

# **PROGRAMA EDUCACIONAL**

**Coordinadores: J. Besalduch  
A. Estelles**

# INTRODUCCIÓN

J. BESALDUCH Y A. ESTELLÉS

*Faltan centros??*

El objetivo de los Programas Educativos de nuestros Congresos es la puesta al día de fundamentos básicos, fisiopatológicos, tecnológicos, diagnósticos y terapéuticos en el ámbito de la Hematología y de la Trombosis y Hemostasia. Estos programas permiten actualizarnos en muchas temas, en especial en aquellos en que no estamos trabajando de una forma directa, ya que se imparten de una manera didáctica y son una herramienta muy útil en nuestro quehacer diario. Asimismo, permiten repasar campos que han tenido un avance diagnóstico o terapéutico importante, a la vez que recordar patologías que por su rareza han quedado algo olvidadas. La estructura del programa de este año no difiere de la de los años anteriores con tres temas dedicados al área de la Trombosis y la Hemostasia y los siete restantes repartidos entre diferentes patologías hematológicas.

En relación a los temas de Trombosis y Hemostasia, el Dr. Velasco nos describe el síndrome antifosfolípido, indicando que, actualmente, no sólo conocemos su naturaleza autoinmune y la asociación a un 20-30% de todas las trombosis, sino que se ha convertido en un síndrome con manifestaciones clínicas que afectan a casi todos los órganos y tejidos. Se trata de una entidad clínica bien definida que responde a la asociación de unos criterios clínicos (trombosis y/o pérdidas fetales) y de laboratorio (anticuerpos anticardiolipina y/o anticoagulante tipo lupus). Los mecanismos patogénicos aún no se conocen, pero se ha indicado el papel que desempeñan algunas proteínas que se unen a las superficies celulares ( $\beta_2$ -glucoproteína o la protrombina), la acción de los anticuerpos anticardiolipina sobre los mecanismos anticoagulantes fosfolípido-dependientes o la activación celular mediada por los antifosfolípidos. Aunque se requieren más ensayos clínicos, la anticoagulación es la opción terapéutica más aceptada, no sólo para los problemas trombóticos, sino también para las complicaciones asociadas a la gestación.

A continuación, el Dr. Batlle nos expone el tratamiento de la enfermedad de von Willebrand (EvW). Se trata de un trastorno hemorrágico hereditario causado por una deficiencia cuantitativa o cualitativa del factor von Willebrand (FvW). Se dispone

principalmente de dos tipos de agentes terapéuticos para el tratamiento de los episodios hemorrágicos espontáneos y para su prevención: la desmopresina (DDAVP) y la terapéutica sustitutiva con productos derivados del plasma. El tratamiento con DDAVP es la terapia de elección en la mayor parte de pacientes con EvW de tipo 1. Los pacientes con enfermedad de tipo 3 y en la mayoría de los pacientes con tipo 2, la terapia de DDAVP como único recurso es insuficiente o está contraindicada, siendo necesario asociarla a tratamiento sustitutivo empleando concentrados ricos en FvW. Aunque el tratamiento de la EvW es relativamente simple, el diagnóstico es a menudo complicado, y es aconsejable caracterizar adecuadamente a los pacientes para prescribir un tratamiento individualizado en base al tipo y subtipo de EvW.

El Dr. España realiza una exhaustiva revisión del sistema de la proteína C, el cual desempeña un papel esencial en la regulación del proceso de la coagulación sanguínea. La activación de la proteína C por el complejo trombina-trombomodulina, amplificada por el receptor endotelial de la proteína C (EPCR), conduce a la inactivación de los cofactores de la coagulación activados Va y VIIIa. Sin embargo, el sistema de la proteína C también participa en otras funciones biológicas importantes. Así, algunos componentes del sistema ejercen interacciones celulares específicas que proporcionan actividades antiinflamatorias y antiapoptóticas, profibrinolíticas y neuroprotectoras. La implicación del sistema de la proteína C en diversas patologías sugiere que algunos de los componentes del mismo, especialmente la proteína C activada y la trombomodulina, pueden ser fármacos con gran futuro en el tratamiento de diferentes enfermedades asociadas con la inflamación y la apoptosis.

Los recientes avances que se han producido en campo del metabolismo del hierro son analizados por el Dr. Cazzola. Cada vez se van conociendo más genes implicados en trastornos del metabolismo del hierro lo que nos permite entender la regulación molecular del mismo, tanto en situaciones fisiológicas como patológicas, y nos da ocasión de investigar nuevas estrategias terapéuticas para estos enfermos. En esta revisión, se hace un repaso de los diferentes

tipos de hemocromatosis hereditarias y su relación con la mutación de los diferentes genes relacionados, incluyendo los nuevos descubrimientos como el gen *HJV* de la hemocromatosis hereditaria juvenil que codifica la hemojuvelina y de las anemias inflamatorias en relación al péptido hepcidina.

Desde la instauración de la gammaglobulina anti-D como tratamiento preventivo de la isoimmunización Rh del recién nacido, muchos de los problemas derivados de esta patología se han solucionado. Sin embargo, hoy en día quedan aun elementos que necesitan ser clarificados: desde cuándo y con qué dosis debe efectuarse la profilaxis, hasta las diferentes técnicas de cuantificación de la isoimmunización. También es importante conocer los diferentes medios para evaluar el daño fetal en aquellas madres ya isoimmunizadas y el tratamiento de la EHRN ya instaurada. Esta tarea ha sido encomendada a la Dra. Rodríguez de la Rúa.

La infección sigue siendo una de las principales causas de morbimortalidad de los enfermos hematológicos inmunodeprimidos. Dentro de este campo, las infecciones virales representan una parte importante del problema. El papel de los diferentes virus en la patogenia de estas infecciones es un aspecto que debe ser dilucidado. Asimismo, los diferentes protocolos terapéuticos y las nuevas modalidades de trasplante hematopoyético han hecho cambiar algo el patrón de las infecciones virales en este campo. El Dr. Garau nos expone su punto de vista como infectólogo al analizar este campo.

La enfermedad de Waldenström es una patología poco frecuente, que hasta hace poco estaba mal definida como entidad clinicopatológica. Los criterios diagnósticos no eran siempre iguales para todos los médicos que trataban esta patología. Desde el 2.º Workshop Internacional de Atenas se ha definido la enfermedad, se han elaborado unos factores pronósticos y criterios para iniciar tratamiento y se han uniformado también los criterios de respuesta al tratamiento. El Dr. García-Sanz et al analizan la biología de esta enfermedad con una puesta al día de los nuevos métodos diagnósticos, pronósticos y terapéuticos.

La definición de remisión completa es un concepto muy importante de cara a elaborar una estrategia curativa en la mayoría de las enfermedades hematológicas malignas. La capacidad de mesurar los restos de células malignas tras una terapia erradicativa es esencial a la hora de plantear un tratamiento complementario en algunas patologías. El Dr. Tomás et al exponen las diferentes técnicas de detección de la enfermedad mínima residual, así como el significado clínico del hallazgo en diferentes patologías. Se discute en esta lección, que los marcadores

de las enfermedades hematológicas malignas utilizados para detectar enfermedad mínima residual, son completamente diferentes en cada patología. Sin embargo, se apunta a la existencia de marcadores "panleucémicos" como la expresión del gen *WT1*, que podrían ser de gran utilidad en estos estudios.

La aparición de fármacos anticancerosos con una diana molecular específica ha abierto un camino diferente para el manejo del cáncer. En particular, la aparición del STI ha revolucionado el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (LMC). Saber cómo debe tratarse un enfermo con esta patología en 2004, en relación a la edad, existencia de donante compatible, fase de la enfermedad, entre otras variables, es el tema que desarrolla el Dr. García-Manero desde la perspectiva de un centro que aúna un gran número de enfermos con esta patología. En esta lección, se discuten los criterios por los que se ofrece el tratamiento inicial con STI a todos los pacientes diagnosticados de LMC en su centro y también la definición de fallo en el tratamiento con este fármaco, para poder cambiar la estrategia terapéutica en aquellos enfermos en que se produzca.

El Dr. Rosti, repasa el controvertido tema de las altas dosis de quimioterapia en el cáncer de mama, en una época en que las terapias específicas de diana han comenzado en dar resultados en diversos tipos de cáncer. Analiza todos los estudios aleatorizados, cerrados o en marcha en este tipo de patología, tanto de cáncer metastásico como de alto riesgo con más de 4 o 10 ganglios y concluye que el escepticismo actual en este tipo de terapia quizá cambie cuando los resultados se analicen con una perspectiva de tiempo más larga y los datos hayan madurado. Asimismo señala, que en los primeros ensayos, la fuente de progenitores era la médula ósea en lugar de la sangre periférica, quizá por ello la rama de los trasplantes en los estudios más antiguos se viera penalizada por una mayor mortalidad.

El estudio del quimerismo en el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos, es una necesidad para valorar las posibilidades tanto pronósticas como terapéuticas a la hora de tomar decisiones clínicas. Ciertas modalidades de trasplante alogénico hematopoyético, tanto los de acondicionamiento de intensidad reducida como los de injerto manipulado, hacen imprescindible saber el estado de quimerismo de los pacientes. El Dr. Urbano et al analizan en profundidad las diferentes técnicas de estudio y también las diferentes poblaciones celulares que deben determinarse para lograr una información útil del tema. Asimismo, señalan el significado de los diferentes patrones de quimerismo y su relación con la pérdida del injerto y la recidiva de la enfermedad.

# SÍNDROME ANTIFOSFOLÍPIDO

F. VELASCO, C. LÓPEZ-PEDRERA, P. BUENDÍA, M.<sup>ª</sup>J. CUADRADO Y A. TORRES

Servicio de Hematología y Unidad de Investigación del Hospital Reina Sofía. Córdoba.

## Introducción

El síndrome antifosfolípido (SAF) se describió en el año 1983<sup>1</sup> como una tríada compuesta por trombosis venosas/arteriales, pérdidas fetales y una moderada trombocitopenia, acompañadas por un título elevado de anticuerpos antifosfolípidos (aPL): anticoagulante tipo lupus (LA) y/o anticuerpos anti-cardiolipina (aCL). Originariamente, el SAF se encontró asociado a pacientes diagnosticados de lupus eritematoso sistémico (LES). Sin embargo, más tarde fue reconocido como una entidad clínica independiente: el SAF primario<sup>2</sup>.

En la actualidad no sólo se conoce su naturaleza autoinmune y la asociación a un 20-30 % de todas las trombosis, sino que se ha convertido en un síndrome con manifestaciones clínicas que afectan a casi todos los órganos y tejidos. Ello ha llevado a algunos autores a llamarle SAF sistémico.

A continuación revisaremos los criterios diagnósticos actuales, su mecanismo patogénico autoinmune y las medidas profilácticas y terapéuticas consensuadas en distintas reuniones internacionales.

## Historia del síndrome antifosfolípido

Conocido en un principio como síndrome anticardiolipina, este síndrome fue unos años más tarde reconocido como una entidad clínica bien delimitada y redefinido con su nombre actual: SAF. Históricamente, el primer signo inmunológico del síndrome se describió en pacientes diagnosticados de LES que tenían un test VDRL (pruebas reagínicas de serología luética) positivo pero sin evidencia clínica de sífilis. Además, estos pacientes también presentaban anomalías en los tiempos de coagulación, fundamentalmente un tiempo de tromboplastina parcial activado prolongado, actividad anticoagulante conocida como “fenómeno lupus anticoagulante” y relacionada con los tests fosfolípido-dependientes. Este hallazgo dio origen a numerosas confusiones, ya que dicha actividad anticoagulante sólo se observaba *in vitro* y no iba acompañada de síntomas de diátesis hemorrágicas; muy al contrario, estos pacientes sufrían complicaciones trombóticas y pérdidas fetales<sup>3</sup>.

Todas estas observaciones invitaron a Moore and Mohr a sugerir la posibilidad de que estos tests fueran falsos positivos. Sin embargo, la explicación a estos

hallazgos tuvo que esperar al desarrollo de técnicas de análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) con las que poder cuantificar a los aCL. Con ellas se comprobó que los aCL no sólo causaban el “fenómeno LA”, sino que también eran los responsables de la positividad de las pruebas biológicas para la sífilis.

Más tarde se produjo un descubrimiento que cambió radicalmente el concepto originario del síndrome. Dos grupos independientes<sup>4,5</sup> demostraron que los aCL necesitaban proteínas con afinidad por los fosfolípidos para unirse a la cardiolipina. Desde entonces, la atención del SAF abandonó los fosfolípidos y se centró en el estudio de las proteínas con capacidad para unirse a ellos: la  $\beta_2$ -glucoproteína I ( $\beta_2$ GPI) y la protrombina.

Sin embargo, no todos los anticuerpos tienen la misma especificidad. Así pues, aquellos que surgen en el curso de enfermedades infecciosas (sífilis, enfermedad de Lyme, etc.) no precisan de las proteínas con afinidad por los fosfolípidos, es decir, son  $\beta_2$ GPI-independientes, y, además, no se acompañan de manifestaciones clínicas.

Por otra parte, estudios observacionales han descrito la presencia de aPL en grupos familiares y en ciertos tipos de antígenos de histocompatibilidad. Así pues, aunque el SAF se considera una patología autoinmune, probablemente con una predisposición genética, aún son necesarios más estudios para conocer con precisión la génesis y especificidad de sus anticuerpos.

## Criterios diagnósticos del síndrome antifosfolípido

En el SAF primario se han descrito numerosos tipos de anticuerpos y síntomas, lo que ha hecho necesario delimitar unos criterios diagnósticos. Dichos criterios fueron definidos y consensuados por una reunión de expertos que tuvo lugar en Sapporo en el año 1999<sup>6</sup>. A partir de dicha reunión el diagnóstico definitivo del síndrome hace necesaria la presencia simultánea de al menos un criterio clínico y uno de laboratorio.

### Criterios clínicos:

1. Trombosis vasculares: trombosis arterial, venosa o de los pequeños vasos, localizada en cualquier tejido u órgano.

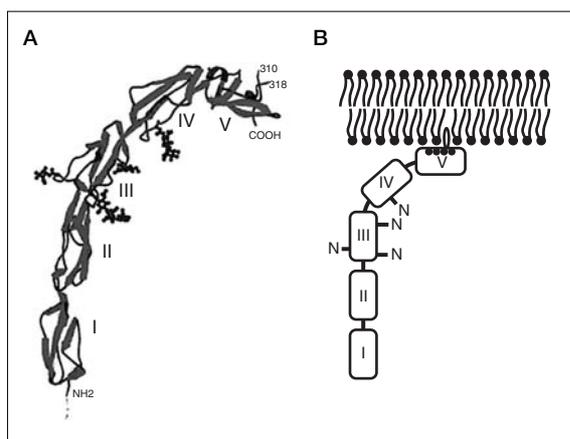


Figura 1. A) Representación de la  $\beta_2$ -glucoproteína I basada en su estructura cristalográfica. La proteína está compuesta por 5 dominios SCR (*short consensus repeat*). B) Unión de la  $\beta_2$ -glucoproteína I a las membranas celulares por su dominio V. Modificada de Bouma B. EMBO J 1999;18:5166-74.

2. Complicaciones del embarazo: feto muerto morfológicamente normal después de la décima semana de gestación; nacimiento prematuro de un neonato normal antes de la semana 34 de gestación y tres o más abortos espontáneos antes de la décima semana de gestación.

