámico en la reducción de la hemorragia en cirugía electiva (especialmente cirugía cardíaca). El beneficio de los antifibrinolíticos en esas situaciones en las que no hay una hiperfibrinólisis evidente sugiere que, en condiciones normales, cuando un paciente tiene un vaso sangrante, existe una fibrinólisis de bajo grado que exacerba el sangrado.

*Dosis utilizada en adultos:* 1 g (10-15 mg/kg) en 10 minutos tan pronto como sea posible y preferiblemente antes de las 3 horas, y seguir con 1 g/8 h.

No se ha demostrado un aumento de trombosis venosa o arterial con su utilización.

### rFVIIa

El rFVIIa interacciona con el factor tisular en el endotelio expuesto de la zona dañada; el complejo rFVIIa-FT inicia la cascada de la coagulación hasta la generación de trombina, y finalmente la formación del coágulo de fibrina. La indicación principal de rFVIIa es el tratamiento de los pacientes hemofílicos que presentan inhibidor frente al factor VIII o IX de la coagulación. También está indicado en la hemofilia adquirida, déficit selectivo de FVII y trombostenia de Glanzmann. Sin embargo, el rFVIIa se ha utilizado fuera de la ficha técnica en diferentes situaciones, principalmente en el manejo de la coagulopatía refractaria asociada a la transfusión masiva, aunque sin estar avalado por una evidencia científica sólida.

Su indicación en esta situación es muy controvertida. En algunos estudios retrospectivos se ha observado asociación con una reducción significativa en los requerimientos transfusionales y en el número total

de productos usados. Boffard<sup>(19)</sup>, en dos estudios prospectivos, observó una reducción en las necesidades transfusionales en traumatismos cerrados, así como en la necesidad de transfusión masiva. En los traumatismos penetrantes también se observó dicha asociación, pero sin significado estadístico. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la mortalidad en relación a la utilización o no de rFVIIa.

Sin embargo, la utilización de rFVIIa en indicaciones fuera de la ficha técnica es frecuente. En una revisión de 73.747 casos tratados con rFVIIa en EE UU<sup>(18)</sup> entre 2000 y 2008, únicamente 3.121 pacientes (4,2%) eran hemofílicos. Las principales indicaciones en una revisión 2007-2010 de los hospitales canadienses<sup>(20)</sup> fueron: cirugía cardíaca (71%), trauma (7%), hemorragia intracraneal (7%), cirugía hepática/abdominal (4%).

Por otro lado, una reciente revisión de 2012 de 29 estudios aleatorizados del National Advisory Committee on Blood and Blood Products (NAC) de Canadá<sup>(20)</sup>, sobre el uso de rFVIIa en la hemorragia masiva (cirugía cardíaca, trauma, hemorragia intracraneal espontánea, trasplante hepático, resección hepática y hemorragia digestiva en cirrosis), demostró que no existe un beneficio demostrado en su utilización y, por el contrario, sí se demuestra un aumento de complicaciones tromboembólicas arteriales. Los autores concluyen que el rFVIIa no se debe utilizar en indicaciones fuera de ficha técnica para la prevención y tratamiento de la hemorragia en pacientes sin hemofilia.

No obstante, la utilización de rFVII en los estudios citados probablemente no sea la misma que en las situaciones clínicas en las que rFVIIa se utiliza como recurso desesperado delante de una hemorragia “refractaria”. En tales situaciones la eficacia de rFVIIa no ha sido formalmente analizada, ya que dichos pacientes con hemorragia “refractaria” no son los pacientes habitualmente incluidos en los protocolos de estudio donde rFVIIa se indica como prevención de la hemorragia o en un momento decidido con antelación en el proceso de recuperación de un paciente sangrante.

En resumen, el rFVIIa no se debe considerar un fármaco de primera línea en el tratamiento de la hemorragia masiva. Sólo se debe considerar su uso si el tratamiento de primera línea (cirugía, uso de componentes sanguíneos de manera adecuada, antifibrinolíticos y corrección de la acidosis, hipotermia e hipocalcemia) no consigue detener la hemorragia. Una vez se ha detenido la hemorragia principal causada por las vasos dañados, el rFVIIa puede ser útil para inducir la coagulación en áreas de hemorragia difusa coagulopática de pequeño vaso<sup>(20)</sup>.

Si se utiliza, y para asegurar su eficacia, se debe corregir la acidosis y la hipotermia, así como ase-

gurar niveles de fibrinógeno >1,5 g/L, plaquetas >50 × 10<sup>9</sup>/L y hematocrito >24%<sup>(14)</sup>.

*Dosis:* politraumatizados: inicial 100-140 ug/kg, seguida de dos dosis más con 1-3 horas de diferencia si son necesarias. Periquirúrgica: 90 ug/kg que puede repetirse.

*Riesgos de rFVIIa:* aumento de complicaciones tromboembólicas: 5,6%, frente al 3% en pacientes tratados con placebo. Las complicaciones trombóticas arteriales (AVC no hemorrágico, síndrome coronario agudo) son más frecuentes que las venosas (TVP, TEP).

### Concentrado de complejo protrombínico

La indicación principal es revertir, en situación de emergencia, el efecto de los fármacos antivitaminas K. La rapidez en la reversión del efecto anticoagulante cuando se utiliza concentrado de complejo protrombínico (CCP) es mayor que con el plasma, y actualmente se considera el fármaco de elección en esa situación.

Algún estudio reciente<sup>(21)</sup> sugiere que el aporte de grandes cantidades de factores de la coagulación desde el inicio de la hemorragia (pautas de transfusión con ratio 1:1:1 de hematíes, plasma y plaquetas) mejoraría la mortalidad de los pacientes con hemorragia grave postraumática. El CCP aportaría en esta situación una gran cantidad de factores de la coagulación de forma rápida. No obstante, hacen falta más estudios para determinar si CCP es eficaz y seguro en el tratamiento de la hemorragia en pacientes traumáticos que no toman antivitaminas K.

Existe un aumento teórico del riesgo de trombosis venosa y arterial con la utilización de CCP.

La dosificación se realiza de acuerdo con las instrucciones del fabricante (existen variaciones entre diferentes productos). La mayoría de los autores recomiendan dosis individualizadas teniendo en cuenta el peso e INR, con dosis 15-50 UI/kg.

### Desmopresina

Aumenta la adherencia de las plaquetas al subendotelio. No está indicada de manera rutinaria en el paciente con hemorragia traumática. Únicamente se puede considerar su uso en la hemorragia microvascular refractaria si el paciente ha sido tratado con fármacos antiplaquetarios.

*Dosis:* 0,3 µg/kg.

Presenta el riesgo de complicación tromboembólica en algunos pacientes. Se ha descrito un aumento 2,4× en el riesgo de infarto de miocardio en pacientes de edad avanzada.

## Bibliografía

1. Hardy JF. Massive transfusion and coagulopathy: pathophysiology and implications for clinical management. *Can J Anesth* 2004; 51 (4): 293-310.
2. Rossaint R, Bouillon B, Cerny V, Coats TJ, Duranteau J, Fernández-Mondéjar E, et al. Management of bleeding following major trauma: an updated European guideline. *Critical Care* 2010; 14: R52.
3. Shaz BH, Dente CJ, Harris RS, MacLeod JB, Hillyer CD. Transfusion management of trauma patients. *Anesth Analg* 2009; 108: 1760-8.
4. Lier H, Böttiger BW, Hinkelbein J, Krep H, Bernhard M. Coagulation Management in multiple trauma: a systematic review. *Intensive Care Med* 2011; 37 (4): 572-82.
5. Johnston TD, Chen Y, Reed RL. Functional equivalence of hypothermia to specific clotting factor deficiencies. *J Trauma* 1994; 37: 413-7.
6. Baker SP, O'Neill B. The injury severity score: an update. *J Trauma* 2003; 55: 886-91.
7. Valeri CR, Cassidy G, Pivacek LE, Ragno G, Lieberthal W, Crowley JP, et al. Anemia-induced increase in the bleeding time: implications for treatment of nonsurgical blood loss. *Transfusion* 2001; 41: 977-83.
8. Tieu BH, Holcomb JB, Schreiber MA. Coagulopathy: its pathophysiology and treatment in the injured patient. *World J Surg* 2007; 31: 1055-64.
9. British Committee for Standards in Haematology, Stainsby D, MacLennan S, Thomas D, Isaac J, Hamilton PJ. Guidelines on the management of massive blood loss. *Br J Haematol* 2006; 135 (5): 634-41.
10. Riha GM, Schreiber MA. Update and new developments in the management of the exsanguinating patient. *J Intensive Care Med* 2013; 28 (1): 46-57.
11. Dzik WH, Blajchman MA, Fergusson D, Hameed M, Henry B, Kirkpatrick AW, et al. Clinical review: Canadian National Advisory Committee on Blood and Blood Products – Massive transfusion consensus conference 2011: report of the panel. *Critical Care* 2011; 15: 242.
12. Association of Anaesthetists of Great Britain and Ireland, Thomas D, Wee M, Clyburn P, Walker I, Brohi K, Collins P, et al. Blood transfusion and the anaesthetist: management of massive haemorrhage. *Anaesthesia* 2010; 65: 1153-61.
13. Young PP, Cotton BA, Goodnough LT. Massive transfusion protocols for patients with substantial hemorrhage. *Transf Med Rev* 2011; 25(4): 293-303.
14. Spahn DR, Bouillon B, Cerny V, Coats TJ, Duranteau J, Fernández-Mondéjar E, et al. Management of bleeding and coagulopathy following major trauma: an updated European guideline. *Crit Care* 2013; 17: R76.
15. Meyer MA, Ostrowski SR, Windeløv NA, Johansson PI. Fibrinogen concentrates for bleeding trauma patients: what is the evidence? *Vox Sang* 2011; 101: 185-90.
16. CRASH-2 collaborators, Roberts I, Shakur H, Afolabi A, Brohi K, Coats T, Dewan Y, et al. The importance of early treatment with tranexamic acid in bleeding trauma patients: an exploratory analysis of the CRASH-2 randomised controlled trial. *Lancet* 2011; 377 (9771): 1096-101.
17. Ker K, Edwards P, Perel P, Shakur H, Roberts I. Effect of tranexamic acid on surgical bleeding: systematic review and cumulative meta-analysis. *BMJ* 2012; 344: e3054.
18. Logan AC, Yank V, Stafford RS. Off-label use of recombinant factor VIIa in U.S. hospitals: analysis of hospital records. *Ann Intern Med* 2011; 154: 516-22.
19. Boffard KD, Riou B, Warren B, Choong PI, Rizoli S, Rossaint R, et al. Recombinant factor VIIa as adjunctive therapy for bleeding control in severely injured trauma patients: two parallel randomized, placebo-controlled, double blind clinical trials. *J Trauma* 2005; 59: 8-15.
20. Lin Y, Moltzan CJ, Anderson DR; National Advisory Committee on Blood and Blood Products. The evidence for the use of recombinant factor VII in massive bleeding: revision of the transfusion policy framework. *Transfusion Medicine* 2012; 22: 383-94.
21. Godier A, Saman CM. Plasma/platelets/red blood cell ratio in the management of the bleeding traumatized patient. Does it matter? *Curr Opin Anaesthesiol* 2012; 25: 242-7.