#### Criterios de laboratorio:

1. Anticuerpos anticardiolipinas. Título moderado/alto de aCL IgG o IgM en dos determinaciones separadas por un período de 6 semanas.

2. Anticoagulante circulante tipo lupus. Presencia de un LA en dos determinaciones separadas por un período de 6 semanas.

Los anticuerpos IgA, anticuerpos anti- $\beta_2$ GPI y anticuerpos frente a otros fosfolípidos distintos a la cardiolipina (fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina) no se incluyen actualmente entre los criterios diagnósticos de laboratorio. Tampoco están reconocidos los anticuerpos frente a otras proteínas con capacidad de unión a los fosfolípidos, tales como los anticuerpos antiprotrombina, anexina V, proteína C o proteína S<sup>6</sup>.

El umbral para distinguir los títulos bajos, moderados o altos de aCL no ha sido estandarizado y puede depender de la población de estudio. Muchos laboratorios utilizan títulos de 15-20 U de "fosfolípido" como cifras de separación entre valores bajos y moderados. Otros consideran un título de aCL positivo cuando excede 2-2,5 veces el nivel medio del título de aCL. Las técnicas de ELISA para la determinación de los aCL deben utilizar placas recubiertas con cardiolipina en presencia de suero bovino de  $\beta_2$ GPI, pues los aCL de pacientes con SAF son  $\beta_2$ GPI-dependientes, a diferencia de los anticuerpos de pa-

cientes con enfermedades infecciosas que son  $\beta_2$ GPI-independientes.

Para establecer el diagnóstico de un LA, un plasma deberá reunir los criterios recomendados por el subcomité de estandarización de la ISTH. Es importante subrayar que un tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa) normal no excluye la presencia de un LA. Por tanto, se recomienda emplear tests de coagulación sensibles al LA<sup>7</sup>. Asimismo, es necesario emplear conjuntamente test inmunológicos y coagulativos para efectuar un diagnóstico más correcto.

#### Especificidad antigénica de los aCL: $\beta_2$ GPI

Como hemos mencionado en párrafos anteriores, los aPL no están dirigidos frente a fosfolípidos sino contra proteínas con capacidad de unión a las superficies celulares<sup>4,5</sup>. La mayoría de los aCL y los LA están dirigidos frente a la protrombina y la  $\beta_2$ GPI. Esta última es la más común y mejor caracterizada.

La  $\beta_2$ GPI, una proteína plasmática muy glucosilada, está compuesta por 326 aminoácidos con una masa molecular de 50 kDa. La proteína, basada en su estructura cristalográfica, tiene la forma de un anzuelo de pescar constituido por 5 dominios SRC (*short consensus repeat superfamily*). El dominio 5 ha sido caracterizado como el sitio de unión a los fosfolípidos<sup>8</sup> (fig. 1). Así mismo, experimentos *in vitro* han demostrado que los aPL se unen a la  $\beta_2$ GPI por los dominios I y II, y que el resultado de esta unión incrementa la afinidad de la proteína por los fosfolípidos de membrana. Dichas interacciones se producen probablemente como consecuencia de la formación de complejos bivalentes IgG- $\beta_2$ GPI, pues estos complejos (anti- $\beta_2$ GPI- $\beta_2$ GPI) se unen con más afinidad a los fosfolípidos que cuando la  $\beta_2$ GPI está libre<sup>9</sup>.

La función fisiológica de la  $\beta_2$ GPI no se conoce aún en detalle. Algunos autores han sugerido que podría participar en el metabolismo de los lípidos, ya que un 30% de la proteína circula unida a las lipoproteínas. Otros le han atribuido funciones anticoagulantes, pues inhibe al factor Xa y al complejo protrombínico. También se ha relacionado con los procesos biológicos de apoptosis celular. Sin embargo, su deficiencia, descrita hace más de 30 años, no se ha podido asociar a complicaciones trombóticas.

Por otra parte, aunque se había asumido que la unión de la  $\beta_2$ GPI a las superficies celulares se producía directamente a través de la interacción con los fosfolípidos de membrana, estudios recientes han demostrado que esta unión está mediada por la anexina II<sup>10</sup>. Esta nueva observación añade una pieza más a este puzzle del SAF, y obliga a replantearse las interacciones de los aPL con la superficie celular.

Aunque la mayoría de los aPL están dirigidos frente a la  $\beta_2$ GPI y la protrombina, existen anticuerpos que reconocen a otras proteínas también con capacidad de unión a los fosfolípidos, entre los que se

encuentran la proteína C, la proteína S, la anexina V o el factor H del complemento. Sin embargo, aún no hay una evidencia clara de que estos anticuerpos se asocien a complicaciones trombóticas.

Por otra parte, a pesar de estos avances, seguimos sin conocer por qué los fosfolípidos unidos a proteínas pueden hacerse inmunogénicos. En este sentido, Borchman et al<sup>11</sup>, usando técnicas de espectrofotometría con rayos infrarrojos, han demostrado que al combinar  $\beta_2$ GPI con cardiolipinas se producen cambios conformacionales en ambas moléculas, cambios que también podrían ocurrir *in vivo* en las proteínas que se unen a las superficies celulares parcialmente activadas. La exposición de nuevos epitopos por estas proteínas generaría la producción de los aPL.

De cualquier forma, la patogenicidad de los aPL en el SAF ha sido demostrada en modelos experimentales. Así pues, ratones inyectados con aCL o anti- $\beta_2$ GPI desarrollaron síntomas compatibles con un SAF, todo lo cual subraya la estrecha relación que existe entre estos anticuerpos y las manifestaciones clínicas del síndrome<sup>12</sup>.

#### **Mecanismos patogénicos de trombosis**

Las complicaciones trombóticas, junto a las pérdidas fetales, representan la primera manifestación clínica en los pacientes con SAF. Varias hipótesis han sido sugeridas para explicar los mecanismos celulares y moleculares responsables de estas trombosis (tabla 1). No obstante, ninguna de ellas ha sido capaz de proporcionar una respuesta satisfactoria.

Básicamente, dos mecanismos patogénicos han sido propuestos: *a)* los aPL podrían interferir con las propiedades anticoagulantes fosfolípido-dependiente de las superficies celulares, o *b)* los aPL, al unirse a las superficies celulares, originan una serie de señales intracelulares que conducirían finalmente a una activación celular. Obviamente, ambos mecanismos también podrían actuar de manera simultánea<sup>13,14</sup>.

#### *Interferencia de los aPL con las propiedades anticoagulantes fosfolípido-dependiente de las superficies celulares*

Un claro ejemplo de interferencia en las superficies celulares son las anomalías descritas en el sistema anticoagulante de la proteína C. Este sistema está compuesto por la proteína C (PC), proteína S (S), trombomodulina (TB) y el receptor de la proteína C (RPC). La PC, activada por la trombina en presencia de TB y PS, inactiva por proteólisis a los factores V y VIII en las superficies celulares.

La ocupación de las superficies celulares por complejos inmunes impide o interfiere, a distintos niveles, el normal funcionamiento de este sistema regulador de la coagulación<sup>15</sup>. En consecuencia, se favorecería la aparición de un estado de hipercoagulabilidad que podría contribuir a la aparición de las complicaciones trombóticas de estos pacientes.

**Tabla 1. Mecanismos de trombosis propuestos en el síndrome antifosfolípido**

Interferencia con los mecanismos anticoagulantes en las superficies celulares
Exposición de fosfolípidos aniónicos
Interferencia con el sistema PC/PS
Inhibición de los complejos AT-heparina
Inhibición del TFPI
Inducción de factor tisular
Activación de células vasculares
Lesión del endotelio. Inducción de apoptosis
Incremento de expresión de las moléculas de adhesión
Liberación de micropartículas
Activación de la función plaquetaria
Incremento de endotelin-1
Reactividad con LDL-oxidadas
Incremento de PAI

*AT-heparina: antitrombina-heparina; TFPI: inhibidor del factor tisular; LDL: lipoproteínas de baja densidad.*

En este sentido, estudios *in vitro* con trofoblastos y células endoteliales enfrentadas a aPL anti-IgG han demostrado resultados similares. Los aPL, según Rand et al<sup>16</sup>, reducen los niveles de anexina V, una proteína que mediante su unión a los fosfolípidos aniónicos de las superficies celulares desarrolla una actividad anticoagulante, al impedir el contacto entre los fosfolípidos y los distintos factores de la coagulación. Pues bien, estos autores han observado que los trofoblastos y las células endoteliales, con una anexina V disminuida, muestran tiempos de coagulación más cortos en respuesta a los aPL. Todo ello secundario a una mayor disponibilidad de fosfolípidos para unirse a los factores coagulativos. Estos mecanismos, aunque no han sido corroborados por otros grupos, pretenden explicar los mecanismos patogénicos responsables de las pérdidas fetales.

Estudios más recientes han demostrado que los aPL también interfieren con el mecanismo anticoagulante del sistema PZ/PZI. Este sistema está compuesto por el inhibidor de la proteína Z (PZI) y su cofactor, la proteína Z (PZ). Su principal acción es inhibir al factor Xa. En este sentido, Forrastierro et al<sup>17</sup> han observado que los aPL en presencia de  $\beta_2$ GPI disminuyen la inhibición del factor Xa por el sistema PZ/PZI. Además, los pacientes con SAF tienen unos niveles de PZ reducidos.

Estos resultados son otro claro ejemplo de cómo los aPL pueden interferir, a diferentes niveles, los mecanismos anticoagulantes fosfolípido-dependientes en las superficies celulares, facilitando la aparición de un estado de hipercoagulabilidad.

#### *Activación celular mediada por los aPL*

La observación de que los aPL aumentan la expresión de las moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1, E-selectina) y el factor tisular, acompañados por una

activación y redistribución del factor nuclear kappa-B (NFκB) desde el citoplasma al núcleo, es un claro ejemplo de cómo estos anticuerpos pueden mediar una activación celular después de unirse a las membranas fosfolípicas<sup>14</sup>. En este sentido, Cuadrado et al<sup>18</sup> han demostrado que monocitos circulantes de pacientes con SAF muestran un aumento en la expresión del factor tisular (FT). Dichos resultados se asocian a un incremento de la capacidad procoagulante de estas células. Más aún, estos monocitos, aislados en condiciones no adherentes, acumulan TF ARNm a unos niveles similares a los producidos por monocitos normales estimulados con lipopolisacáridos<sup>19,20</sup>. Todo lo cual sugiere que el nivel de expresión de TF, en el SAF, es comparable al observado en una endotoxemia, patología prototipo de un estado de hipercoagulabilidad.

Por otra parte, otros autores han observado que la deposición de complejos inmunes, en células parcialmente activadas, podría inducir una activación celular posterior. Ésta, a su vez, favorecería la formación de microvesículas que incrementarían la generación de trombina, un mecanismo similar al descrito en la púrpura trombocitopénica trombótica, secundaria al tratamiento con heparina<sup>14</sup>.

Cualquiera de estos mecanismos que hemos descrito podría ser suficiente para originar de forma aislada un estado de hipercoagulabilidad en SAF. Sin embargo, la biología ha enseñado que los mecanismos biológicos no suelen ser procesos simples, sino el resultado de interacciones complejas. Una complejidad que, sin duda, también debe presidir los mecanismos patogénicos de trombosis en el SAF.

#### *Profilaxis y tratamiento del síndrome antifosfolípido*

*Profilaxis primaria.* El tratamiento profiláctico de aquellos pacientes con aPL, pero sin una historia de complicaciones trombóticas, es un problema clínico importante; sin embargo, son escasos los estudios que han intentado dar respuesta a este interrogante.

Básicamente, podemos encontrarnos con los siguientes supuestos clínicos: *a)* enfermos con LES que además son positivos para los aPL, y *b)* individuos sin sintomatología de SAF a los que se les descubre de manera accidental unos aPL en un estudio solicitado por otras razones (p. ej., un estudio de coagulación preoperatorio).

En estas circunstancias, un panel de expertos ha recomendado el tratamiento con ácido acetilsalicílico a dosis bajas<sup>21</sup>. Sin embargo, la anticoagulación puede estar indicada si se sospecha un estado de hipercoagulabilidad.

También se recomiendan las medidas generales de profilaxis tromboembólica, tales como: dejar de fumar, el uso de medias elásticas, estatinas, ácido fólico, etc.

*Profilaxis secundaria del tromboembolismo venoso.* Las trombosis venosas profundas de cualquier localiza-

ción son una complicación frecuente del SAF. Además, estas trombosis suelen ser recurrentes, generando un estado trombofílico que obliga a instaurar una profilaxis secundaria. Ante estas circunstancias la mayoría de los autores coinciden en usar los anticoagulantes orales<sup>22</sup>. Dicha anticoagulación, aunque no existe un acuerdo general en cuanto a la duración total de la misma, debe prolongarse más allá de los 3-6 meses.

Niveles de anticoagulación con un índice normalizado internacional (INR) de 3-4 han demostrado ser efectivos para proteger a estos enfermos de nuevas complicaciones trombóticas<sup>23</sup>. Sin embargo, otros estudios, con regímenes de anticoagulación menos intensos (INR de 2-3), también parecen ser eficaces, pues evitan las recurrencias sin elevar el riesgo hemorrágico. Por tanto, son necesarios más estudios específicos y prospectivos, que permitan elegir el nivel de anticoagulación más adecuado. Mientras tanto, la anticoagulación debe adaptarse a los factores de riesgo trombóticos/hemorrágicos de cada paciente.

*Stroke y síndrome antifosfolípido.* El stroke isquémico es la única manifestación clínica neurológica aceptada como criterio diagnóstico del SAF. Para prevenir estas complicaciones neurológicas se han empleado fármacos antiagregantes y anticoagulantes. Sin embargo, es difícil proponer una de estas opciones terapéuticas, pues la mayoría de las recomendaciones están basadas en estudios retrospectivos con un mal diseño. Hasta la fecha, el único estudio prospectivo, aleatorizado y controlado es el APASS (AntiPhospholipid Antibody in Stroke Study group) en colaboración con el WARSS (Warfarin-Aspirin Recurrent Stroke Study)<sup>24</sup>. Un estudio que, aun siendo el más recomendable, tampoco está exento de limitaciones, pues incluye enfermos con una sola determinación de los aPL, títulos bajos de aCL o del tipo IgA. Además, no contempla distintas intensidades de anticoagulación con los dicumarínicos. Por consiguiente, en la actualidad, seguimos sin datos suficientes para poder recomendar un tratamiento u otro, si bien los pacientes con un mayor riesgo trombótico, aquellos con un título alto de aCL y/o LA, podrían beneficiarse de los anticoagulantes orales, manteniendo un INR elevado<sup>25</sup>.

Por último, hemos de recordar que otros desórdenes neurológicos como la epilepsia, demencia, mielitis transversa, esclerosis múltiple, corea, migraña, síndrome de Guillain-Barré y pérdida de la audición sensorial, no se consideran criterios diagnósticos del SAF.