## Hemofilia adquirida

PASCUAL MARCO<sup>(1,2)</sup>, TAMARA LÓPEZ<sup>(1)</sup>, ÁNGEL GIMÉNEZ<sup>(1)</sup>, MARÍA JIMÉNEZ<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Servicio de Hematología-Hemoterapia. Hospital General Universitario.

<sup>(2)</sup> Departamento de Medicina Clínica. Universidad Miguel Hernández. Alicante

### Hemofilia adquirida

La hemofilia adquirida (HA) es una enfermedad autoinmune, relacionada con la producción de autoanticuerpos contra epítopes funcionales de factores de coagulación, especialmente contra el factor VIII:C (hemofilia A adquirida)<sup>(1,2)</sup>.

Clínicamente se caracteriza por el sangrado espontáneo o inducido por cirugía, o por maniobras invasivas en pacientes sin antecedentes personales o familiares de sangrado. Se deben establecer las diferencias conceptuales con la hemofilia A congénita con inhibidor (Figura 1). Ésta afecta a varones y se suele manifestar en edades tempranas de la vida, y con carga familiar de sangrado. Se suele expresar con hemartros; los inhibidores son aloanticuerpos contra el factor VIII:C utilizado como terapia sustitutiva, y en la mayoría con alteraciones genéticas relacionadas<sup>(3)</sup>.

La incidencia de la HA oscila sobre una media de 1,5 casos por millón de habitantes y año (rango: 0,1-1 y 1,5)<sup>(4)</sup>. Estos datos no son similares en todos los países, ni siquiera en Europa, ya que la HA puede quedar infradiagnosticada y asociada a muchas

comorbilidades que pueden confundir el proceso diagnóstico<sup>(4,5)</sup>.

Y es importante alcanzar lo antes posible el diagnóstico, ya que su mortalidad puede superar el 20%<sup>(2,4,5)</sup>. El diagnóstico debe ser biológico y clínico, buscar la patología desencadenante y aplicar lo antes posible el tratamiento que debe abarcar tanto la faceta hemostática como la inmunosupresora.

Al ser una enfermedad de baja incidencia, no se dispone de estudios que incluyan gran número de pacientes. La mayoría de las publicaciones son de diseños retrospectivos o de metaanálisis, con diferentes actitudes diagnósticas y terapéuticas<sup>(2,4-6)</sup>.

Con el objetivo de conseguir un registro amplio de pacientes que ayudase a conocer la situación de la hemofilia adquirida en Europa, el grupo EACH2 (European Acquired Hemophilia) ha publicado la serie prospectiva más larga de la literatura en la que participaron 117 centros de 13 países europeos<sup>(7)</sup>. Se incluyeron 501 pacientes entre 2003 y 2008.

Los datos demográficos de este registro muestran que el 53,1% eran varones, y la mediana de edad al diagnóstico de 73,9 años. No obstante, como era de

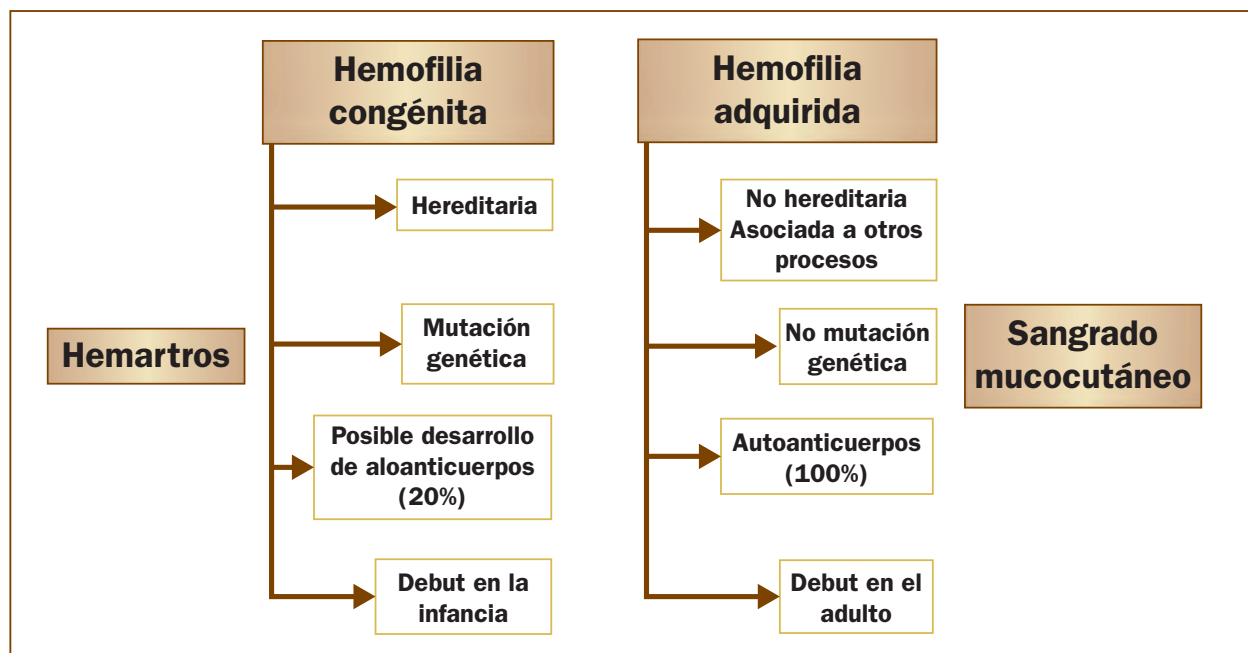


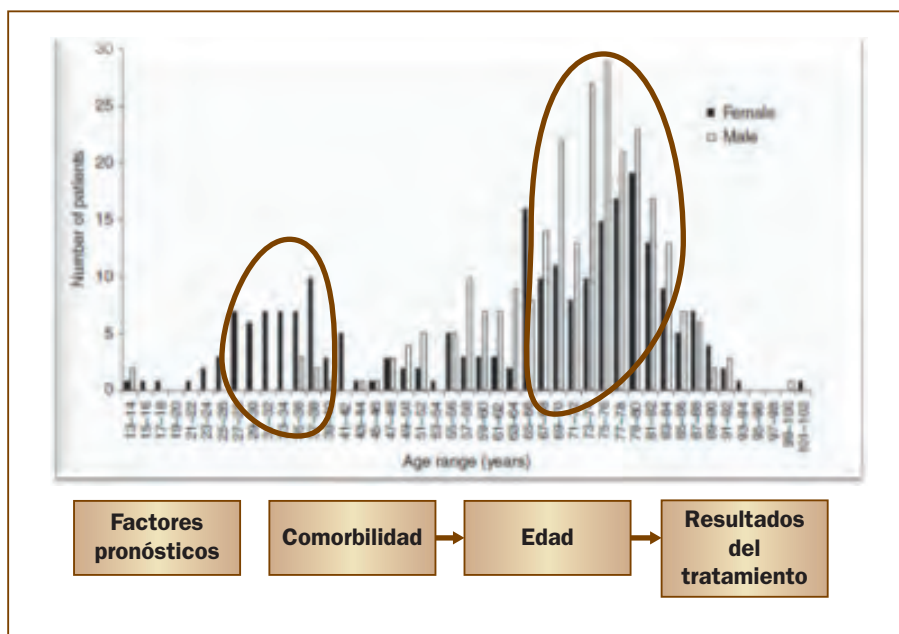
Figura 1. Diferencias entre hemofilia congénita y hemofilia adquirida.