*Tratamiento del SAF en la mujer embarazada.* Como subrayábamos al principio, otra de las principales complicaciones del SAF son las del embarazo, concretamente las pérdidas fetales. En la mujer embarazada con SAF, los expertos recomiendan la heparina de bajo peso molecular (HBPM) y el ácido

acetilsalicílico a dosis bajas. La pauta y dosis de la HBPM dependerán del peso y de la situación clínica de la paciente. En general, embarazadas con antecedentes personales de trombosis reciben 2 dosis de heparina al día. Por otra parte, los anticoagulantes orales también pueden emplearse entre las semanas 14-34, sobre todo en mujeres con *stroke* o trombosis de localización arterial. El tratamiento con inmunoglobulina intravenosa sólo está indicado en aquellos casos donde no resulta efectiva la terapia convencional con HBPM y ácido acetilsalicílico<sup>26</sup>.

## Resumen

En la actualidad el SAF es una entidad clínica bien definida que responde a la asociación de unos criterios clínicos (trombosis y/o pérdidas fetales) y de laboratorio (aCL y/o LA).

Aunque los mecanismos patogénicos aún no se conocen en detalle, disponemos de importantes observaciones que ayudan a comprender mejor este síndrome. El papel que desempeñan las proteínas que se unen a las superficies celulares, como la  $\beta_2$ GPI o la protrombina; la acción de los aCL sobre los mecanismos anticoagulantes fosfolípido-dependientes o la activación celular mediada por los aPL son progresos de un valor incuestionable.

La anticoagulación es la opción terapéutica más aceptada, no sólo para las complicaciones trombóticas, sino también para las asociadas al embarazo. Sin embargo, se requieren más ensayos clínicos que respondan algunas cuestiones, por ejemplo, cuál es el mejor nivel de anticoagulación en la profilaxis secundaria, qué opción es la mejor para el grupo de individuos que son aPL positivos, pero sin clínica del síndrome, o cómo actuar en aquellos enfermos con LES, aPL positivos, pero sin complicaciones tromboembólicas.

## Bibliografía

- Hughes GRV. Thrombosis, abortion, cerebral disease and lupus anticoagulant. *BMJ* 1983;287:1088-9.
- Asherson RA, Khamashta MA, Ordi-Ros J, et al. The "primary" antiphospholipid syndrome: major clinical and serological features. *Medicine (Baltimore)* 1988;68:366-74.
- Wassermann A, Neisser A, Bruck C. Eine serodiagnostische Reaktion bei Syphilis. *Deutsche Med Wochenschr* 1906;32:745-6.
- Galli M, Comfurius P, Maassen C, et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* 1990;335:1544-7.
- McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krillis SA. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation:  $\beta_2$ -glycoprotein I. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:4120-4.
- Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999;42:1309-11.
- Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulant: an update. *Thromb Haemost* 1995;74:1185-90.
- Bouma B, G De Groot P, Van den Elsen JMH, et al. Adhesion mechanism of human  $\beta_2$ -glycoprotein I to phospholipid based on its crystal structure. *EMBO Journal* 1999;18:5166-74.
- Willems GM, Janssen MP, Pelsers MM, et al. Role of divalency in the high-affinity binding of anticardiolipin antibody- $\beta_2$ GPI complexes to lipid membranes. *Biochemistry* 1996;35:13833-42.
- Ma K, Simantov R, Zhang J, Silverstein R, Hajjar y McCrae R. High affinity binding of  $\beta_2$ -glycoprotein I to human endothelial cells is mediated by annexin II. *J Biol Chem* 2000;19:15541-8.
- Borchman D, Harris EN, Pierangeli SS, Lamna OP. Interactions and molecular structure of cardiolipin and  $\beta_2$ GPI. *Clin Exp Immunol* 1995;102:373-8.
- Blank M, Krause I, Shoenfeld Y. The contribution of experimental models to our understanding of etiology, pathogenesis and novel therapies in the antiphospholipid syndrome. En: Khamashta MA, editor. *Hughes syndrome: antiphospholipid syndrome*. London: Springer, 2000; p. 379-88.
- Levine JS, Branch DW, Rauch J. The antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med* 2002;356:752-63.
- Arnout J, Vermynen J. Current status and implications of autoimmune antiphospholipid antibodies in relation to thrombotic disease. *J Thromb Haemost* 2003;1:931-42.
- Galli M, Ruggeri L, Barbui T. Differential effects of anti- $\beta_2$ -glycoprotein I and antiprotrombin antibodies on the anticoagulant activity of protein C. *Blood* 1998;91:1999-2004.
- Rand JH, Wu X, Andree HAM, Lockwood CJ, Guller S, Scher J, et al. Pregnancy loss in the antiphospholipid-antibody syndrome: A possible thrombotic mechanism. *N Engl J Med* 1997;337:154-60.
- Forastiero RR, Martinuzzo ME, Lu L, Broze JR. Autoimmune antiphospholipid antibodies impair the inhibition of activated factor X by protein Z/protein Z-dependent protease inhibitor. *J Thromb Haemost* 2003;1:1764-70.
- Cuadrado MJ, López-Pedreira C, Khamashta MA, Camps MT, Tinahones F, et al. Thrombosis in primary antiphospholipid syndrome: A pivotal role for monocyte tissue factor expression. *Arthritis Rheum* 1997;40:834-41.
- Dobado-Berrios PM, López-Pedreira C, Velasco F, Aguirre MA, Torres A, Cuadrado MJ. Increased levels of tissue factor mRNA in mononuclear blood cells of patients with primary antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 1999;82:1578-82.
- Dobado-Berrios PM, López-Pedreira C, Velasco FA, Cuadrado MJ. The role of tissue factor in the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 2001;44:2467-76.
- Alarcón-Segovia D, Boffa MC, Branch W, Cervera, Gharavi A, Khamashta M, et al. Prophylaxis of the antiphospholipid syndrome: A consensus report. *Lupus* 2003;12:497-8.
- Meroni PL, Moia M, Derksen RHW, Tincani A, McIntyre JA, Arnout JMMC, et al. Venous thromboembolism in the antiphospholipid syndrome: management guidelines for secondary prophylaxis. *Lupus* 2003;12:504-7.
- Khamashta M, Cuadrado MJ, Mujic F, Taub NA, Hunt BJ, Hughes GR. The management of thrombosis in the antiphospholipid in the antiphospholipid-antibody syndrome. *N Engl J Med* 1995;332:993-7.
- WARSS, APASS, PICSS and HAS Study Groups. The feasibility of a collaborative, double-blind study using anticoagulant: The Warfarin-Aspirin Recurrent Stroke Study (APASS), the Patent Foramen Ovale Study (PICSS) and the Hemostatic System Activation Study (HAS). *Cerebrovas Dis* 1997;7:100-12.
- Brey RL, Chapman J, Levine SR, Ruiz-Irastorza G, Derksen RHW, Khamashta M, et al. Stroke and the antiphospholipid syndrome: Consensus meeting Taormina 2002. *Lupus* 2003;12:508-13.
- Tincani A, Branch W, Levy RA, Piette JC, Carp H, Rai RS, et al. Treatment of pregnant patients with antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2003;12:524-9.

# TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND Y SU MONITORIZACIÓN

J. BATLLE FONRODONA, M.<sup>ª</sup>S. NOYA PEREIRA, A. PÉREZ RODRÍGUEZ, E. LOURÉS FRAGA Y M.<sup>ª</sup>F. LÓPEZ FERNÁNDEZ

Servicio de Hematología y Hemoterapia. Complejo Hospitalario Juan Canalejo. A Coruña. Departamento de Medicina. Universidad de Santiago de Compostela.

## Resumen

La enfermedad de Von Willebrand (EvW) es un trastorno hemorrágico hereditario hasta ahora considerado como muy frecuente, causado por una deficiencia cuantitativa o cualitativa del factor Von Willebrand (FvW). Es muy probable que introduciendo criterios epidemiológicos más estrictos se acabe diferenciando entre la verdadera EvW, de aquellos descendos del FvW que podrían ser valorados más como riesgo hemorrágico leve/moderado que como enfermedad, por lo que disminuiría de forma notable su frecuencia. Se dispone principalmente de dos tipos de agentes terapéuticos para el tratamiento de los episodios hemorrágicos espontáneos y para su prevención: la desmopresina (DDAVP) y la terapéutica sustitutiva con productos derivados del plasma. La DDAVP es el tratamiento de elección en la mayor parte de pacientes con EvW tipo 1. Los pacientes con el tipo 3 y en la mayoría de los pacientes con tipo 2, la DDAVP como único recurso es insuficiente o está contraindicada, siendo necesario asociarla a tratamiento sustitutivo empleando concentrados ricos en FvW. Se deben emplear preferentemente los concentrados de FvW sometidos a procedimientos de inactivación viral, lo que no ocurre con el crioprecipitado. Aunque el tratamiento de la

EvW es relativamente simple (siempre que se tenga acceso a un laboratorio básico), el diagnóstico es a menudo complicado, y es aconsejable caracterizar de manera adecuada a los pacientes para prescribir un tratamiento individualizado en base al tipo y subtipo de EvW.

## Introducción

La EvW es una diátesis hemorrágica congénita causada por una anomalía cualitativa y/o cuantitativa del FvW de carácter autosómico dominante o, con menos frecuencia, recesivo. Existe también una forma adquirida asociada a múltiples situaciones. Los defectos del FvW en la EvW motivan la hemorragia al impedir la adhesión plaquetaria o la coagulación sanguínea que también estabiliza el FVIII (concentrado de factor VIII) en la circulación. La EvW constituye un grupo heterogéneo, con una gran diversidad de fenotipos, que varían en gravedad, predominando las formas leves. La *clasificación revisada* de la EvW, aceptada internacionalmente, pretende reflejar las diferencias en la fisiopatología de los diferentes fenotipos de esta enfermedad<sup>1</sup>. Se basa en la cantidad y calidad del FvW en el plasma y plaquetas (tabla 1).

Hasta ahora la EvW se ha considerado muy prevalente, pero es muy probable que en un futuro próximo

Tabla 1. Clasificación de la EvW

Subtipo	Definición	Frecuencia	Herencia autosómica
Tipo 1	Deficiencia parcial cuantitativa del FvW	70-80%	Dominante
Tipo 2	Deficiencia cualitativa del FvW		
2 A	Disminución de la función del FvW, plaquetario dependiente, asociada a ausencia de los multímeros de mayor tamaño del FvW	10-15%	Dominante Rara vez recesiva
2 B	Aumento de la afinidad del FvW por la GPIIb plaquetaria	< 5%	Dominante
2 M	Disminución de la función del FvW, plaquetaria dependiente, sin ausencia de multímeros de mayor tamaño del FvW	Raro	Dominante
2 N	Disminución de la afinidad del FvW por el FVIII	Raro	Recesiva
Tipo 3	Deficiencia virtualmente completa del FvW	1-5/10 <sup>6</sup> habitantes	Recesiva

EvW: enfermedad de von Willebrand; FvW: factor de von Willebrand; FVIII: concentrado de factor VIII. Adaptada de Sadler<sup>1</sup>.

mo, empleando criterios epidemiológicos más estrictos se distinga entre una verdadera EvW de aquellos descensos del FvW que podrían ser valorados más como riesgo hemorrágico leve/moderado que como enfermedad<sup>2</sup>. Si así fuera podría disminuir de manera ostensible su frecuencia, y, en estos últimos casos, dependiendo del riesgo hemorrágico del paciente, la actitud terapéutica podría incluir alguno de los recursos empleados en el tratamiento de la EvW (sobre todo los farmacológicos). A lo largo de estos últimos años no se han producido avances muy notables en el tratamiento de la EvW<sup>3-7</sup>. A continuación se indican los aspectos más relevantes.

### Recursos terapéuticos en la EvW

Se dispone de dos tipos de recursos terapéuticos principales: la DDAVP y el tratamiento sustitutivo con derivados plasmáticos. Otros agentes empleados en el tratamiento, tales como los antifibrinolíticos, se consideran como tratamiento coadyuvante (tabla 2)<sup>3-7</sup>. El tratamiento óptimo de la EvW requiere: *a*) un diagnóstico correcto, que incluya el subtipo de EvW; *b*) el conocimiento de la historia hemorrágica previa; *c*) los valores del FVIII y de FvW, y *d*) valoración de la gravedad y duración prevista del episodio hemorrágico, para estimar así el tipo, dosis y duración del tratamiento que se debe emplear.

El objetivo es la corrección de las alteraciones de la hemostasia primaria y de la coagulación, normalizando los valores de FvW y de FVIII. Es necesario tener en cuenta los siguientes aspectos: *a*) las alteraciones de la coagulación debidas al descenso del FVIII son secundarias al defecto del FvW; *b*) la restauración de los valores normales de FVIII se acompaña por lo general de un control de la hemorragia no mucosa y posquirúrgica, incluso en ausencia de corrección del tiempo de hemorragia (TH); *c*) se necesita la restauración de la hemostasia primaria para controlar la hemorragia mucosa grave, y *d*) el tratamiento sustitutivo con FvW restituye el compartimiento plasmático, pero no el plaquetario<sup>3-7</sup>.

### Recursos farmacológicos

#### Agentes antifibrinolíticos

Mejoran la hemostasia al inhibir la fibrinólisis. Son sobre todo útiles en las hemorragias por mucosas: epistaxis, gingivorragias, menorragia<sup>3-7</sup>. Los más utilizados son el ácido épsilon-aminocaproico y el ácido tranexámico (1-aminometil-ciclohexano-4-carboxílico o AMCHA). Pueden administrarse por vía tópica, oral o intravenosa. Los enjuagues con antifibrinolíticos en la zona de extracción dentaria facilitan una alta concentración local del agente hemostático. El ácido épsilon-aminocaproico se usa en dosis de 50-100 mg/kg, cuatro veces al día. El AMCHA se emplea en dosis de 15-25 mg/kg, tres o cuatro veces al día. Como efectos secundarios hay que señalar náuseas y vómitos y, raras veces, exantema cutáneo o

Tabla 2. Recursos terapéuticos de la EvW

<i>Farmacológicos</i>
Antifibrinolíticos
Acetato de desmopresina (DDAVP)
Estrógenos de síntesis
<i>Concentrados plasmáticos de FvW</i>
Crioprecipitados (en desuso)
Concentrados de FVIII y FvW de pureza intermedia-alta
Concentrados de FvW pobres en FVIII
<i>Concentrados de plaquetas</i>
<i>Concentrado de FVIIa recombinante</i>
<i>Perspectivas futuras</i>
Concentrado de FvW recombinante
Terapia génica
Trasplante hepático

*EvW*: enfermedad de von Willebrand; *FvW*: factor de von Willebrand; *FVIII*: concentrado de factor VIII.

subfusión conjuntival. Contraindicaciones: *a*) hemorragias de tracto urinario por la producción de coágulos al inhibir la uroquinasa, y *b*) en pacientes con factores de riesgo trombotico deben usarse con precaución.

#### Acetato de desmopresina

Los efectos de la DDAVP varían según el subtipo de la EvW, y no siempre puede administrarse en todas las situaciones<sup>3-7</sup>. Así mismo, interesa que el FvW incrementado sea funcionalmente normal.

#### Prueba de respuesta a la DDAVP

Ya que la respuesta a la DDAVP en un paciente dado es reproducible en diferentes ocasiones, se aconseja realizar una prueba en todos los pacientes, y preferentemente en el momento del diagnóstico, para conocer el patrón de respuesta individual en condiciones basales, sin sangrado activo<sup>8</sup>. Hasta un 25% de pacientes no responden o tienen una respuesta limitada. La respuesta es diferente en cada enfermo, pero suele mantenerse constante y concordante con el resto de la familia.

#### Monitorización

Incluye el pulso, presión arterial y determinación de TH/tiempo de obturación (TO), PFA<sup>100</sup>, TTPa FVIII procoagulante (VIII:C), FvW:Ag, FvW:RCo (basal, 30 min, 1, 2, 4 y a las 6 h si fuera posible). Así mismo debe monitorizarse el recuento plaquetario para detectar cualquier forma 2B no clásica al observar la trombocitopenia postinfusión<sup>3-11</sup>.

#### Criterios de respuesta a la DDAVP

Se acepta que hay respuesta a la DDAVP si a las 2 h de su administración se observa un aumento de al menos tres veces el nivel basal de FVIII y de FvW:RCo

obteniendo niveles de al menos 30 U/dl y un TH de 12 min o menor, cuando éste se encontraba previamente prolongado<sup>12</sup>.

#### Dosis y vía de administración

Se puede administrar por vía subcutánea, intranasal e intravenosa. En España la vía comúnmente utilizada es la intravenosa. La dosis es de 0,3 µg/kg de peso en 50-100 ml de suero salino a pasar en 20 min. Dosis superiores no suponen mayor respuesta. En niños, podría ser suficiente con 0,2 µg/kg, administrado más lentamente que en adultos para evitar efectos adversos.

La máxima elevación de FVIII se produce a los 30-60 min, aumentando de 3 a 5 veces el nivel basal, observándose grandes variaciones individuales. Esta respuesta es transitoria, de unas 4-6 h<sup>3-7</sup>. Se produce liberación del FvW de las células endoteliales, incluyendo multímeros supranormales que ofrecen múltiples sitios funcionales, con un máximo a los 60-120 min, y aumenta el FvW:RCo. El TH y el TO del PFA<sup>100</sup> suele disminuir o corregirse en 1-2 h y prolongándose de nuevo al cabo de 4-6 h en una minoría de los casos (dependiendo del tipo de EvW). En la vía subcutánea la dosis es la misma, y el pico se produce aproximadamente una hora más tarde. El nebulizador intranasal de alta concentración puede ser de utilidad para el tratamiento domiciliario en niños: dosis de 300 µg en adultos y 150 µg en niños con menos de 50 kg. En España no se encuentra comercializado y debe tramitarse como medicamento extranjero.

#### Taquifilaxia

Las dosis pueden repetirse cada 12 o 24 h, dependiendo del tipo y gravedad del suceso hemorrágico. En la mayoría de los pacientes tras dosis repetidas de DDAVP, o si se acortan los intervalos de infusión, la respuesta va siendo progresivamente menor<sup>13</sup>.

Disminuye aproximadamente un 30% si se administra cada 24 h. Por ello, en aquellos casos en los que preveamos un riesgo hemorrágico prolongado, no será suficiente como único tratamiento y deberán plantearse otras opciones terapéuticas.

#### Efectos secundarios

Enrojecimiento facial, cefalea transitoria, hipotensión y taquicardia, justo coincidiendo con la infusión (por el efecto vasomotor, desapareciendo al enlentecer la infusión). La acción antidiurética se acompaña en muy raras ocasiones de hiponatremia, retención de líquidos e, incluso, intoxicación hídrica. Este riesgo aumenta en niños y en postoperados que han recibido gran cantidad de líquidos hipotónicos. Cuando son necesarias varias dosis, es aconsejable restringir líquidos y verificar una correcta diuresis. Se han observado hiponatremia y convulsiones en niños con enuresis nocturna<sup>14</sup>. Se han descrito, asimismo, algunas complicaciones tromboembólicas, por lo que debe usarse con precaución en pacientes ancianos cardiopatas o con arteriosclerosis (no en niños)<sup>15,16</sup>. Esta complicación puede guardar relación con la aparición transitoria de multímeros supranormales derivados de la célula endotelial, los cuales pueden inducir la agregación plaquetaria en las condiciones reológicas de las arterias estenosadas. Se suele aceptar que está contraindicado en niños menores de 3 años y en pacientes con antecedentes de convulsiones, enfermedad cardiovascular, polidipsia y/o sobrecarga de líquidos.

#### Indicaciones del tratamiento con DDAVP

*EvW tipo 1.* Es el tratamiento de elección (tabla 3). La EvW tipo 1 representa aproximadamente el 80%, y la mayoría de los pacientes suelen responder a la DDAVP, con intensidad variable, sobre todo si el contenido de FvW plaquetario es normal.

Tabla 3. Respuesta a la DDAVP en la EvW

Tipo enfermedad Von Willebrand	Nivel de evidencia	Respuesta esperable
Tipo 1 clásico	E2	Excelente. Tratamiento elección en cirugía menor, maxilofacial, traumatismos leves, etc.
Tipo 1 plaquetario bajo	D	Pobre/ausente
Tipo 2 A	D	Pobre/ausente. ↑ multímeros, pero son malfuncionantes. Se produce ↓ TH en algunos casos
Tipo 2 B	D	Controvertido: desarrollo trombopenia. Uso clínico restringido. Se han descrito casos tratados con éxito
Tipo 2 M	D	Pobre/ausente. ↑ FVIII y FvW sin modificar el patrón multimérico. Aislados casos tratados con éxito
Tipo 2 N	D	Esencial para diagnóstico. ↑ FvW pero no el FVIII. Respuesta muy breve, en algunos casos suficiente en cirugía menor o diátesis muy leve
Tipo 3	D	Nula. No válido como único tratamiento

DDAVP: acetato de desmopresina; EvW: enfermedad de von Willebrand; TH: tiempo de hemorragia; FVIII: concentrado de factor VIII; FvW: factor de von Willebrand.

*Otras situaciones.* Son aquellos casos en los que la DDAVP se ha valorado en grupos limitados de pacientes. No hay estudios aleatorizados. En el subtipo 2N aumenta el FvW, pero se produce respuesta o es muy breve del FVIII, ya que no mejora la afinidad del FvW por el FVIII<sup>17,18</sup>. En forma 2M hay una respuesta pobre o ausente, pero en algunas situaciones puede ser de utilidad

*No responden a la DDAVP (aproximadamente el 20-25 % de los pacientes).* La EvW subtipo 1 “plaquetario bajo” se asocia a una pobre respuesta. En el subtipo 2A algunos pacientes presentan acortamiento del TH, aumento del FVIII y multímeros que en ocasiones se corrigen para volver a ser patológicos en corto espacio de tiempo<sup>3-7</sup>. En la forma 2B su indicación sigue siendo motivo de controversia por agravar la trombopenia, si bien se han descrito algunos casos de tratamiento con éxito<sup>19-22</sup>. En el tipo 3 no es útil como único tratamiento<sup>23</sup>. Sin embargo, los pacientes con EvW grave recesiva con la mutación C2362F homocigota, o heterocigota compuesta, muestran una normalización del FVIII sin cambios en el TH anormal<sup>24</sup>.

#### **Estrógenos de síntesis**

Incrementan la síntesis del FvW, pero no de manera inmediata, sino a partir de los 5 o 6 días, prolongándose durante 2 o 3 semanas y de forma variable e impredecible. Es por ello que no se utilizan de forma generalizada con fines terapéuticos. Puede ser un recurso complementario de los anteriores<sup>3-7</sup>. Los estrógenos, incluidos los de síntesis (éstos a dosis de 0,6 mg/kg/día), se han utilizado con éxito en la reducción de la gravedad de la menorragia de mujeres con EvW de grado leve-moderado, e incluso en el tipo 3, a pesar de que no se modifiquen los valores de FVIII/FvW. Debe hacerse siempre una valoración del riesgo-beneficio. A menudo, estas mujeres utilizan estrógenos asociados a progestágenos como método anticonceptivo o para la prevención de osteoporosis posmenopáusicas. Pueden ser útiles incluso en el tipo 3, aunque no se modifiquen los valores del FVIII y FvW, complementando el tratamiento sustitutivo. También son útiles como único tratamiento en las menorragias y en casos muy especiales de cirugía menor, iniciando el tratamiento en el preoperatorio, y manteniéndolo 2 semanas después.

#### **Agentes hemostáticos locales**

Existen diversos medicamentos locales para tratar la hemorragia de mucosas: trombina local; colágena micronizada en tiras para taponamiento nasal; soluciones orales y nasales de ácido tranexámico tópico; y goma de fibrina. Son útiles, sobre todo, como coadyuvantes.

#### **Concentrados plasmáticos de FvW**

Son eficaces en todos los subtipos de EvW, pero, debido al riesgo residual de enfermedades virales

transmisibles y su elevado coste, deben reservarse a los pacientes no candidatos al tratamiento farmacológico (no respuesta a la DDAVP, taquiflaxia).

#### **Crioprecipitado**

Constituyó uno de los pilares del tratamiento de la EvW por contener buenos niveles de FVIII y de FvW, con estructura multimérica normal. Actualmente en desuso, tras la aparición primero de la DDAVP, y posteriormente de los concentrados comerciales de FvW, que son sometidos a procedimientos de inactivación viral. Su utilización debería restringirse a aquellas situaciones de hemorragia grave en las que, por alguna circunstancia, no se disponga de concentrados de FVIII que contengan FvW. Cada bolsa contiene unas 80-100 U. Suelen administrarse cada 12 h. Puede obtenerse a partir de plasma obtenido de donante habitual con serologías repetidamente negativas. Así mismo, se pueden obtener a partir de plasma previamente inactivado. En este último caso, dependiendo del tipo de procedimiento, el producto resultante puede carecer de multímeros de alto peso, así como tener bajo contenido en FvW y parece poco útil (método solvente/detergente), o bien puede mantener valores menores, pero tal vez aceptables de FvW (azul de metileno), por lo que podría ser útil en caso de necesidad<sup>25</sup>.

#### **Concentrados de FVIII y FvW**

##### *Concentrados de FVIII y FvW de pureza intermedia o alta*

Existen varios concentrados comerciales de FvW disponibles<sup>26-31</sup>. Aunque tal vez no sea imprescindible una estructura multimérica idéntica a la del FvW plasmático, sí que es importante que su FvW sea rico en multímeros de alto peso molecular, lo que suele correlacionarse con una mejor actividad de FvW. Las características del FvW de estos concentrados varían enormemente según el proceso de fabricación y la degradación que sufren estos multímeros (figs. 1 y 2). Un estudio aleatorizado en el que se compararon cuatro concentrados, concluía que ninguno tenía una estructura multimérica intacta, similar a la del plasma, ni lograba normalizar sistemáticamente el TH, pero todos eran igual de eficaces en la corrección del FVIII. Asimismo varía el contenido de FvW:RCo en comparación con el FVIII<sup>31</sup>.

Tras la infusión de concentrados de FVIII y FvW, se produce un aumento inmediato de FvW, con una vida media de unas 8-12 h, así como de FVIII, que aumenta desproporcionadamente y puede permanecer elevado hasta 48 h después, ya que al FVIII exógeno administrado, hay que sumar el FVIII endógeno (estabilizado por el FvW). Análisis farmacocinéticos indican que la repetitiva administración de concentrados de FvW resultarán en un aumento de FVIII hasta una meseta, cuya altura depende de la tasa de síntesis de FVIII. El efecto sobre el TH es muy variable, así como discutible la necesidad de su normali-

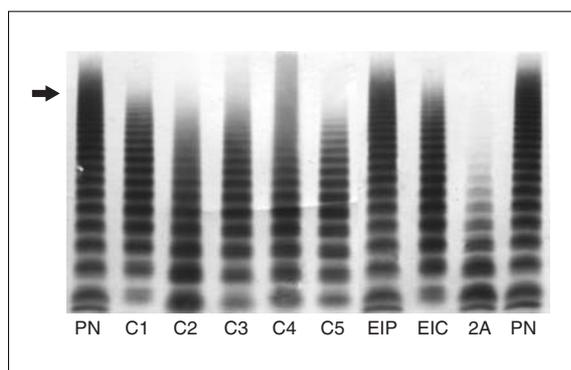


Figura 1. Estructura multimérica del FvW de diversos concentrados de FvW en gel de baja resolución. Plasma normal (PN), cinco concentrados comerciales diferentes (C1 a C5), estándar internacional 02/150 de FvW en plasma (EIP), estándar internacional 00/514 de concentrado de FvW (EIC) y plasma de un paciente con enfermedad de Von Willebrand subtipo 2A. En comparación con el patrón normal se aprecia disminución de los multímeros de mayor tamaño (indicado con flecha) de intensidad distinta en cada concentrado. En el subtipo 2A se observa una carencia total de los multímeros de peso molecular medio y alto.

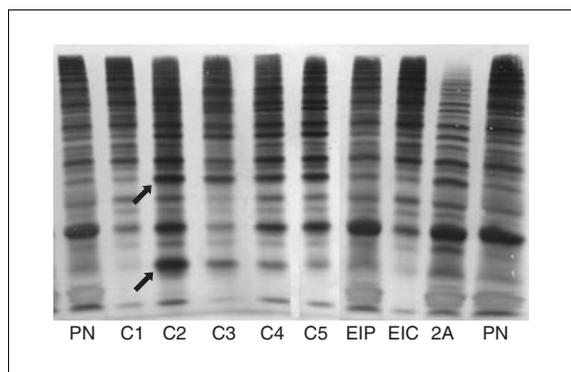


Figura 2. Estructura multimérica del FvW de diversos concentrados de FvW en gel de alta resolución. Muestras iguales que en figura 1. Se aprecia un patrón de bandaje diferente según el tipo de concentrado, con incremento de la proporción relativa de las bandas satélite de cada multímero indicativas de un mayor grado de proteólisis que la observada en el plasma normal. Véase la gran proteólisis del FvW existente en el concentrado C2 (indicado con flechas en el primer y segundo multímero). En el subtipo 2A se aprecia un aumento de las bandas satélite sugerentes también de proteólisis del FvW, pero en menor intensidad que en C2.

zación (fig. 3). Se ha logrado una buena hemostasia posquirúrgica en pacientes con estos concentrados, independientemente de la modificación del TH (ésta sí parece importante en el sangrado por mucosas).