**Tabla 1. Comparativa de las series más numerosas**

	EACH 2	Green & Lechner, 1981	Delgado et al., 2003	Collins et al., 2007
Number of patients	501	215	234	172**
Collection period	2003-2009		1985-2002	2001-2003
Age	73.9 (13.8-104.5)		64 (8-93)	78 (2-98)
Male sex	46.9%		45%	43%
FVIII	2 (0-40)		2 (0-30)	n.d.
Inhib	12.8 (0.1-2,800)		10 (0.9-32,000)	n.d.
<b>Underlying disorder</b>				
None (idiopathic)	260 (51.9)	82 (43.6)	135 (57.7)*	95 (63.3)
Malignancy (any)	59 (11.8)	12 (6.4)	43 (18.4)	22 (14.7)
Autoimmune disorder	67(13.4)	32 (17.0)	22 (9.4)	25 (16.7)
Post partum	42 (8.4)	13 (7.0)	34 (14.5)	3 (2.0)
Infections	19 (3.8)	n.d.	n.d.	n.d.
Dermatologic	7 (1.4)	8 (4.3)	n.d.	5 (3.3)
Drug induced	17 (3.4)	10 (5.3)	n.d.	n.d.
Others	58 (11.6)	21 (16.5)	n.d.	n.d.

esperar, se aprecia un pico de edad en mujeres jóvenes (mediana de 33,9 años), que corresponden al grupo de mujeres que desarrollan autoanticuerpos contra el factor VIII:C en el posparto y puerperio<sup>(7)</sup> (Figura 2).



**Figura 2. Demographic and clinical data in acquired hemophilia A: results from the European Acquired Haemophilia Registry (EACH2).**

Adaptada de J Thromb Haemost 2012; 10: 662-31.

En la **Tabla 1** se muestran los datos publicados de las series más largas de pacientes en comparación con los del grupo europeo, no apreciándose diferencias en los datos demográficos ni en las enfermedades concomitantes, resaltando que alrededor del 50% de los pacientes figuran como idiopáticos al diagnóstico<sup>(2,4,5,7)</sup>.

En la mayoría de los casos (89%), éste se sospechó ante un pacientes con manifestaciones hemorrágicas graves, que afectaron a músculos, mucosas (nasales, retroperitoneales, metrorragias) y, en ocasiones, el paciente puede sufrir un síndrome compartimental con riesgo isquémico de la extremidad<sup>(2,7)</sup> (Figura 3).

Respecto a las causas relacionadas con comorbilidades, hay que remarcar que, en todas las series<sup>(2,4,5,7)</sup>, alrededor del 50% son idiopáticas, sin objetivarse causa subyacente asociada, siendo las enfermedades autoinmunes (13,5%) y las neoplasias (11,8%) las que siguen en frecuencia.

Respecto al diagnóstico de la hemofilia adquirida, la gran mayoría de los casos (89%), el síntoma y signo fundamentales fueron las manifestaciones hemorrágicas<sup>(7)</sup>. Sólo menos del 8% debutaron sin sangrados. Si analizamos los parámetros de hemostasia que presentaban los pacientes, lo habitual es que el tiempo de protrombina y el tiempo de trombina sean normales, pero con una ratio aumentada del TTPa; aunque la alteración de esta prueba de coagulación y, siguiendo los datos del grupo europeo<sup>(7-9)</sup>, sólo sirvió para diagnosticar la patología en el 48% de los pacientes, ya que en el resto no se valoró o pasó desapercibida. Además, una vez que el paciente ha sangrado de forma

llamativa, la mediana de días al diagnóstico fue de tres, pero si el médico había valorado el TTPa la mediana de días al diagnóstico fue de un día, lo que facilitó la rápida instauración del tratamiento.

Es de suma importancia que el Servicio de Hematología tenga un protocolo de estudio del paciente que sangra y que presenta un alargamiento aislado del TTPa (Figura 4). Es imprescindible que se realice una prueba de mezcla (sobre técnica de TTPa) que ponga de manifiesto la presencia de un inhibidor en un paciente sin antecedentes de trastornos hemorrágicos congénitos, ni historia familiar de sangrado.



Figura 3. Detalles clínicos de pacientes con hemofilia A adquirida de nuestro servicio.

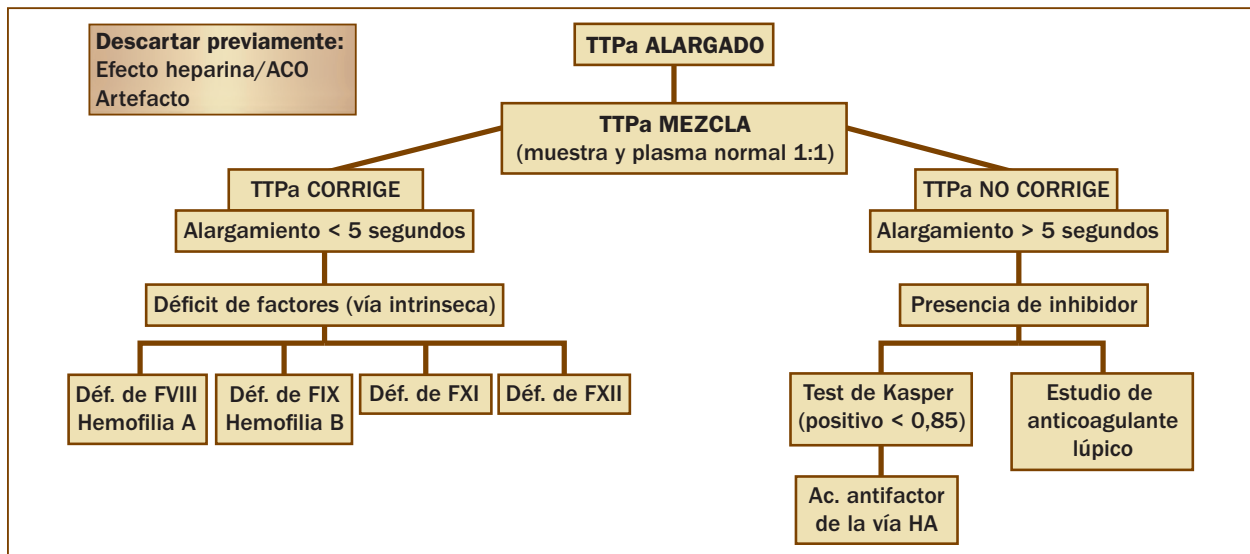


Figura 4. Propuesta de algoritmo para diagnóstico de hemofilia A adquirida y diagnósticos diferenciales.

En algunos casos es preciso que la prueba de mezcla, además de realizarla de forma convencional, deba hacerse con incubación a 37 °C, dadas las características cinéticas del autoanticuerpo, que es tiempo y temperatura-dependiente. Por ello, proponemos la prueba de Kasper<sup>(10)</sup> como prueba de mezcla modificada muy útil en la detección de inhibidores.

Otro aspecto a señalar en la HA es el nivel de actividad de factor VIII:C (HA adquirida), la actividad residual, con discrepancias entre los niveles del factor según se determine por técnica coagulante o cromogénica<sup>(11)</sup>. Con los resultados publicados<sup>(7)</sup>, el nivel de factor VIII:C fue inferior al 5% en al menos el 70-80% de los pacientes, y el título de inhibidor osciló entre 10 y 13 unidades Bethesda, pero resaltando todos los grupos que ni el nivel de inhibidor ni de factor

residual tenían una relación directa con la gravedad de la clínica hemorrágica<sup>(2,7)</sup>. No obstante, en los resultados del EACH2 se observó que los pacientes que fueron diagnosticados por la clínica de sangrado presentaban una actividad más baja de factor VIII:C, mayor título de inhibidor y anemia, en comparación con aquellos en los que el TTPa alargado fue el dato que hizo sospechar la HA<sup>(7)</sup>.

El sangrado que precipitó el diagnóstico fue espontáneo en el 77% de los pacientes, 8% traumático, 8% por cirugía y 36% parto-posparto. Fueron fundamentalmente en músculos y retroperitoneal (50,2%), tejido celular subcutáneo (53%) y mucosas (31,6%), y raro en articulaciones (4,9%) e intracraneal (1,1%).

El tratamiento de la HA debe ser doble: control del sangrado (hemostático) y borramiento del inhibidor

(inmunosupresor), que debe instaurarse lo antes posible y de forma simultánea<sup>(6)</sup>. Los datos del grupo EACH2 nos muestran que los pacientes que se diagnostican antes inician la terapia antes, aunque un retraso de 1 a 7 días en el diagnóstico no influyó en la mediana de días necesarios para resolver el sangrado (4,5 días)<sup>(7,8)</sup>. Del total de 501 pacientes incluidos en el registro del EACH2, el 94,6% presentaron sangrados en diversas localizaciones y sirvieron como orientación diagnóstica. De ellos, el 66,5% tuvieron un solo episodio hemorrágico, sin recidivas durante todo el seguimiento, pero un dato importante es que el 33,5% presentó más de un episodio de sangrado a lo largo del tratamiento, siendo la mediana entre el primer y segundo episodio hemorrágico de 28 días (14-69)<sup>(8)</sup>.

El tratamiento hemostático (Figura 5) es una de las bases fundamentales en la HA. La revisión de la literatura presenta diferentes productos prohemostáticos, complementados con transfusión de concentrados de hematíes según la necesidad clínica y la gravedad de la anemia<sup>(2,6,8)</sup>. Los agentes *bypass* hemostáticos, como el factor VII activado recombinante (FVIIar) y el FEIBA (*factor eight inhibitor by-passing agent*, concentrado de complejo protrombínico activado), son los productos más utilizados en la mayoría de las series publicadas<sup>(2,4-6,8)</sup>. También se han usado en menor grado y, desde luego, con menor eficacia el factor VIII:C a altas dosis, desmopresina, antifibrinolíticos y plasma fresco<sup>(6)</sup>.

Siguiendo la experiencia del grupo europeo<sup>(8)</sup> (la más amplia publicada), de los 501 pacientes incluidos, 144 (30%) no recibieron tratamiento hemostático. Entre los pacientes tratados y no tratados, las diferencias significativas se establecieron en la gravedad de la anemia (Hb: 8,6 vs. 10,9 g/dL), lugar y gravedad del sangrado. Sin embargo, el género, la edad, el nivel de factor VIII:C y el título de inhibidor no presentaron diferencias significativas. De los pacientes tratados con productos hemostáticos, el 56,7% fueron con FVIIar, 20,5% con FEIBA, 18,2% con factor

VIII:C a altas dosis y 4,6% con desmopresina. El sangrado se controló en el 79,6% de los pacientes. El único parámetro que fue significativamente diferente entre el grupo de pacientes que respondió respecto a los que no fue el tiempo de retardo de inicio del tratamiento hemostático (1 vs. 4 días), sin diferencias en el nivel de actividad del factor VIII:C ni del título de inhibidor, entre respondedores y no respondedores. El 14% de los pacientes no respondedores (69) precisaron tratamientos hemostáticos de segunda línea, la mayoría con FEIBA, con una respuesta del 79,4%.

Por otro lado, de los pacientes respondedores a la primera línea de tratamiento el 25,3% presentó recidiva del sangrado, con una mediana de días de 14 (3-45).

En la mayoría de las series los resultados hemostáticos fueron significativamente superiores en los pacientes tratados con los agentes *bypass* hemostático<sup>(1,2)</sup>.

No obstante, los resultados del grupo europeo, además de ser más amplios, reflejan la experiencia de muchos grupos en comparación con otras series que expresan los resultados de un solo centro<sup>(8)</sup>. El 91,8% de los pacientes tratados con FVIIar y con FEIBA consiguieron control de la hemostasia en contraste con el 69,6% del resto de la terapia prohemostática ( $p < 0,003$ ). Por otro lado, no hay estudios que comparen la eficacia del factor VII activado recombinante vs. el FEIBA, aunque los estudios en hemofilia congénita hacen suponer eficacia similar<sup>(6,8)</sup>. En ese sentido, en el grupo EACH2, para evitar el sesgo de selección de pacientes derivado de un registro multicéntrico, se aplicó una variante de manejo estadístico de los datos *propensity score* (PS), que aplica una selección de pacientes apareados en características demográficas, clínicas y biológicas, a fin de conseguir resultados menos dispersos y, por tanto, con mayor peso en los resultados<sup>(12)</sup>. De esta forma, en 114 (57/57) pacientes con características iguales, la respuesta media fue del 93% en ambos grupos; por tanto, sin diferencias entre los dos agentes *bypass*. Resultados similares se obtuvieron en el grupo global del registro. Por tanto, se deduce que ambos fármacos presentan la misma eficacia antihemorrágica.

Pero es necesario considerar los eventos trombóticos descritos asociados a estos tratamientos. En el grupo tratado, 13 pacientes presentaron complicaciones trombóticas (2,7%): 7 infartos de miocardio, 1 ictus isquémico cerebral y 5 tromboembolismos venosos. De ellos, 5 habían recibido FVIIar y 3 FEIBA. Los datos de la literatura muestran resultados similares, añadiendo que la edad es el único factor que se asocia a estos episodios trombóticos (79,4 vs. 68,3 años<sup>(8,13,14)</sup>). La mortalidad total de la serie fue del 19,5%, con una probabilidad de supervivencia global a los 4 años del 83%. Analizando por agente terapéutico: para el FVIIar

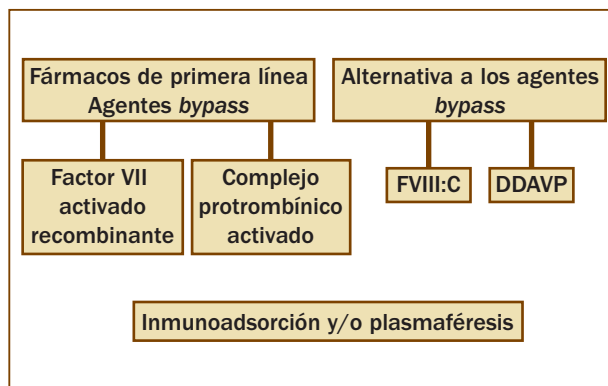


Figura 5. Control de la hemorragia.

16,7%, FEIBA 19% y 33% con FVIII:C, siendo estos últimos los que tienen menor probabilidad de supervivencia actuarial del 70%. La mortalidad asociada exclusivamente al sangrado fue del 3,3%<sup>(8)</sup>.

En conclusión, el tratamiento hemostático con agentes *bypass* representan la mejor opción para el tratamiento de la hemofilia A adquirida, con un 90% de respuestas, aunque se debe estar vigilante y considerar el riesgo trombotico de estos fármacos.

El tratamiento inmunosupresor es igual de crucial en el manejo de la HA, y debe iniciarse simultáneamente con el hemostático. Su objetivo será borrar el inhibidor, la remisión de la enfermedad y, por tanto, la supervivencia (Figura 6). Los tratamientos más descritos en la literatura son los corticoides solos (prednisona), corticoides y ciclofosfamida, rituximab (solo o asociado a otros inmunosupresores), ciclosporina, azatioprina, inmunoglobulinas y otros<sup>(6,9)</sup>. Una vez más, el registro europeo nos aporta una serie amplia de 294 pacientes tratados<sup>(9)</sup>. De ellos, 142 fueron tratados con esteroides, la mayoría con prednisona; 83 pacientes recibieron combinación de ciclofosfamida y prednisona, y 51 rituximab solo o combinado con prednisona u otros citotóxicos. El objetivo del tratamiento es alcanzar la remisión completa definida por una actividad del factor VIII:C >70% y desaparición

del inhibidor, tras suspender la terapia inmunosupresora<sup>(9)</sup>.

La tasa de remisiones completas (RC) es diferente según los protocolos utilizados: la asociación de corticoides y ciclofosfamida parece ser la más eficaz<sup>(1,6,9)</sup>, alcanzando la RC el 80%, mientras que en el grupo de corticoides fue del 58%. Un 61% de los protocolos que utilizan rituximab en conjunto alcanzaron la RC. Otros protocolos presentan diferencias marcadas en las tasas de respuestas, pero son resultados poco valiosos por el número reducido de pacientes<sup>(9)</sup>. Otro aspecto importante es el análisis de la recidiva después de la RC. Los pacientes tratados con corticoides sólo presentaron una tasa de recaídas del 18%, a diferencia del grupo tratado con corticoides y ciclofosfamida que fue del 12%. En el grupo de rituximab es sólo del 3%, pero estos resultados son de difícil aplicación debido a la dispersión de datos y, por tanto, al pequeño número de pacientes. De forma global, la RC estable se alcanzó en el 70% en el grupo de ciclofosfamida y corticoides, 48% en el grupo de corticoides solo, 59% en los pacientes tratados con rituximab (solo o asociado), destacando que la asociación de rituximab y corticoides presenta una tasa de RC estable del 64%. La mediana de días en que se constató la recidiva de la HA (tras la suspensión del tratamiento) fue de 134 para los pacientes con corticoides y 139 para los que recibieron ciclofosfamida y corticoides. Los datos derivados del grupo EACH2 indican que los pacientes tratados con ciclofosfamida y corticoides alcanzan más pronto la remisión completa estable que el resto, a pesar de que la dosis de prednisona fue inferior cuando iba asociada a la ciclofosfamida<sup>(9)</sup>.