Los concentrados de FVIII monoclonales y recombinantes, o no poseen FvW, o contienen muy poca cantidad, por lo que no deben utilizarse como único tratamiento de la EvW. Así pues, en las formas 2N o 3 se observa una recuperación *in vivo* muy pobre, además de un rápido aclaramiento del FVIII exógeno cuando

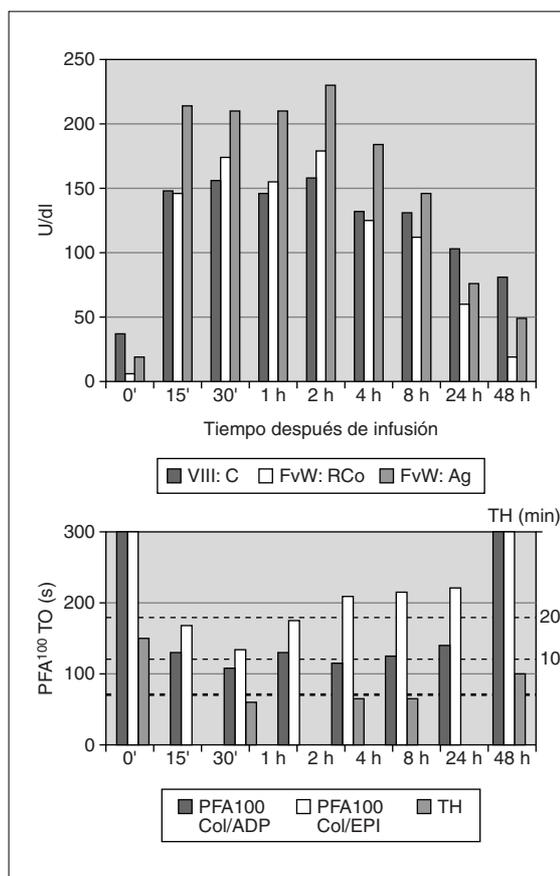


Figura 3. Respuesta al tratamiento sustitutivo en la enfermedad de von Willebrand 2M (R1374C): Tras la infusión de una única dosis de 80 U/kg de FvW:RCO (o bien de 32 U de FVIII) de concentrado rico en FVIII y FvW se aprecia una normalización de los niveles de estas proteínas que persisten incluso 24 h, así como una corrección transitoria del tiempo de hemorragia (TH) e incluso del tiempo de obturación (TO) del PFA100 (panel inferior) coincidiendo con niveles supranormales de FvW. Las líneas discontinuas horizontales del panel inferior señalan el límite superior de normalidad del TH (línea inferior) y del TO del PFA100 empleando cartuchos de Col/EPI (línea superior) y Col/ADP (línea intermedia).

se utiliza concentrado monoclonal, siendo la respuesta excelente si se utiliza concentrado de FVIII y FvW<sup>17</sup>. Sin embargo, en pacientes con EvW tipo 3 y auto o alo anticuerpos al FvW, en los que no pueden utilizarse concentrados ricos en FvW, por el riesgo de reacciones anafilactoides, se ha utilizado FVIIIa a altas dosis y en infusión continua, con éxito en algún caso.

#### Modalidades de administración de concentrados en la EvW

Las pautas de tratamiento son totalmente empíricas y normalmente se basan en la experiencia clínica y en la respuesta a tratamientos previos<sup>3-7</sup>. La respuesta del VIII:C puede predecirse en base a datos farmacocinéticos indicando que 1 U/kg aumenta el nivel del VIII:C en aproximadamente 2 U/dl (1,5 en niños). Dosis de 20-40 U/kg una vez al día aumentan los valores por encima de 50 U/dl. Las siguientes

Tabla 4. Tratamiento de la EvW con concentrados FVIII ricos en FvW

Tipo de hemorragia	Dosis U/kg (VIII:C)	Duración	Niveles plasmáticos VIII:C recomendados
Cirugía mayor	40-60	Dosis diaria	Mantener > 50 U/dl hasta curación completa, dependiendo tipo cirugía
Cirugía menor	30-60	Dosis diaria o a días alternos	> 30 U/dl hasta curación completa, dependiendo tipo cirugía
Extracción dentaria	20-30 asociar tranexámico oral 7 días	Dosis única	> 30 U/dl durante al menos 12 h
Hemorragias leves espontáneas	20-30	Dosis única	> 30 U/dl

Estas dosis son sólo orientativas. Es aconsejable realizar un estudio farmacocinético en cada paciente, para deducir las sucesivas dosis y la frecuencia de las infusiones.

En el caso de concentrados con especificación de su contenido en U de FvW:RCo, las dosis recomendadas para adultos, el número de infusiones, y niveles plasmáticos recomendados en base a este parámetro son los mismos que los señalados en base a VIII:C.

EvW: enfermedad de von Willebrand; FVIII: concentrado de factor VIII; FvW: factor de von Willebrand.

Adaptada de Mannucci<sup>6</sup>.

dosis dependen de los valores de FVIII y FvW obtenidos. En situaciones de sangrado vital o cirugía mayor (ver tabla 4) se recomiendan niveles iniciales de FVIII y FvW superiores a 80 U/dl y posteriormente por encima de 50 U/dl durante 7-10 días (en ocasiones es necesario administrar los concentrados cada 12 h), o hasta la cicatrización. Además es preciso tener en cuenta que los sangrados a veces se producen en el postoperatorio no inmediato.

Si se trata de cirugía menor es suficiente mantener en valores aproximadamente del 30-50 U/dl durante 3-5 días. Para las hemorragias por mucosas se suele individualizar la dosis y la monitorización, dependiendo del tipo, localización y extensión del sangrado. El sangrado gastrointestinal es el que suele requerir tratamiento más intensivo. No existen estudios que ratifiquen cuánto tiempo es necesario mantener valores elevados después de un procedimiento hemorrágico. Normalmente, los concentrados se administran a demanda, en infusión intermitente cada 12-24 h (tabla 5).

**Profilaxis domiciliaria.** Podría estar indicada en aquellos pacientes graves con mucha clínica hemorrágica, por ejemplo, pacientes con angiodisplasia concomitante, administrando 2 o 3 dosis semanales.

La infusión continua es eficaz (el FvW y el FVIII son estables en estos concentrados), permitiendo ahorrar hasta un 50% de la dosis con buena respuesta clínica y de laboratorio<sup>32</sup>. Estaría indicada sobre todo en pacientes con EvW tipo 3 sometidos a cirugía. Existen múltiples fórmulas para calcular el ritmo de infusión. Se suele aconsejar incluir heparina, o bien suero salino en Y. Esta forma de administración no se encuentra registrada en nuestro país, debiendo utilizarse mediante uso compasivo.

#### Monitorización

No hay consenso acerca del mejor parámetro a emplear en la monitorización del tratamiento sustitutivo<sup>3-7,9-11</sup>.

Tabla 5. Modalidades de administración de concentrados en la EvW

#### A demanda. Infusión intermitente

1 U/kg de FvW aumenta la tasa plasmática en 2 U/dl.  
Vida media aproximada 12 h

#### Profilaxis

En pacientes con elevada incidencia hemorrágica puede ser útil. Dos o tres dosis semanales

#### Infusión continua

Nivel plasmático (U/ml) = Ritmo de infusión (U/kg/h)/  
aclaramiento (ml/kg/h)

EvW: enfermedad de von Willebrand; FvW: factor de von Willebrand.

Algunos investigadores consideran que no es realmente necesario realizar ninguna prueba con este propósito en pacientes con episodios hemorrágicos espontáneos. Por el contrario, en situaciones de cirugía recomiendan la titulación del VIII:C cada 12 h el día de la intervención y, posteriormente, cada 24 h. En la actualidad los concentrados de FvW vienen marcados con su contenido en FvW:RCo, pudiendo monitorizarse este parámetro, si bien por el momento es mucho más complejo este tipo de monitorización en la práctica clínica habitual.

La monitorización del TH no se considera necesaria generalmente. Con frecuencia el TH no se normaliza e incluso puede no acortarse con el tratamiento sustitutivo. La experiencia demuestra que pueden llevarse a cabo con éxito grandes procedimientos quirúrgicos y que los episodios hemorrágicos se controlan tras la administración de concentrados con FvW, incluso aunque no se corrija el TH. Se suele recomendar la determinación del TH en caso de hemorragias mucosas, o bien en aquellas situaciones en las que el paciente continúa sangrando a pesar de valores adecuados de VIII:C y FvW.

Hay que resaltar la limitación del PFA<sup>100</sup>, muy sensible al FvW del compartimiento plaquetario, para la monitorización del tratamiento sustitutivo, ya que éste no se normaliza con la infusión de concentrados de FVIII y FvW, aún cuando se alcancen valores normales de ambos factores en plasma<sup>9,10</sup>. Bien es cierto que puede normalizarse cuando se alcanzan niveles supranormales de FvW.

En general pueden cuantificarse el VIII:C, el FvW:RCo y el FvW:Ag, y, en algunos centros también el FvW:CB. No existe siempre normalización completa de estos parámetros ni correlación con el cuadro clínico.

La normalización del FVIII parece importante como lo demuestra el tratamiento de pacientes con EvW tipo 3 y aloanticuerpos, en los que sólo puede utilizarse FVIIIr en infusión continua a dosis muy elevadas (se corrige el FVIII pero no los valores de FvW), deteniéndose la hemorragia a pesar de ello. No hay que olvidar que en pacientes con algunas formas variantes de EvW el FVIII basal puede encontrarse dentro de la normalidad, por lo que en estos pacientes es imprescindible determinar el FvW:RCo. Así mismo debe tenerse en cuenta siempre la respuesta retardada del incremento de FVIII.

#### *Concentrado de FvW de muy alta pureza y pobre en FVIII*

Es un concentrado de FvW de pureza muy alta, prácticamente no contiene FVIII. Tras su infusión en pacientes con EvW tipo 3<sup>33</sup> se produce un incremento inmediato del FvW, mientras que el FVIII plasmático va aumentando progresivamente, a expensas del endógeno, con un pico a las 12, o incluso a las 24 h. El aumento de FvW plasmático por unidad de FvW infundido suele ser 2,5 U/dl. Debido al bajo contenido en FVIII de este concentrado en ocasiones es necesario para el tratamiento de episodios agudos o para cirugía de urgencia administrar conjuntamente una única dosis de concentrados de FVIII puro para asegurar una corrección inmediata del nivel de FVIII plasmático. No se precisan dosis ulteriores de este último concentrado ya que el FvW infundido desencadena la síntesis endógena con la normalización del FVIII a las 6-8 h.

Recientemente se plantea como una posible ventaja la de no inducir las elevaciones tan supranormales del FVIII que acontecen con la administración de concentrados de FVIII y FvW. Estos incrementos podrían propiciar complicaciones trombóticas dado que los niveles elevados de forma mantenida del FVIII constituyen un factor de riesgo trombótico<sup>34-36</sup>. A este respecto hay que señalar que si bien se han descrito complicaciones trombóticas durante el tratamiento sustitutivo de la EvW son más bien excepcionales y generalmente asociadas a otros factores de riesgo pro-trombótico, tal como la cirugía ortopédica<sup>37</sup>.

*Profilaxis antitrombótica.* Un aspecto todavía controvertido lo constituye la profilaxis antitrombótica en pacientes con EvW que reciben tratamiento sustitutivo

en situaciones de riesgo trombótico (cirugía, entre otras). Algunos investigadores consideran que sólo debe aplicarse en el caso de asegurar valores estables de FVIII y de FvW. Por el contrario otros no aconsejan la profilaxis al no existir evidencia científica a este respecto.

#### *Concentrados de plaquetas normales*

El FvW plaquetario parece tener cierto papel en la hemostasia. De ahí que en algunos pacientes, aunque se consiga que los valores de FvW y FVIII sean normales, el sangrado no cesa y el TH continúa prolongado. En estos casos, si la hemorragia es grave, estaría indicada la transfusión de concentrados de plaquetas, para lo cual, primero debe intentarse normalizar los valores de FvW plasmático, aunque se ha observado un efecto hemostático con valores de 15 U/dl<sup>38</sup>. Se debería evitar su administración en otras situaciones menos graves, ya que hay que tener en cuenta que no están inactivadas, así como la posibilidad de aloinmunización del paciente. La dosis es la misma que para las trombopenias centrales ( $4-5 \times 10^{11}$  plaquetas).

#### *Concentrado de factor VIIa recombinante (Vllar)*

En la EvW se ha utilizado con eficacia ocasionalmente en la EvW tipo 3 con anticuerpos anafilactoides, hemorragia cerebral o por motivos religiosos, por su coste elevado<sup>39-42</sup>. Se empleó con motivo de cirugía maxilar en dos miembros de una misma familia con EvW tipo 3 y aloanticuerpos. Las dosis empleadas fueron 90-150 µg/kg (4,5-7,5 kU/kg) justo antes de cirugía seguido de 90-200 µg/kg (4,5-10 kU/kg) cada 2-3h, durante las 24-48 h siguientes. En uno de los pacientes se presentó sangrado, lo que llevó a incrementar la dosis hasta 200 µg/kg. El Vllar también ha sido utilizado en un paciente con EvW tipo 3 que desarrolló una hemofilia adquirida. Dados los buenos resultados en estos tipos de pacientes, cabe plantearse si no podría ser de utilidad en aquellos pacientes que continúan sangrando a pesar de buenos valores de FVIII y FvW, como siguiente alternativa, antes de usar concentrados de plaquetas (habría que solicitarlo como uso compasivo).

#### **Intercambio plasmático, plasmaféresis e inmunoadsorción**

Un efecto secundario del tratamiento sustitutivo es la aparición de aloanticuerpos anti FvW en una proporción de enfermos con EvW tipo 3, de modo similar a como ocurre en la hemofilia A. Estos anticuerpos inhiben fuertemente la actividad cofactor de la ristocetina y tienen muy poca o ausencia de actividad frente al FVIII. Deben sospecharse en el caso de disminución o ausencia de respuesta al tratamiento sustitutivo. En su presencia pueden llegar a producirse reacciones anafilactoides graves si se infunden concentrados con FvW<sup>39-41</sup>. En ocasiones, la corrección del FVIII con concentrados de FVIII es suficiente para

detener las hemorragias de partes blandas aunque no se normalice el TH. También se ha visto un efecto beneficioso de la DDAVP en algunas situaciones. En hemorragias graves que no responden a la infusión de concentrados plasmáticos, puede ser necesario someter al paciente a procedimientos de intercambio plasmático, o inmunoadsorción a columnas de proteína A para reducir el título de anticuerpo.

**Perspectivas futuras del tratamiento de la EvW**

**Concentrado de FvW recombinante (FvWr)**

En 1995 se presentaron los primeros datos de producción en gran escala de un concentrado de FvWr empleando células ováricas de hámster<sup>43</sup>. Estos prometedores trabajos continúan en la actualidad en fase de ensayo preclínico. En animales muestra una recuperación y vida media superiores a las obtenidas con derivado plasmático. El FvWr así producido no se encuentra proteolizado, promueve la agregación plaquetaria inducida por ristocetina, y otras funciones del FvW, reduciendo la hemorragia en animales tras su administración. Comparado con el FvW plasmático muestra una vida media más prolongada lo que aumentaría su efecto terapéutico en la EvW.

**Trasplante hepático**

Se está realizando con éxito en pacientes afectados de hemofilia A que presentan hepatopatías graves, corrigiendo la deficiencia del FVIII. Hay algún caso descrito en EvW grave motivado por hepatopatía avanza-

da, no lográndose una restauración relevante del FvW en plasma, aunque sí del FVIII sin llegar a normalizarse<sup>44</sup>. Este hecho parece demostrar que el hígado sólo produce una pequeña proporción del pool plasmático de FvW, insuficiente para corregir el defecto de hemostasia primaria en la EvW grave. Son precisos más datos para corroborar estas observaciones.

**Terapia génica**

Podría ser de interés en aquellas formas que cursan clínicamente de forma severa y que precisan de múltiples transfusiones a lo largo de la vida, situación poco frecuente en la EvW. Por ello esta última no parece una buena candidata a la hora de adscribirse una alta prioridad en lo concerniente a la terapia génica. Es muy previsible que su posible éxito siga los pasos de los avances que se vayan logrando en otros campos, y especialmente, en el de la hemofilia.

**Trasplante experimental**

Se han llevado a cabo trasplantes hepáticos ortotópicos o de médula ósea en cerdos con EvW grave<sup>45</sup>. En el trasplante hepático, se observa aumento del FvW y del FVIII, probablemente por la producción de las nuevas células endoteliales del hígado. Tras el trasplante de médula ósea el efecto es más limitado, probablemente por limitarse a mejorar sólo el compartimiento megacariocítico-plaquetario.