No debemos, por otro lado, dejar de considerar los efectos no deseados de la inmunosupresión (Tabla 2). Las infecciones fueron más frecuentes en el grupo de la ciclofosfamida (27%) que en el de corticoides (16%) y rituximab (12%). La neutropenia fue también superior en el grupo de ciclofosfamida y corticoides (14%) y rituximab (18%) respecto al grupo de corticoides (1%). La diabetes mellitus apareció en el 22% de los pacientes con protocolos de rituximab, y la enfermedad psiquiátrica estuvo presente en aproximadamente el 3-4% de forma similar en todos los grupos<sup>(9)</sup>. Del total de 331 pacientes tratados y con el seguimiento completo, la tasa de supervivencia global fue del 69%,

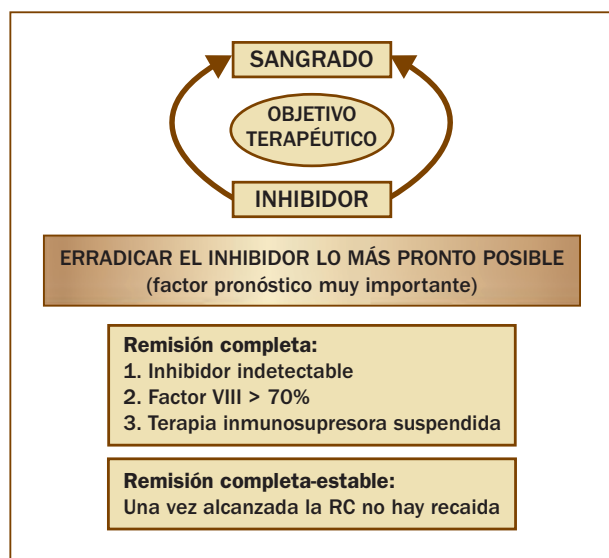


Figura 6. Tratamiento y manejo clínico.

Tabla 2. Efectos adversos

Régimen	n	Infección	Neutropenia	Diabetes	Alteraciones psiquiátricas	Ninguna alteración
CE	142	23 (16)	2 (1)	11 (8)	6 (4)	36 (25)
CE+CFM	83	22 (27)	12 (14)	5 (6)	3 (4)	34 (41)
RTX	51	6 (12)	9 (18)	11 (22)	1 (2)	19 (37)

Adaptada de J Thromb Haemost 2012; 10: 622-31.

siendo similar en cada grupo, y ligeramente superior (71%) en el grupo de rituximab. La sepsis fue la causa mayor de fallecimiento, similar en todas las ramas (4-5 pacientes), destacando que ninguno de ellos tenía neutropenia. La revisión de la literatura indica que el rituximab está siendo cada vez más utilizado, indicando algún estudio un 90% de RC, pero el análisis de estas publicaciones muestra un número pequeño de pacientes<sup>(1,6,9)</sup>. No obstante, parece que, a la luz de los resultados del grupo europeo, la tasa de recidivas sí que es más baja en los protocolos con rituximab, aunque el tiempo para alcanzar la remisión fue significativamente más largo. La RC estable no se influyó por la etiología, pero sí por el nivel de actividad del factor VIII:C y el título de inhibidor<sup>(9)</sup>.

Las pacientes con HA asociada a gestación representan el 8,4% del grupo europeo, siendo algo mayor (14,5%) en otras publicaciones<sup>(2,7,15)</sup>. Su mortalidad fue nula, y la mayoría fueron tratadas con corticoides con una tasa de RC del 74%, y un 86% de RC estable tras completar el seguimiento. El 56% recibieron tratamiento hemostático, y en el diagnóstico fue fundamental considerar el sangrado posparto asociado a un TTPa alargado<sup>(15)</sup>. Como datos singulares, indicar que algunas pacientes alcanzaron RC de forma espontánea y que 8 pacientes (19%) presentaron la enfermedad anteparto con dos neonatos que tuvieron clínica hemorrágica<sup>(15)</sup>.

En conclusión, la HA es una patología rara, pero grave, con una alta tasa de mortalidad, y en la que la intervención de hematólogo es fundamental para el diagnóstico precoz e instauración rápida del tratamiento, que debe ser doble y simultáneo: hemostático e inmunosupresor. Por el tipo de paciente, mayor y con comorbilidades, también se deben vigilar los efectos secundarios del tratamiento, que pueden hacer fracasar los buenos resultados que se alcanzan con la doble terapia.

## Bibliografía

- Collins PW. Management of acquired haemophilia A. *J Thromb Haemost* 2011; 9 (Suppl 1): 226-35.
- Delgado J, Jiménez-Yuste V, Hernández-Navarro F, Villar A. Acquired haemophilia: review and meta-analysis focused on therapy and prognostic factors. *Br J Haematol* 2003; 121: 21-35.
- Gawryl MS, Hoyer LW. Inactivation of factor VIII coagulant activity by two different types of human antibodies. *Blood* 1982; 60: 1103-9.
- Collins PW, Hirsch S, Baglin TP, Dolan G, Hanley J, Makris M, et al. Acquired haemophilia A in United Kingdom: a 2 year national surveillance study by the United Kingdom Haemophilia Centre Doctor's Organisation. *Blood* 2007; 109: 1870-7.
- Green D, Lechner K. A survey of 215 non-haemophilic patients with inhibitor to factor VIII. *Thromb Haemost* 1981; 45: 200-3.
- Collins PW, Baudo F, Huth-Kühne A, Ingerslev J, Kessler CM, Mingot Castellano ME, et al. Consensus recommendations for the diagnosis and treatment of acquired haemophilia A. *BMC Res Notes* 2010; 3: 161-6.
- Knoebl P, Marco P, Baudo F, Collins PW, Huth-Kühne A, Nemes L, et al. Demographic and clinical data in acquired haemophilia A: results from the European Acquired Haemophilia Registry (EACH2). *J Thromb Haemost* 2012; 10: 622-31.
- Baudo F, Collins PW, Huth-Kühne A, Levesque H, Marco P, Nemes L, et al. Management of bleeding in acquired haemophilia A: results from the European Acquired Haemophilia (EACH2) Registry. *Blood* 2012; 120: 39-46.
- Collins PW, Baudo F, Knoebl P, Levesque H, Nemes L, Pellegrini F, et al. Immunosuppression for acquired haemophilia A: results from the European Acquired Haemophilia Registry. *Blood* 2012; 120: 4755.
- Kasper CK, Aledort L, Aronson D, Counts R, Edson JR, van Eys J, et al. Proceedings: a more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb Diath Haemorrh* 1975; 34: 612-7.
- Duncan EM, Rodgers SE, McRae SJ. Diagnostic testing for mild hemophilia a in patients with discrepant one-stage, two-stage and chromogenic factor VIII:C assays. *Semin Thromb Hemost* 2013; 139: 272-82.
- Parsons LS. Reducing bias in a propensity score matched-pair simple using greedy matching technique. *Proceedings of the Twenty-Sixth Annual SAS Users Group International Conference*. Cary NC: SAS Institute 2004.
- Aledort LM. Factor VIII inhibitor bypassing activity (FEIBA): addressing safety issues. *Haemophilia* 2008; 14: 39-43.
- Abshire T, Kenet G. Safety update on the use of recombinant factor VIIa and the treatment of congenital and acquired deficiency of factor VIII or IX with inhibitors. *Haemophilia* 2008; 14: 898-902.
- Tengborn L, Baudo F, Huth-Kühne A, Knoebl P, Levesque H, Marco P, et al. Pregnancy-associated acquired haemophilia A: results from the European Acquired Haemophilia (EACH2) registry. *BJOG* 2012; 119 (12): 1529-37.

## El nicho hematopoyético como diana terapéutica

SIMÓN MÉNDEZ-FERRER

*Grupo de Fisiopatología del nicho de células madre.*

*Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III. Madrid.*

*Department of Medicine. Icahn School of Medicine at Mount Sinai. Nueva York (EE UU)*

Las células madre hematopoyéticas (HSC) poseen la capacidad de reconstituir a largo plazo el sistema hematopoyético del individuo trasplantado. Esta propiedad ha suscitado un enorme interés por expandir las HSC en cultivo para su posterior trasplante. Existen distintas fuentes de progenitores hematopoyéticos utilizadas para el trasplante alogénico de médula ósea. Las principales son la médula ósea, la sangre periférica de donantes cuyos progenitores hematopoyéticos han sido movilizados hacia el torrente circulatorio y la sangre del cordón umbilical. El uso del cordón umbilical ha aumentado en los últimos años debido a las ventajas que presenta con respecto a las otras fuentes mencionadas, principalmente la mayor disponibilidad de cordones criopreservados, su mayor tolerancia inmunológica, el menor riesgo de transmisión de enfermedades y su carácter no invasivo. Sin embargo, el bajo número de HSC en la sangre obtenida de cada cordón umbilical ha restringido su uso principalmente a niños y adultos de bajo peso. De hecho, la supervivencia de los pacientes trasplantados con cordón umbilical es directamente proporcional a la dosis de HSC recibida<sup>(1)</sup>. Por tanto, la mayor demanda de cordón umbilical, unida a su bajo contenido en HSC, ha estimulado la investigación de los mecanismos que permiten a la HSC dividirse sin perder su capacidad de diferenciación en múltiple linajes celulares, lo que se ha denominado “autorrenovación”. Fruto de estas investigaciones, numerosos grupos han desarrollado en los últimos años métodos que podrían ayudar a expandir en cultivo las HSC, y particularmente las derivadas del cordón umbilical.