**Conclusiones. Algoritmo terapéutico**

Como conclusión final se propone un algoritmo terapéutico en la EvW (fig. 4).

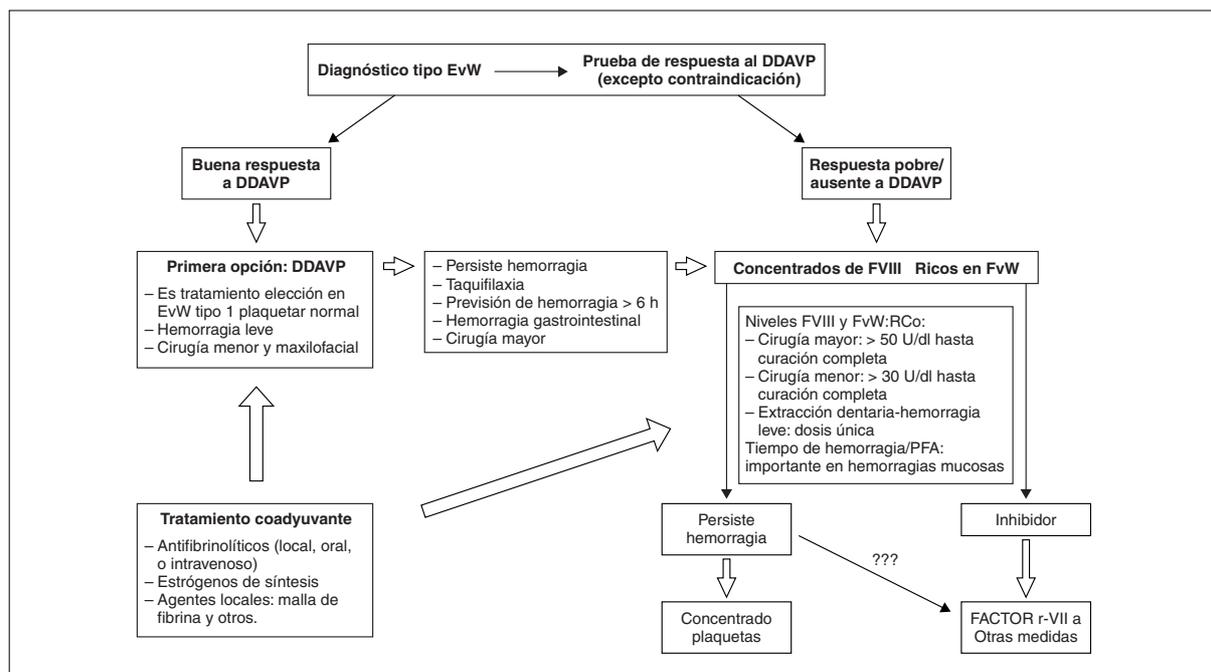


Figura 4. Algoritmo terapéutico de la enfermedad de von Willebrand.

1. Es importante señalar que los diferentes recursos terapéuticos no son incompatibles entre sí y, muchas veces, es necesario utilizarlos conjuntamente.

2. Es muy importante realizar la prueba de respuesta a la DDAVP en el momento del diagnóstico.

3. La DDAVP debe ser el tratamiento de primera elección en pacientes con buena respuesta, con sangrado leve o cirugía menor. Es más discutible su utilidad en cirugía mayor, aunque se ha logrado con éxito en algunos casos. Debe administrarse justo antes de la intervención (al llegar a quirófano), y si es preciso, una segunda a las 12 h. En el caso de necesitar prorrogar el tratamiento se deberá administrar cada 24-48 h, para evitar la taquifilaxia.

4. En general, de persistir sangrado, es muy importante, en primer lugar, descartar causas locales o quirúrgicas.

5. Si no hay respuesta a la DDAVP o persiste el sangrado, se deben administrar concentrados de FVIII ricos en FvW.

6. Se desconoce cuál es el mejor parámetro para medir la eficacia de la respuesta. Según algunos autores podría ser suficiente cuantificar el VIII:C, y para otros, también es necesario el FvWR:Co. El TH podría ser de utilidad en hemorragias mucosas, o si persiste el sangrado.

7. En pacientes, especialmente del tipo 3, en los que se observe una disminución o falta de respuesta al tratamiento sustitutivo es imprescindible investigar el posible desarrollo de aloanticuerpos frente al FvW.

8. En algunos casos, ante hemorragia grave a pesar de buenos valores de FVIII y FvW, parece ser de utilidad administrar concentrados de plaquetas, o, pendiente de nuevos estudios, podría considerarse la posibilidad del uso compasivo de Vllar.

#### Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado parcialmente merced a la Ayuda de Investigación FIS #00-01/0951 y FIS #PI03/0408 y ayudas de Wyeth Farma y Bayer.

#### Bibliografía

- Sadler JE. A revised classification of von Willebrand disease. For the Subcommittee on von Willebrand Factor of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemostasis* 1994;71:520-3.
- Sadler JE. Von Willebrand disease type 1: a diagnosis in search of a disease. *Blood* 2003;101:2089-93.
- Federici AB, Castaman G, Mannucci PM. Guidelines for the diagnosis and management of von Willebrand disease in Italy. Italian Association of Hemophilia Center (AICE). *Haemophilia* 2002;8:607-21.
- Battle J, Noya MS, Giangrande P, López-Fernández MF. Advances in the therapy of von Willebrand disease. *Haemophilia* 2002;8:301-7.
- Noya MS, Battle J. Tratamiento de la enfermedad de von Willebrand. En: Battle J, Rocha E, editores. *Guía Práctica de Coagulopatías Congénitas*. Madrid: Ediciones Acción Médica, 2001; p. 181-204.
- Mannucci PM. How I treat patients with von Willebrand disease. *Blood* 2001;97:1915-9.
- Castaman G, Federici AB, Rodeghiero F, Mannucci PM. Von Willebrand's disease in the year 2003: towards the complete identification of gene defects for correct diagnosis and treatment. *Haematologica* 2003;88:94-108.
- Rodeghiero F, Castaman G, Di Bona E, Ruggeri M. Consistency of responses to repeated DDAVP infusions in patients with von Willebrand's disease and hemophilia A. *Blood* 1989;74:1997-2000.
- Fressinaud E, Veyradier A, Truchaud F, Martin I, Boyer-Neumann C, Trossaert M, et al. Screening for von Willebrand disease with a new analyzer using high shear stress: a study of 60 cases. *Blood* 1998;91:1325-31.
- Cattaneo M, Federici AB, Lecchi A, Agati B, Lombardi R, Stabile F, et al. Evaluation of the PFA-100 system in the diagnosis and therapeutic monitoring of patients with von Willebrand disease. *Thromb Haemostasis* 1999;82:35-9.
- Favaloro EJ. Collagen binding assay for von Willebrand factor (VWF:CBA): detection of von Willebrand's Disease (VWD), and discrimination of VWD subtypes, depends on collagen source. *Thromb Haemostasis* 2000;83:127-35.
- Federici AB, Mazurier C, Berntorp E, Lee CA, Scharrer I, Goudemand J, et al. Biologic response to desmopressin in patients with severe type 1 and type 2 von Willebrand disease: Results of a multicenter European study. *Blood* 2004;103:2032-8.
- Mannucci PM, Bettega D, Cattaneo M. Patterns of development of tachyphylaxis in patients with haemophilia and von Willebrand disease after repeated doses of desmopressin (DDAVP). *Br J Haematol* 1992;82:87-93.
- Smith TJ, Gill JC, Ambruso DR, Hathaway WE. Hyponatremia and seizures in young children given DDAVP. *Am J Hematol* 1989;31:199-202.
- Bond L, Bevan D. Myocardial infarction in a patient with hemophilia treated with DDAVP. *N Engl J Med* 1988;318:121.
- Byrnes JJ, Larcada A, Moake JL. Thrombosis following desmopressin for uremic bleeding. *Am J Hematol* 1988;28:63-5.
- López Fernández MF, Blanco López MJ, Castiñeira MP, Battle J. Further evidence for recessive inheritance of von Willebrand disease with abnormal binding of von Willebrand factor to factor VIII. *Am J Hematol* 1992;40:20-7.
- Mazurier C, Gaucher C, Jorieux S, Goudemand M. Biological effect of desmopressin in eight patients with type 2N ('Normandy') von Willebrand disease. Collaborative Group. *Br J Haematol* 1994;88:849-54.
- Holmberg L, Nilsson IM, Borge L, Gunnarsson M, Sjörin E. Platelet aggregation induced by 1-desamino-8-D-arginine vasopressin (DDAVP) in Type IIB von Willebrand's disease. *N Engl J Med* 1983;309:816-21.
- Castaman G, Rodeghiero F. Desmopressin and type II B von Willebrand disease. *Haemophilia* 1996;2:73-6.
- Castaman G, Eikenboom JC, Rodeghiero F, Briet E, Reitsma PH. A novel candidate mutation (Arg 611 > His) in type 1 «platelet discordant» von Willebrand's disease with desmopressin-induced thrombocytopenia. *Br J Haematol* 1995;89:656-9.
- Rendal E, Penas N, Larrabeiti B, Pérez A, Vale A, López Fernández MF, et al. Type 2B von Willebrand disease due to mutation VAL1316. Heterogeneity in the same sibship. *Ann Hematol* 2001;80:354-60.
- Cattaneo M, Moia M, Delle Valle P, Castellana P, Mannucci PM. DDAVP shortens the prolonged bleeding times of patients with severe von Willebrand disease treated with cryoprecipitate. Evidence for a mechanism of action independent of released von Willebrand factor. *Blood* 1989;74:1972-5.
- Castaman G, Lattuada A, Mannucci PM, Rodeghiero F. Factor VIII:C increases after desmopressin in a subgroup of patients with autosomal recessive severe von Willebrand disease. *Br J Haematol* 1995;89:147-51.
- Aznar JA, Bonanad S, Montoro JM, Hurtado C, Cid AR, Soler MA, De Miguel A. Influence of methylene blue photoinactivation treatment on coagulation factors from fresh frozen plasma, cryoprecipitates and cryosupernatants. *Vox Sang* 2000;79:156-60.
- Meriane F, Zerhouni L, Djeha N, Meriane F, Zerhouni L, Djeha N. Biological effects of a S/D-treated, very high purity, von Willebrand factor concentrate in five patients with severe von Willebrand disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1993;4:1023-9.
- Berntorp E, Nilsson IM. Use of a high-purity factor VIII concentrate (Hemate P) in von Willebrand's disease. *Vox Sang* 1989;56:212-7.
- Hanna WT, Bona RD, Zimmerman CE, Carta CA, Hebert GZ, Rickles FR, et al. The use of intermediate and high purity factor VIII products in the treatment of von Willebrand disease. *Thromb Haemostasis* 1994;71:173-9.
- Kreuz W, Mentzer D, Becker S, Scharrer I, Kornhuber B. Hemate P in children with von Willebrand's disease. *Haemostasis* 1994;24:304-10.
- Mannucci PM, Chediak J, Hanna W, Byrnes J, Ledford M, Ewenstein BM, et al. Treatment of von Willebrand disease with a high-purity factor VIII/von Willebrand factor concentrate: A prospective, multicenter study. *Blood* 2002;99:450-6.
- Mannucci PM, Tenconi PM, Castaman G, Rodeghiero F. Comparison of four virus-inactivated plasma concentrates for treatment of severe von Willebrand disease: a cross-over randomized trial. *Blood* 1992;79:3130-7.
- Montoro JB, Altisent C, Pineda A, Rodríguez S, Tusell J. Continuous infusion of factor VIII concentrate to a patient with severe von Willebrand disease. *Transfusion* 1993;33:443.
- Goudemand J, Negrier C, Ounnoughene N, Sultan Y. Clinical management of patients with von Willebrand's disease with a VHP VWF concentrate: the French experience. *Haemophilia* 1998;4(Suppl 3):48-52.
- Koster T, Blann AD, Briet E, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis. *Lancet* 1995;345:152-5.

35. Kraaijenhagen RA, Anker PS, Koopman MM, Reitsma PH, Prins MH, Van den Ende A, et al. High plasma concentration of factor VIIIc is a major risk factor for venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2000;83:5-9.
36. Kyrle PA, Minar E, Hirschl M, Bialonczyk C, Stain M, Schneider B, et al. High plasma levels of factor VIII and the risk of recurrent venous thromboembolism. *N Engl J Med* 2000;343:457-62.
37. Mannucci PM. Venous thromboembolism in von Willebrand disease. *Thromb Haemost* 2002;88:378-9.
38. Castillo R, Monteagudo J, Escolar G, Ordinas A, Magallon M, Martin Villar J. Hemostatic effect of normal platelet transfusion in severe von Willebrand disease patients. *Blood* 1991;77:1901-5.
39. Mannucci PM, Ruggeri ZM, Ciavarella N, Kazatchkine MD, Mowbray JF. Precipitating antibodies to factor VIII/von Willebrand factor in von Willebrand's disease: Effects on replacement therapy. *Blood* 1981;57:25-31.
40. Mannucci PM, Tamaro G, Narchi G, Candotti G, Federici A, Altieri D, et al. Life-threatening reaction to factor VIII concentrate in a patient with severe von Willebrand disease and alloantibodies to von Willebrand factor. *Eur J Haematol* 1987;39:467-70.
41. Bergamaschini L, Mannucci PM, Federici AB, Coppola R, Guzzoni S, Agostoni A. Posttransfusion anaphylactic reactions in a patient with severe von Willebrand disease: Role of complement and alloantibodies to von Willebrand factor. *J Lab Clin Med* 1995;125:348-28.
42. Ciavarella N, Schiavoni M, Valenzano E, Mangini F, Inchingolo F. Use of recombinant Factor VIIa (NovoSeven) in the treatment of two patients with type III von Willebrand disease and an inhibitor against von Willebrand factor. *Haemostasis* 1996;26(Suppl 1):150-4.
43. Schwarz HP, Turecek PL, Pichler L, Mitterer A, Mundt W, Dorner F, et al. Recombinant von Willebrand factor. *Thromb Haemostas* 1997;78:571-6.
44. Manucci PM, Federici A, Cattaneo M, Fassati R, Galmarini D. Liver transplantation in severe von Willebrand disease. *Lancet* 1991;337:1105.
45. Roussi J, Samama CM, Vaiman M, Nichols TC, Pignaud G, Bonneau ME, et al. An experimental model for testing von Willebrand factor function: Successful SLA-matched crossed bone marrow transplantations between normal and von Willebrand pigs. *Experimental Hematology* 1996;24:585-91.

# EL SISTEMA MULTIFUNCIONAL DE LA PROTEÍNA C

F. ESPAÑA FURIÓ<sup>a</sup>, P. MEDINA BADENES<sup>a</sup>, S. NAVARRO ROSALES<sup>a</sup>, A. ESTELLÉS CORTÉS<sup>a</sup> Y J. AZNAR LUCEA<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Centro de Investigación y <sup>b</sup>Departamento de Biopatología Clínica. Hospital Universitario La Fe. Valencia.