Del hígado fetal se identificaron proteínas de la familia de las angiopoyetinas y factores de crecimiento de tipo insulina capaces de estimular la expansión de HSC del cordón umbilical<sup>(2)</sup>. Otras moléculas capaces de estimular la proliferación de HSC son los antagonistas del receptor de hidrocarburos aromáticos, identificados mediante un *screening* por su capacidad de mantener un inmunofenotipo más primitivo en las células CD34<sup>+</sup> de cordón umbilical en cultivo<sup>(3)</sup>. La estimulación de la señalización por el receptor Notch mediante la aplicación de su ligando Delta1 también ha demostrado utilidad para expandir células CD34<sup>+</sup> de cordón umbilical y acelerar

la reconstitución hematopoyética, aunque su injerto a largo plazo en pacientes podría estar comprometido<sup>(4)</sup>. En los ensayos clínicos dedicados a testar la expansión de HSC de cordón umbilical, en la mayoría de los casos se trasplanta una unidad de cordón umbilical no expandida junto con la unidad que ha sido cultivada, con el fin de garantizar la recuperación de los pacientes. En el ensayo clínico publicado basado en la estimulación de la vía Notch, la reconstitución a largo plazo detectada procedía solo del cordón que no había sido manipulado, y no del cordón umbilical tratado con Delta1<sup>(4)</sup>. La dimetil-prostaglandina E2 también estimula la proliferación, supervivencia y el injerto de las HSC<sup>(5)</sup>, y las ciclooxigenasas que la producen son de hecho necesarias para la formación de HSC<sup>(6)</sup>. Estos resultados han sido confirmados en primates y han promovido un ensayo clínico actualmente en desarrollo<sup>(7)</sup>. Otras estrategias para aumentar el número neto de HSC en cultivo tratan de incrementar la viabilidad de las células. En este sentido, el uso de inhibidores de proteasas proapoptóticas podría aumentar la vitalidad y funcionalidad de las HSC cultivadas<sup>(8)</sup>.

Por otro lado, el éxito del trasplante no sólo depende del número de HSC trasplantadas, sino también de su capacidad de injerto, la cual es menor para las HSC del cordón umbilical que para las obtenidas del adulto<sup>(1)</sup>. Otros estudios se han centrado, por tanto, en estimular el injerto. Así, se ha comprobado que el tratamiento con dimetil-prostaglandina E2 aumenta significativamente la eficiencia del injerto<sup>(5-7)</sup>. También la inhibición de la dipeptidilpeptidasa IV/CD26, que corta el fragmento N-terminal e inactiva quimiocinas tales como CXCL12, es capaz de aumentar la quimiotaxis y el injerto<sup>(9,10)</sup>. Por otra parte, la fucosilación *ex vivo* de las HSC, previamente a su trasplante, puede mejorar la interacción de estas células con los microvasos de la médula ósea<sup>(11)</sup> y su posterior injerto<sup>(12)</sup>, lo que ha generado también un ensayo clínico en desarrollo en M.D. Anderson Cancer Center (University of Texas, EE UU).

La capacidad de autorrenovación de la HSC está determinada, al menos parcialmente, por factores extrínsecos que configuran el denominado “nicho hematopoyético”. Otra de las estrategias empleadas para tratar de expandir las HSC consiste en su

co-cultivo con células que permitan recapitular, al menos parcialmente, su nicho hematopoyético natural. Sin embargo, aún se desconoce con exactitud cuáles son las células que conforman el nicho hematopoyético en la médula ósea adulta, así como los mecanismos específicos mediante los cuales permiten mantener a las HSC<sup>(13)</sup>.

Las células madre/progenitoras mesenquimales (MSC) se han propuesto como uno de los elementos principales del nicho hematopoyético<sup>(14-16)</sup>. Otras células estromales que se han propuesto como elementos del nicho hematopoyético son las identificadas mediante la expresión de CXCL12 (células CAR, por “CXCL12-abundant reticular cells”)<sup>(15,17)</sup>, los progenitores mesenquimales que expresan Mx-1<sup>(18)</sup>, los osteoblastos y preosteoblastos que expresan la cadherina-N<sup>(19-21)</sup>, los preosteoblastos que expresan el factor de transcripción osterix<sup>(22)</sup>, los adipocitos<sup>(23)</sup>, las células endoteliales<sup>(24-27)</sup>, las células mesenquimales identificadas por la expresión del receptor de la leptina<sup>(27)</sup>, las neuronas simpáticas<sup>(28)</sup>, las células de Schwann no mielinizantes<sup>(29)</sup> y los progenitores mesenquimales derivados de células Prx1<sup>(30)</sup>. Sin embargo, es probable que algunas de estas poblaciones celulares se solapen parcialmente (Figura 1). Asimismo, es probable que algunas de las discrepancias entre tipos celulares que podrían estar relacionados se deban a variaciones en la eficiencia de recombinación, a los ratones reporteros utilizados, a la caracterización parcial de las

subpoblaciones y a posibles inconsistencias entre las poblaciones que recombinan y las seleccionadas mediante FACS o reporter para su caracterización.

Las MSC se han aislado tradicionalmente de manera retrospectiva basándose en su gran adherencia al plástico y su capacidad para generar colonias fibroblásticas (CFU-F) en medio mínimo suplementado con suero<sup>(31)</sup>. La facilidad para aislar y cultivar MSC en estas condiciones, unida a sus propiedades inmunorreguladoras, han estimulado su uso preclínico y clínico. Las MSC cultivadas en estas condiciones adherentes son capaces de promover la expansión de progenitores hematopoyéticos<sup>(32-42)</sup>, pero podrían ser insuficientes para preservar HSC funcionales, con capacidad de injerto a largo plazo<sup>(1,43)</sup>. De hecho, los datos ahora disponibles así lo sugieren. En el trasplante doble de cordón (uno cultivado y otro sin manipular), la unidad de cordón que ha sido co-cultivada con MSC contribuye inicialmente a reconstituir la hematopoyesis del paciente, pero tan sólo injerta a largo plazo la unidad de cordón que no ha sido cultivada<sup>(44)</sup>. Estos datos sugieren que las MSC cultivadas en condiciones estándar podrían ser insuficientes para mantener a las HSC. Por tanto, condiciones de cultivo que preservaran mejor las propiedades originales de las MSC podrían aumentar significativamente su capacidad de soporte de las HSC. También es posible que la menor cantidad de células T en la unidad de cordón que ha sido cultivada, en comparación con la

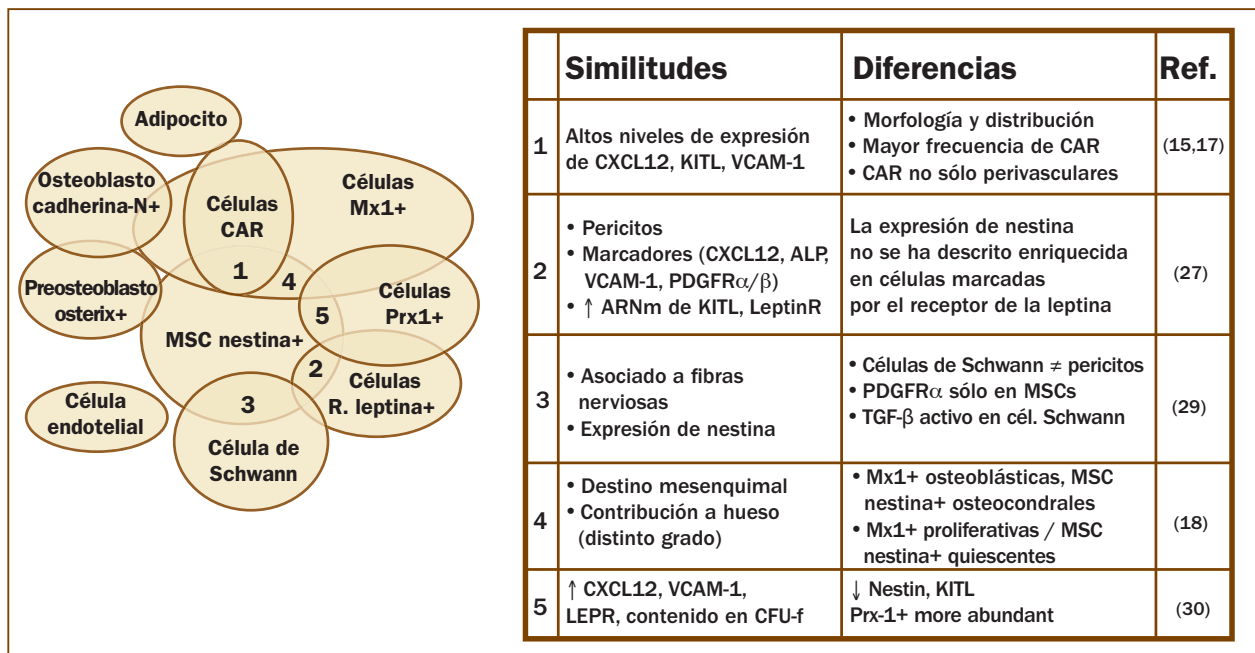


Figura 1. Posible solapamiento de las MSC nestina+ con otras células estromales de la médula ósea.

Diagrama que muestra el posible solapamiento de las MSCs nestina+, las células CAR, las células mesenquimales que expresan el receptor de la leptina, los progenitores mesenquimales Mx-Cre+, los preosteoblastos osterix+ y cadherina-N+, los osteoblastos Col2.3+, los adipocitos y las células de Schwann. Se indican las similitudes y diferencias.

Adaptada de Arranz L, Méndez-Ferrer S. *Inflamm & Regen* 2013; 33 (1): 38-47.

unidad de cordón que no ha sido cultivada, contribuya a comprometer el injerto de la primera<sup>(45)</sup>.

Existen discrepancias en cuanto al requerimiento de contacto celular directo entre las MSC y las HSC para el mantenimiento de éstas últimas. Mientras algunos estudios sugieren la necesidad de interacción directa<sup>(34,38,39,46,47)</sup>, otros estudios indican que las MSC pueden promover la expansión y el mantenimiento de las HSC en cultivo, fundamentalmente mediante la producción de factores secretados al medio<sup>(32,33,35,36)</sup>.

Dada la capacidad de las MSC de regular la atracción y el tráfico de HSC<sup>(16)</sup>, otra de las posibles formas de estimular el injerto de las HSC consiste en su co-trasplante con MSC<sup>(48)</sup>. En el modelo murino, las MSC de la médula ósea regulan de manera crítica la salida fisiológica<sup>(28)</sup> y la movilización forzada de HSC hacia el torrente circulatorio, así como su *homing* e injerto<sup>(16,49)</sup>. La atracción que ejercen las MSC sobre las HSC está regulada por otras señales del microambiente, como la inervación simpática<sup>(16,28)</sup> y factores solubles aún por determinar producidos por los macrófagos<sup>(50)</sup>. Al mismo

tiempo, las MSC contribuyen a la migración de monocitos proinflamatorios desde la médula ósea hacia el torrente circulatorio<sup>(51)</sup>. La disección de estas interacciones (Figura 2) podría servir para mejorar el injerto.

Recientemente hemos desarrollado un nuevo método que permite aislar y propagar MSC en condiciones que preservan mejor sus propiedades de células madre. Partiendo de las investigaciones previas del grupo realizadas en roedores<sup>(16)</sup>, se consiguió aislar MSC equivalentes a las caracterizadas en ratón, a partir de muestras adultas y fetales de médula ósea humana. Para ello, se utilizó un medio de cultivo selectivo en el que las MSC se propagaron como esferas no adherentes, a diferencia de los cultivos tradicionales adherentes en placas de cultivo. En estas condiciones se preservaban mejor tanto las propiedades de las células madre de las MSC como su capacidad de promover la expansión de las células troncales de la sangre del cordón umbilical humano. Esta habilidad se ejercía mediante factores secretados por las MSC, lo que facilitaría la traducción de los resultados hacia un ensayo clínico<sup>(39)</sup>.

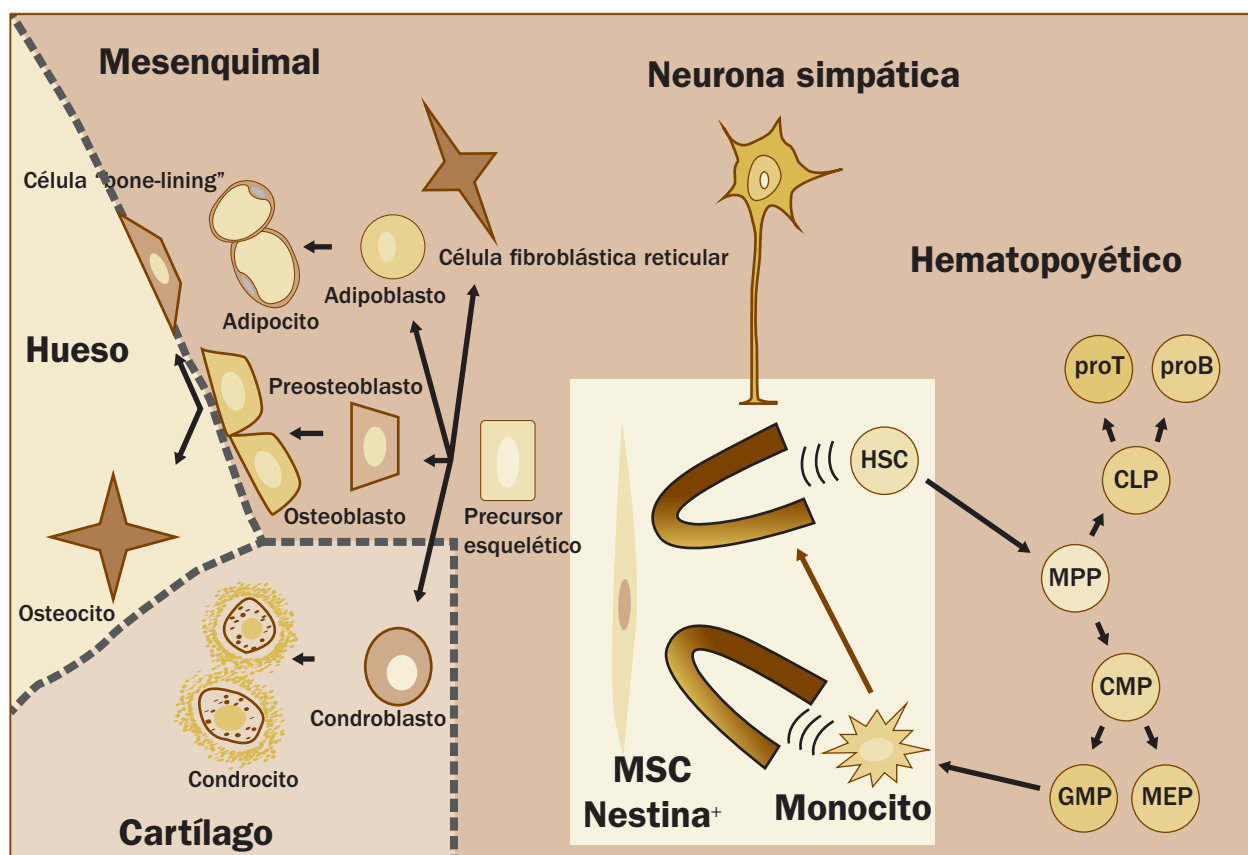


Figura 2. Regulación cruzada entre MSC, HSC, monocitos y actividad simpática eferente en la médula ósea.

Las MSC caracterizadas por la expresión de nestina, capaces de generar todos los linajes mesenquimales de la médula ósea, regulan la localización y migración de las HSC y también la migración de los monocitos proinflamatorios hacia el torrente circulatorio. La producción de la quimiocina CXCL12 por las MSC y la atracción que éstas ejercen sobre las HSC se inhiben por actividad simpática eferente y se inducen por factores solubles producidos por los macrófagos. CLP: progenitor linfocítico común; CMP: progenitor mielocítico común; GMP: progenitor de granulocitos-macrófagos; MEP: progenitor de megacariocito-eritroide; MPP: progenitor multipotente.

Adaptada de Arranz L, Méndez-Ferrer S. *Inflamm & Regen* 2013; 33 (1): 38-47.



En resumen, estudios futuros permitirán caracterizar los diferentes linajes mesenquimales de la médula ósea y sus respectivas funciones. Las MSC propiamente dichas (como células con capacidad de autorrenovación) constituyen un elemento esencial del nicho hematopoyético<sup>(14-16)</sup>. Estas células multipotentes y con proliferación lenta podrían ser muy distintas de sus derivados *in vitro*, también llamados “MSC”, cultivados clásicamente como células adherentes al plástico y con elevada tasa de proliferación. En el futuro será determinante caracterizar los diferentes precursores mesenquimales y sus derivados de la médula ósea, así como los requerimientos básicos que garanticen su funcionalidad, lo que permitirá preservar sus propiedades *in vitro* y optimizar sus posibles aplicaciones.