## Introducción

El sistema de la proteína C desempeña un papel esencial en la regulación del proceso de la coagulación sanguínea. La activación de la proteína C por el complejo trombina-trombomodulina, amplificada por el receptor endotelial de la proteína C (EPCR), conduce a la inactivación de los cofactores de la coagulación activados Va y VIIIa, que son esenciales para mantener la formación de trombina. Disfunciones de los componentes de la vía de la proteína C, tales como deficiencias totales de proteína C o proteína S, dan origen a graves cuadros trombóticos.

Sin embargo, el sistema de la proteína C también participa en otras funciones biológicas importantes. Así pues, algunos componentes del sistema muestran propiedades antiinflamatorias, antiapoptóticas, profibrinolíticas y neuroprotectoras. Esta revisión describirá los mecanismos por los cuales el sistema de la proteína C exhibe estas importantes funciones biológicas.

## Propiedades anticoagulantes de la proteína C

La vía anticoagulante de la proteína C funciona como un inhibidor de la coagulación a demanda. La vía se inicia cuando la trombina, formada durante el proceso de la coagulación, se une a la trombomodulina sobre la superficie endotelial (fig. 1). Esta unión bloquea las actividades procoagulantes de la trombina dependientes de su región exosite I, mientras que estimula sus propiedades anticoagulantes, al activar a la proteína C<sup>1</sup>. La activación de la proteína C por el complejo trombina-trombomodulina es potenciada mediante la localización de la proteína C sobre la superficie del endotelio a través de la unión a su receptor específico, el EPCR. Tanto la proteína C como la proteína C activada (APC) pueden unirse al EPCR con similar afinidad. La APC unida a la forma soluble del EPCR no tiene propiedades anticoagulantes, lo cual puede ser debido a la capacidad del EPCR soluble de bloquear la unión de la APC a la superficie fosfolipídica, así como a un cambio de especificidad de la molécula de APC. Ello sugiere que la APC debe disociarse del EPCR para poder exhibir su función anticoagulante. Una vez tiene lugar esta disociación, la APC se une a la proteína S sobre la superficie de la célula endotelial o de la

membrana plaquetaria, e inactiva proteolíticamente a los cofactores de la coagulación Va y VIIIa. Estos cofactores activados son esenciales en la activación de la protrombina por el factor Xa y en la activación del factor X por el factor IXa, respectivamente, por lo que su inactivación reduce o elimina drásticamente la generación de trombina. Cuando los cofactores Va y VIIIa están en complejo con sus respectivos factores Xa y IXa, son relativamente resistentes a su inactivación por la APC. Una de las funciones de la proteína S es bloquear, al menos parcialmente, la protección de estas enzimas<sup>2</sup>.

Por lo general, las enzimas proteolíticas generadas en la circulación sanguínea tienen una vida media de unos pocos segundos. Una excepción es la APC, cuya vida media es de unos 10 min<sup>3</sup>. Los principales inhibidores de la APC son el inhibidor de la proteína C (PCI) y la  $\alpha_1$ -antitripsina ( $\alpha_1$ AT)<sup>4</sup>. La lenta inactivación de la APC permite a la enzima permanecer en la circulación durante un tiempo relativamente largo, dando tiempo a que pueda localizar a los complejos de la coagulación sobre las superficies celulares fosfolipídicas procoagulantes, donde los inactiva y controla de esta manera la propagación de la coagulación.

La trombomodulina se encuentra distribuida uniformemente en la superficie de la célula endotelial de todos los vasos, con unas 100.000 moléculas/célula endotelial, excepto en la microcirculación cerebral donde la concentración es más baja. Cuando el diámetro del vaso se estrecha, el área de la superficie vascular expuesta a la sangre circulante aumenta de manera exponencial desde menos de 3 a más de 3.000 cm<sup>2</sup>/ml de sangre. Por tanto, la concentración relativa de trombomodulina disminuye en los grandes vasos. Esto resultaría en una deficiente activación de la proteína C en los grandes vasos, sobre todo teniendo en cuenta que la afinidad entre la trombomodulina y la proteína C es débil. Por el contrario, el EPCR se localiza principalmente en el endotelio de las grandes arterias y venas y tiene una alta afinidad por la proteína C. Ello permite una efectiva localización de la proteína C sobre estas superficies y asegura una activación eficaz de la proteína C sobre la superficie de los grandes vasos.

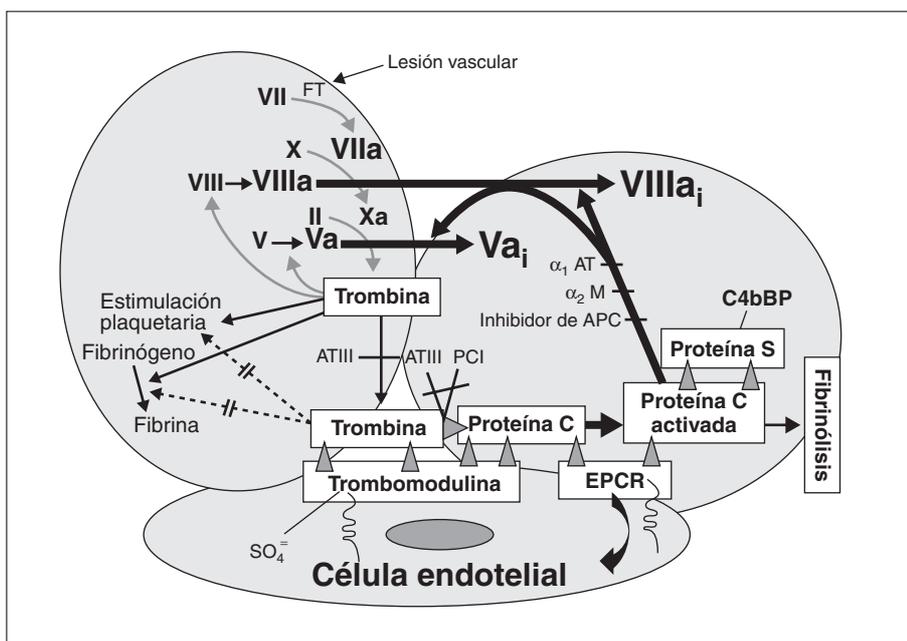


Figura 1. Sistema anticoagulante de la proteína C.

La importancia del sistema de la proteína C en la regulación de la coagulación vino de la descripción de deficiencias familiares de proteína C o proteína S asociadas con un aumento del riesgo de trombosis<sup>5</sup>, y de recién nacidos con deficiencia homocigota de proteína C, que presentaban trombosis masivas mortales si no se trataban inmediatamente<sup>6</sup>, los cuales necesitan, para sobrevivir, infusión de plasma fresco. Más adelante, una vez las lesiones producidas por las trombosis se han curado totalmente, estos individuos pueden, en la mayoría de los casos, hacer una vida relativamente normal con anticoagulación oral.

Uno de los principales factores genéticos de riesgo trombotico es la presencia de la mutación factor V Leiden<sup>7</sup>, consistente en una mutación puntual en el gen del factor V de la coagulación en el que una guanina en posición 1691 está sustituida por una adenina. La mutación produce un cambio en un aminoácido de la secuencia del factor V (Arg506-Gln), y está presente en el 1-5% de la población general. El factor Va es esencial para acelerar la coagulación, al actuar como cofactor del factor Xa en la activación de la protrombina. El papel de la proteína C, como hemos visto anteriormente, es la de regular la coagulación inactivando a los cofactores Va y VIIIa. La APC destruye la actividad del factor Va cortando por los enlaces Arg306, Arg506 y Arg679 (fig. 2), y de esta forma controlando la velocidad y extensión de la coagulación. El corte por Arg506 acelera el corte de las otras dos argininas. Cuando la Arg506 está sustituida por el ácido glutámico, como ocurre en la mutación factor V Leiden, la APC no puede cortar este enlace, y la velocidad de rotura de las otras dos argininas se reduce, por lo que la inac-

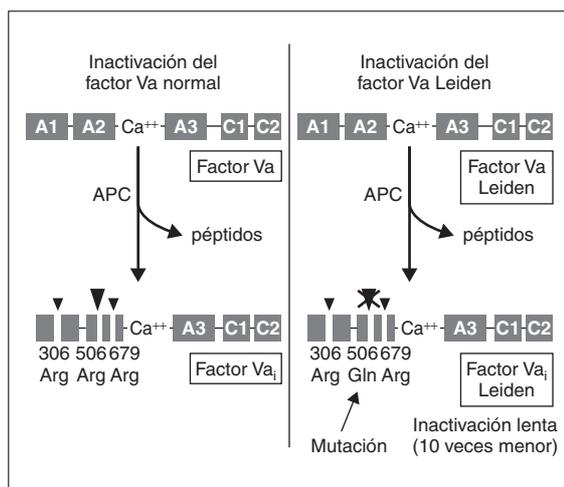


Figura 2. Inactivación del factor Va normal y factor Va Leiden por la proteína C activada (APC).

tivación del factor Va es mucho más lenta, y la coagulación no puede regularse en este punto existiendo, por tanto, una mayor tendencia a la trombosis en los individuos con esta anomalía genética.

En condiciones basales, existe un nivel detectable de APC circulante, como consecuencia de la continua activación de la coagulación, como lo prueba la detección de complejos APC:PCI y APC:α<sub>1</sub>AT *in vivo*<sup>3,8</sup>. Se ha descrito que niveles reducidos de APC circulante pueden ser un factor de riesgo de trombosis venosa<sup>9</sup> y de infarto de miocardio<sup>10</sup>.

Como hemos indicado anteriormente, la vía de la proteína C también parece regular otros procesos biológicos distintos a los de la coagulación.

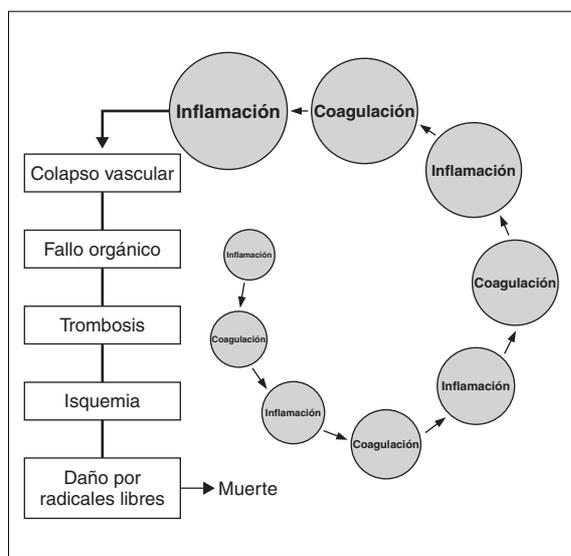


Figura 3. Interacción entre coagulación e inflamación. (Modificada de Esmon CT et al<sup>11</sup>.)

### Sistema de la proteína C e inflamación

La activación celular desempeña un papel central en el desarrollo y control de la coagulación sanguínea, y esta activación celular constituye el principal nexo de unión entre inflamación, coagulación y daño vascular.

Actualmente existen múltiples evidencias que demuestran que la inflamación favorece el proceso de coagulación mediante una variedad de mecanismos celulares. La trombina, generada durante el proceso de la coagulación, estimula a su vez la inflamación. En ausencia de un mecanismo de control adecuado, ello conduciría a un círculo vicioso que se autopropagaría y conduciría a la muerte inevitable<sup>11</sup>. La figura 3 ilustra estas observaciones. Es evidente que deben existir mecanismos que impidan este lazo de autoamplificación. En los últimos años se han acumulado datos que sugieren que la vía de la proteína C puede proporcionar uno de estos mecanismos<sup>12</sup>. Normalmente, en condiciones fisiológicas, el árbol vascular proporciona una potente actividad anticoagulante, mientras que la actividad procoagulante es mínima. Sin embargo, la inflamación altera este balance, reduciendo la actividad anticoagulante e incrementando la estimulación de reacciones procoagulantes. Un claro ejemplo lo tenemos durante el shock séptico inducido por infección con gramnegativos. La infección provoca una reducción de los mecanismos anticoagulantes, al reducir el número de moléculas de trombomodulina y EPCR sobre el endotelio y aumentar los procoagulantes, de tal forma que el proceso de coagulación puede proceder de manera generalizada e incontrolada, con consumo del fibrinógeno, un proceso denominado coagulación intravascular diseminada.

La figura 4 muestra un modelo de los procesos modulados por la inflamación, con especial énfasis en el sistema de la proteína C<sup>12,13</sup>. Las citoquinas son proteínas de peso molecular menor de 80.000, producidas y segregadas por varios tipos de células en respuesta a diversas infecciones y estímulos inmunológicos, y pueden ejercer una gran variedad de efectos biológicos a muy baja concentración. Así, las citoquinas liberadas tras la inflamación, como la interleucina (IL)-1 $\beta$  y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), pueden estimular la expresión de moléculas adhesivas de leucocitos sobre la superficie del endotelio, las cuales inducen la adhesión de los monocitos. Estos monocitos adheridos al endotelio pueden sintetizar más TNF- $\alpha$ , el cual reduce la expresión del receptor de la trombina (trombomodulina) y del EPCR. Por su parte, los neutrófilos adheridos pueden también disminuir la expresión de trombomodulina, al segregar elastasa, una enzima que degrada a la trombomodulina y libera un fragmento soluble a la circulación, el cual tiene mucha menor actividad anticoagulante que el receptor nativo unido a la membrana de la célula endotelial. La activación de neutrófilos también puede inducir la producción y liberación de oxidantes, los cuales pueden disminuir la actividad de la trombomodulina al oxidar un residuo de metionina sensible. Además, los mediadores de la inflamación también pueden elevar los niveles de C4bBP, lo cual puede disminuir el nivel circulante de proteína S libre.

Por otra parte, la inflamación puede estimular el inicio de la cascada de la coagulación y su propagación. Los monocitos activados pueden exponer factor tisular en su superficie, el cual une factor VII/factor VIIa e inicia la cascada de la coagulación y la activación plaquetaria. Alternativamente, las selectinas expresadas por las plaquetas activadas pueden servir de puentes de unión entre las plaquetas y los neutrófilos y monocitos. Estas plaquetas activadas pueden servir de soporte a las reacciones de coagulación debido a los fosfolípidos negativos expuestos sobre su superficie, a los que se unen los factores de la coagulación y sus cofactores activos. Finalmente, durante la sepsis, los pacientes experimentan una disminución de sus niveles de proteína C, posiblemente debido a su activación seguida de su inhibición por inhibidores proteásicos y eliminación de los complejos formados.

A su vez, la coagulación sanguínea no solamente conduce a la activación plaquetaria y formación de fibrina, sino que también induce la activación de la célula endotelial, que a su vez contribuye a la activación de leucocitos, estimulando la inflamación. Así pues, los trombos venosos contienen gran cantidad de leucocitos activados, y los leucocitos y plaquetas activadas pueden formar agregados a través de la p-selectina expresada sobre las plaquetas activadas.