## Agradecimientos

*Dres. Lorena Arranz, Joan Isern y Álvaro Urbano-Ispizúa, por sus comentarios y ayuda con los gráficos. Financiación obtenida de Howard Hughes Medical Institute, Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, Comunidad de Madrid y Marie Curie Integration Program.*

## Bibliografía

1. Broxmeyer HE. Insights into the biology of cord blood stem/progenitor cells. *Cell Prolif* 2011; 44 (Suppl 1): 55-9.
2. Zhang CC, Kaba M, Iizuka S, Huynh H, Lodish HF. Angiopoietin-like 5 and IGFBP2 stimulate ex vivo expansion of human cord blood hematopoietic stem cells as assayed by NOD/SCID transplantation. *Blood* 2008; 111 (7): 3415-23.
3. Boitano AE, Wang J, Romeo R, Bouchez LC, Parker AE, Sutton SE, et al. Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. *Science*. 2010; 329 (5997): 1345-8.
4. Delaney C, Heimfeld S, Brashem-Stein C, Voorhies H, Manger RL, Bernstein ID. Notch-mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution. *Nat Med* 2010; 16 (2): 232-6.
5. Hoggatt J, Singh P, Sampath J, Pelus LM. Prostaglandin E2 enhances hematopoietic stem cell homing, survival, and proliferation. *Blood* 2009; 113 (22): 5444-55.
6. North TE, Goessling W, Walkley CR, Lengerke C, Kopani KR, Lord AM, et al. Prostaglandin E2 regulates vertebrate haematopoietic stem cell homeostasis. *Nature* 2007; 447 (7147): 1007-11.
7. Goessling W, Allen RS, Guan X, Jin P, Uchida N, Dovey M, et al. Prostaglandin E2 enhances human cord blood stem cell xenotransplants and shows long-term safety in preclinical nonhuman primate transplant models. *Cell Stem Cell* 2011; 8 (4): 445-58.
8. Sangeetha VM, Kale VP, Limaye LS. Expansion of cord blood CD34 cells in presence of zVADfmk and zLLYfmk improved their in vitro functionality and in vivo engraftment in NOD/SCID mouse. *PloS one* 2010; 5 (8): e12221.
9. Campbell TB, Hangoc G, Liu Y, Pollok K, Broxmeyer HE. Inhibition of CD26 in human cord blood CD34+ cells enhances their engraftment of nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice. *Stem Cells Dev* 2007; 16 (3): 347-54.
10. Christopherson KW, 2nd, Paganessi LA, Napier S, Porecha NK. CD26 inhibition on CD34+ or lineage- human umbilical cord blood donor hematopoietic stem cells/hematopoietic progenitor cells improves long-term engraftment into NOD/SCID/Beta2null immunodeficient mice. *Stem Cells Dev* 2007; 16 (3): 355-60.
11. Hidalgo A, Frenette PS. Enforced fucosylation of neonatal CD34+ cells generates selectin ligands that enhance the initial interactions with microvessels but not homing to bone marrow. *Blood* 2005; 105 (2): 567-75.
12. Robinson SN, Simmons PJ, Thomas MW, Brouard N, Javni JA, Trilok S, et al. Ex vivo fucosylation improves human cord blood engraftment in NOD-SCID IL-2Rgamma(null) mice. *Exp Hematol* 2012. Epub 2012/02/07.
13. Mercier FE, Ragu C, Scadden DT. The bone marrow at the crossroads of blood and immunity. *Nat Rev Immunol* 2012; 12 (1): 49-60.
14. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* 2007; 131 (2): 324-36.
15. Omatsu Y, Sugiyama T, Kohara H, Kondoh G, Fujii N, Kohno K, et al. The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity* 2010; 33 (3): 387-99.
16. Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, MacArthur BD, Lira SA, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 2010; 466 (7308): 829-34.
17. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* 2006; 25 (6): 977-88.
18. Park D, Spencer JA, Koh BI, Kobayashi T, Fujisaki J, Clemens TL, et al. Endogenous bone marrow MSCs are dynamic, fate-restricted participants in bone maintenance and regeneration. *Cell Stem Cell* 2012; 10 (3): 259-72.
19. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 2003; 425 (6960): 836-41.
20. Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 2004; 118 (2): 149-61.
21. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 2003; 425 (6960): 841-6.
22. Raaijmakers MH, Mukherjee S, Guo S, Zhang S, Kobayashi T, Schoonmaker JA, et al. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature* 2010; 464 (7290): 852-7.
23. Naveiras O, Nardi V, Wenzel PL, Hauschka PV, Fahey F, Daley GQ. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature* 2009; 460 (7252): 259-63.
24. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 2005; 121 (7): 1109-21.
25. Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 2002; 109 (5): 625-37.
26. Butler JM, Nolan DJ, Vertes EL, Varnum-Finney B, Kobayashi H, Hooper AT, et al. Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; 6 (3): 251-64.
27. Ding L, Saunders TL, Nikolopov G, Morrison SJ. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* 2012; 481 (7382): 457-62.

28. Méndez-Ferrer S, Lucas D, Battista M, Frenette PS. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature* 2008; 452 (7186): 442-7.
29. Yamazaki S, Ema H, Karlsson G, Yamaguchi T, Miyoshi H, Shioda S, et al. Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *Cell* 2011; 147 (5): 1146-58.
30. Greenbaum A, Hsu YM, Day RB, Schuettpelz LG, Christopher MJ, Borgerding JN, et al. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature* 2013; 495 (7440): 227-30.
31. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970; 3 (4): 393-403.
32. Verfaillie CM. Direct contact between human primitive hematopoietic progenitors and bone marrow stroma is not required for long-term in vitro hematopoiesis. *Blood* 1992; 79 (11): 2821-6.
33. Breems DA, Blokland EA, Ploemacher RE. Stroma-conditioned media improve expansion of human primitive hematopoietic stem cells and progenitor cells. *Leukemia* 1997; 11 (1): 142-50.
34. Breems DA, Blokland EA, Siebel KE, Mayen AE, Engels LJ, Ploemacher RE. Stroma-contact prevents loss of hematopoietic stem cell quality during ex vivo expansion of CD34+ mobilized peripheral blood stem cells. *Blood* 1998; 91 (1): 111-7.
35. Lewis ID, Almeida-Porada G, Du J, Lemischka IR, Moore KA, Zanjani ED, et al. Umbilical cord blood cells capable of engrafting in primary, secondary, and tertiary xenogeneic hosts are preserved after ex vivo culture in a noncontact system. *Blood* 2001; 97 (11): 3441-9.
36. Lewis ID, Verfaillie CM. Multi-lineage expansion potential of primitive hematopoietic progenitors: superiority of umbilical cord blood compared to mobilized peripheral blood. *Exp Hematol* 2000; 28 (9): 1087-95.
37. McNiece IK, Almeida-Porada G, Shpall EJ, Zanjani E. Ex vivo expanded cord blood cells provide rapid engraftment in fetal sheep but lack long-term engraftment potential. *Exp Hematol* 2002; 30 (6): 612-6.
38. Harvey K, Dzierzak E. Cell-cell contact and anatomical compatibility in stromal cell-mediated HSC support during development. *Stem Cells* 2004; 22 (3): 253-8.
39. Zhang Y, Chai C, Jiang XS, Teoh SH, Leong KW. Co-culture of umbilical cord blood CD34+ cells with human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 2006; 12 (8): 2161-70.
40. Fei XM, Wu YJ, Chang Z, Miao KR, Tang YH, Zhou XY, et al. Co-culture of cord blood CD34(+) cells with human BM mesenchymal stromal cells enhances short-term engraftment of cord blood cells in NOD/SCID mice. *Cytotherapy* 2007; 9 (4): 338-47.
41. Magin AS, Korfer NR, Partenheimer H, Lange C, Zander A, Noll T. Primary cells as feeder cells for coculture expansion of human hematopoietic stem cells from umbilical cord blood – a comparative study. *Stem Cells Dev* 2009; 18 (1): 173-86.
42. Sharma MB, Limaye LS, Kale VP. Mimicking the functional hematopoietic stem cell niche in vitro: recapitulation of marrow physiology by hydrogel-based three-dimensional cultures of mesenchymal stromal cells. *Haematologica* 2011. Epub 2011/11/08.
43. Chou S, Chu P, Hwang W, Lodish H. Expansion of human cord blood hematopoietic stem cells for transplantation. *Cell Stem Cell* 2010; 7 (4): 427-8.
44. Shpall EJ, Bollard CM, Brunstein C. Novel cord blood transplant therapies. *Biology of blood and marrow transplantation: journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2011; 17 (1 Suppl): S39-45.
45. Urbano-Ispizua A, Rozman C, Pimentel P, Solano C, de la Rubia J, Brunet S, et al. The number of donor CD3(+) cells is the most important factor for graft failure after allogeneic transplantation of CD34(+) selected cells from peripheral blood from HLA-identical siblings. *Blood* 2001; 97 (2): 383-7.
46. Thiemann FT, Moore KA, Smogorzewska EM, Lemischka IR, Crooks GM. The murine stromal cell line AFT024 acts specifically on human CD34+CD38- progenitors to maintain primitive function and immunophenotype in vitro. *Exp Hematol* 1998; 26 (7): 612-9.
47. Kawada H, Ando K, Tsuji T, Shimakura Y, Nakamura Y, Chargui J, et al. Rapid ex vivo expansion of human umbilical cord hematopoietic progenitors using a novel culture system. *Exp Hematol* 1999; 27 (5): 904-15.
48. Carrancio S, Blanco B, Romo C, Muntion S, López-Holgado N, Blanco JF, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells for improving hematopoietic function: an in vitro and in vivo model. Part 2: Effect on bone marrow microenvironment. *PloS one* 2011; 6 (10): e26241.
49. Sánchez-Aguilera A, Lee YJ, Lo Celso C, Ferraro F, Brumme K, Mondal S, et al. Guanine nucleotide exchange factor Vav1 regulates perivascular homing and bone marrow retention of hematopoietic stem and progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108 (23): 9607-12.
50. Chow A, Lucas D, Hidalgo A, Méndez-Ferrer S, Hashimoto D, Scheiermann C, et al. Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *J Exp Med* 2011. Epub 2011/02/02.
51. Shi C, Jia T, Méndez-Ferrer S, Hohl TM, Serbina NV, Lipuma L, et al. Bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells induce monocyte emigration in response to circulating toll-like receptor ligands. *Immunity* 2011; 34 (4): 590-601.