La primera evidencia directa de la interrelación entre el sistema de la proteína C y la inflamación vino

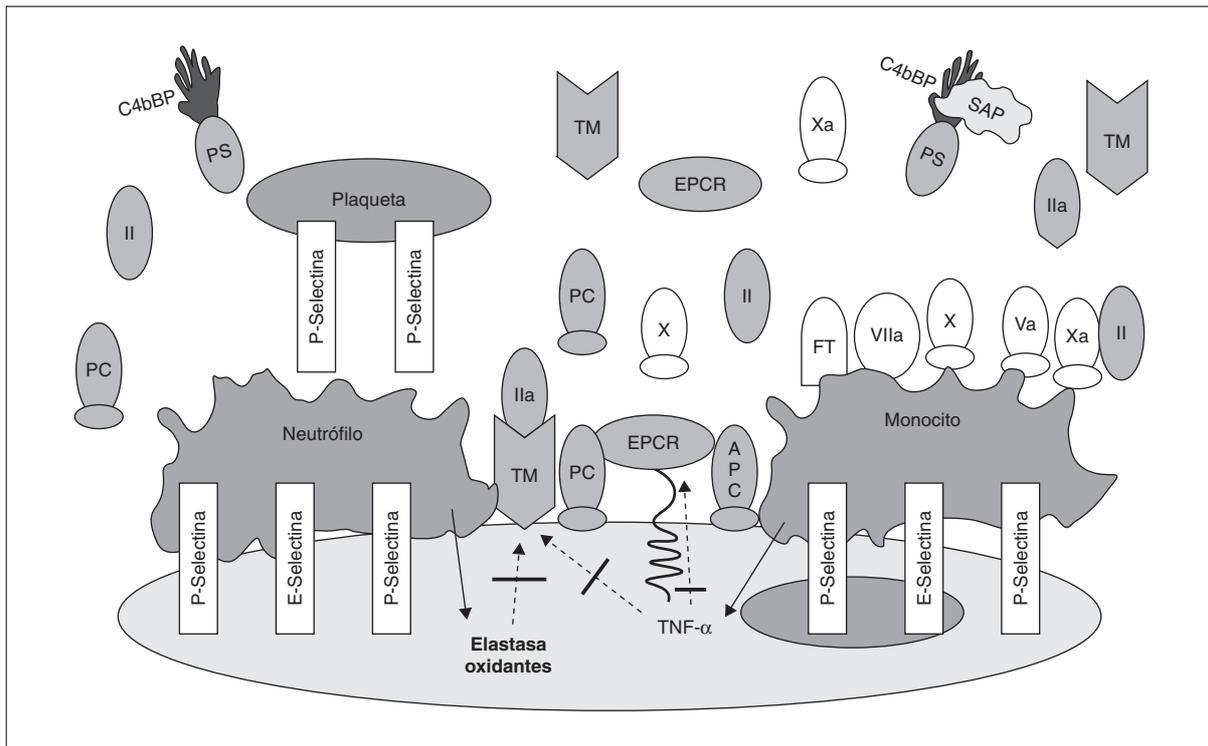


Figura 4. Influencia de la inflamación sobre la coagulación y el sistema de la proteína C. La inflamación induce la unión de neutrófilos y monocitos al endotelio, vía receptores de adhesión inducibles, incluyendo las selectinas. Los monocitos expresan factor tisular (FT) y unen factor VIIa para iniciar la coagulación. Las plaquetas activadas pueden unirse a neutrófilos adherentes vía selectinas, proporcionando una superficie adecuada sobre la cual puede propagarse la coagulación. Los monocitos activados liberan citoquinas que regulan a la baja la síntesis de trombosmodulina (TM) y de receptor endotelial de la proteína C (EPCR). Proteasas liberadas por neutrófilos pueden degradar la TM de la pared del vaso, aumentando el nivel de TM soluble, con menor actividad anticoagulante. La inflamación reduce el nivel de proteína S (PS) libre en la circulación, y la mayor parte de ésta está unida al C4bBP, sin actividad anticoagulante. (Modificada de Esmon CT y Fukudome K<sup>12</sup>.)

de los estudios de infusión de APC en mandriles. La APC protegía a los animales de los efectos letales por infusión de *Escherichia coli*<sup>14</sup>, y este efecto era dependiente de la presencia de proteína S<sup>15</sup> y de EPCR<sup>16</sup>, puesto que al bloquear estas proteínas con anticuerpos específicos aumentaban considerablemente las respuestas coagulante e inflamatoria dependientes de citoquinas tras infusión de concentraciones subletales de endotoxina, que se transformaban en letales. Dependiendo del modelo usado, los niveles de IL-6, IL-8 y/o TNF- $\alpha$  estaban elevados al bloquear la vía de la proteína C. Además, la APC también es capaz de bloquear la producción de TNF- $\alpha$  en un modelo de sepsis en roedores, tanto en la circulación como en los tejidos, de inhibir la adhesión de leucocitos y de proteger frente a un descenso de la presión sanguínea inducida por endotoxinas (para una revisión más completa, ver refs. 13 y 17).

A partir de estos estudios se pudo establecer el concepto de que la lesión vascular inicia el proceso de coagulación y la generación de trombina, la cual activa a la proteína C. La APC, a continuación, actúa como un anticoagulante e inhibe la respuesta al

shock séptico. Es evidente que la activación de esta vía anticoagulante natural es esencial en la defensa frente a una infección, puesto que el bloqueo de su activación mediante diversos mecanismos provoca un dramático aumento de la respuesta al shock. Además, puesto que la inhibición de la proteína S<sup>15</sup> o del EPCR<sup>16</sup> parecía exacerbar la respuesta del animal a niveles bajos de endotoxina, ello sugería que ambas proteínas participaban en el mecanismo por el cual la APC regula la respuesta mediada por citoquinas.

Hancock et al<sup>18</sup> han encontrado un sitio de unión para la APC en monocitos. La unión de la APC a este sitio parece que bloquea el flujo de calcio intracelular y otros procesos celulares. La inhibición es dependiente de la presencia de proteína S, consistente con los resultados *in vivo*. Posteriormente, White et al<sup>19</sup> demostraron que la APC es capaz de bloquear la translocación nuclear de un factor nuclear, el NF $\kappa$ B, inducida por endotoxina. Puesto que el NF $\kappa$ B es esencial para la respuesta inflamatoria, al inducir el aumento de moléculas adhesivas y citoquinas inflamatorias, la capacidad de la APC para bloquear este proceso podría explicar la inhibición de la produc-

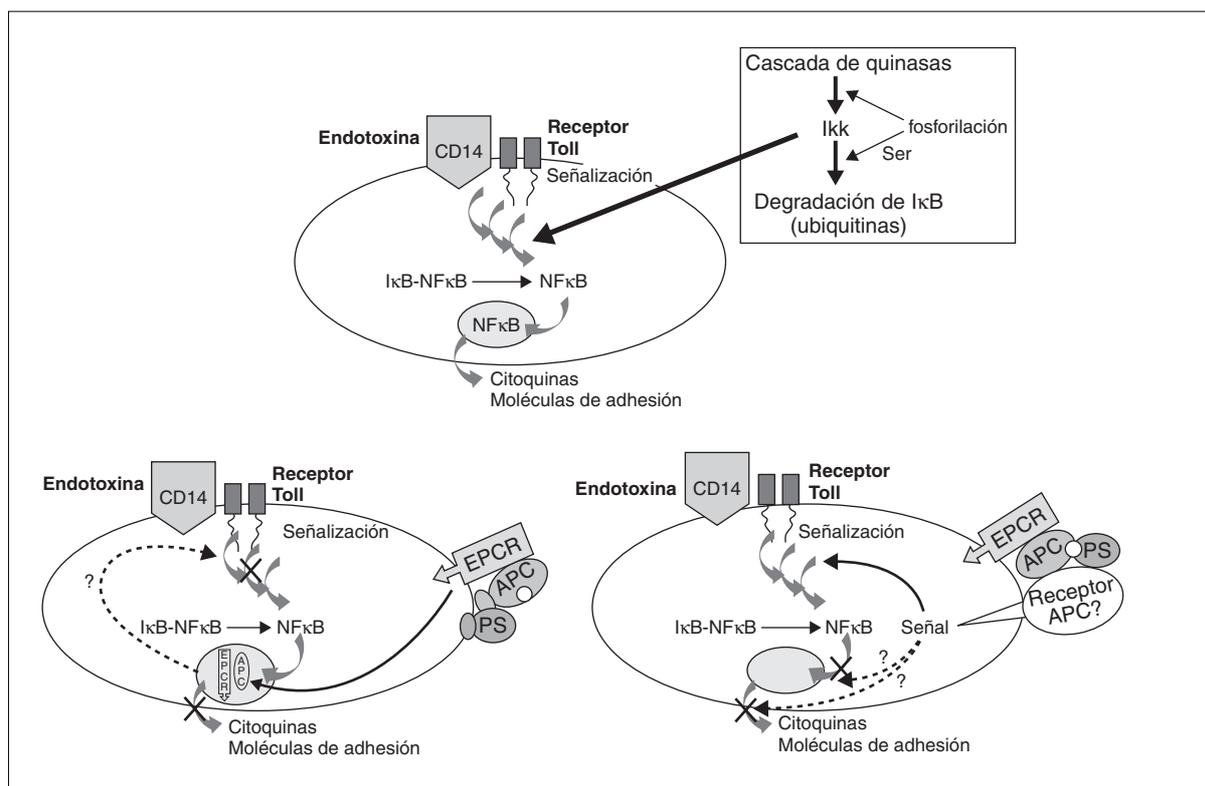


Figura 5. Posibles mecanismos por los cuales el sistema de la proteína C inhibe la inflamación. (Modificada de Esmon CT<sup>13</sup>.)

ción de TNF y reducción de la activación de leucocitos observados durante la administración de APC en babuinos tratados con *E. coli*. Aunque los autores no pudieron descubrir la naturaleza del receptor de la APC en monocitos, Xu et al<sup>20</sup> demostraron que el EPCR es capaz de translocarse al núcleo de monocitos activados y de transportar consigo a la APC. Juntando todos estos datos y aquellos aportados en estudios de animales de experimentación, la figura 5 muestra un modelo por el cual el sistema de la proteína C puede ejercer las funciones antiinflamatorias observadas *in vivo*<sup>13</sup>. La endotoxina se une al receptor CD14 en la superficie del monocito, activando un mecanismo de señalización a través de un receptor tipo Toll, lo que genera una cascada enzimática compuesta de quinasas que conduce finalmente a la activación del último complejo quinasa, el Ikk. Este complejo quinasa cataliza la fosforilación de dos serinas conservadas en el N-terminal del inhibidor IκB, el cual es entonces degradado por la vía de la ubiquitina. En la mayoría de las células, incluyendo los monocitos, el NFκB se encuentra en forma inactiva formando complejo con el inhibidor IκB. Al degradarse el IκB, el NFκB queda funcionalmente activo y sufre una translocación al núcleo, donde es capaz de inducir la expresión de moléculas adhesivas y citoquinas, típicas de la respuesta inflamatoria.

En este modelo, la APC es transportada por su receptor, el EPCR, a la superficie del monocito, y allí se une a un receptor. Este receptor se activaría y enviaría señales para reducir el flujo de calcio intracelular y para inhibir la translocación del NFκB al núcleo, reduciendo o inhibiendo la producción de citoquinas y de moléculas adhesivas tal como se observa en estudios *in vivo* en modelos animales. Alternativamente, el EPCR, que es capaz de sufrir translocación al núcleo, transportaría a la APC al núcleo, donde el complejo APC-EPCR podría modular el perfil de expresión génica reduciendo la capacidad de la célula para facilitar la respuesta inflamatoria.

Por otra parte, la trombomodulina también parece ejercer una importante actividad antiinflamatoria. Así, la trombomodulina inhibe la adhesión de leucocitos al endotelio activado de ratón, una función dependiente su dominio tipo lectina<sup>21</sup>, y de esta manera protege al ratón del daño tisular mediado por los neutrófilos.

#### Otras funciones de la proteína C activada

Recientemente se ha descrito que, a nivel celular, la APC es capaz de inhibir la apoptosis inducida por staurosporina<sup>22</sup>, un análogo del ATP que inhibe a la proteína quinasa C y es un potente inductor de la apoptosis. Esta actividad anti-apoptótica, junto con su actividad antiinflamatoria, puede ayudar a ex-

plicar la marcada capacidad de la APC para reducir un 19 % la mortalidad a 28 días en pacientes con sepsis grave<sup>23</sup>, ya que potentes agentes antitrombóticos como la antitrombina y el inhibidor del factor tisular han fallado en similares ensayos clínicos de fase III. La APC puede modular directamente la expresión génica de las células endoteliales de vena umbilical a través de sus efectos sobre los genes antiinflamatorios y de supervivencia celular<sup>22,24</sup>. Estos efectos requieren el concurso del receptor activado por proteasas tipo 1 (PAR-1) y del EPCR<sup>24</sup>. En un modelo de apoptosis inducida por staurosporina en células endoteliales tipo EaHy926 se ha visto que la inhibición de la apoptosis inducida por staurosporina debida a la APC también es dependiente del PAR-1 y del EPCR<sup>25</sup>. Este efecto de la APC abre nuevas vías de utilidad clínica de este antitrombótico natural. De hecho, en un modelo de isquemia cerebral en ratón, la APC mostró potentes efectos neuroprotectores<sup>26,27</sup>, facilitando la restauración del flujo sanguíneo cerebral y reduciendo el volumen del infarto cerebral<sup>27</sup>. Aunque no se conocen enteramente los mecanismos moleculares responsables del efecto neuroprotector de la APC, parece que este efecto se debe no solamente a sus propiedades antitrombóticas, sino también a su actividad anti-apoptótica, la cual puede proteger directamente a las células endoteliales de la apoptosis inducida por hipoxia<sup>28</sup>. Así, la APC protege las neuronas corticales del ratón de dos inductores de la apoptosis, el N-metil-D-aspartato (NMDA) y la staurosporina. En este modelo de ratón, la APC bloqueó diversas etapas de la apoptosis inducida por el NMDA más allá del óxido nítrico<sup>28</sup>: la activación de la caspasa-3, la translocación nuclear del factor inductor de apoptosis, y la inducción de p53. También previno la apoptosis inducida por staurosporina mediante el bloqueo de la activación de la caspasa-8. La infusión de APC intracerebral redujo, de una manera dosis dependiente, la excitotoxicidad del NMDA en ratones. La adición de diferentes anticuerpos anti-PAR y el uso de ratones en los que se eliminó el PAR-1, PAR-2 o PAR-3, mostró que este efecto protector neuronal directo de la APC, *in vitro* e *in vivo*, requiere PAR-1 y PAR-3.

## Conclusiones

Además de las propiedades anticoagulantes, el sistema de la proteína C ejerce interacciones celulares específicas que proporcionan actividades antiinflamatorias y anti-apoptóticas. Aunque se empiezan a conocer los mecanismos por los cuales el sistema de la proteína C exhibe estas actividades, todavía quedan algunos puntos oscuros que necesitan más investigación. Sin embargo, la implicación del sistema de la proteína C en diversas patologías sugiere que algunos de los componentes del mismo, especialmente la APC y la trombomodulina, pueden ser drogas con gran futuro en el tratamiento de diferentes enfermedades asociadas con la inflamación y la apoptosis.

## Bibliografía

1. Esmon CT. Regulation of blood coagulation. *Biochim Biophys Acta* 2000;1477:349-60.
2. Rega LM, Lamphear BJ, Huggins CF, Walker FJ, Fay PJ. Factor IXa protects factor VIIIa from activated protein C. *J Biol Chem* 1994;269:9445-52.
3. España F, Gruber AG, Heeb MJ, Hanson SR, Harker LA, Griffin JH. In vivo and in vitro complexes of activated protein C with two inhibitors in baboon. *Blood* 1991;77:1754-60.
4. Heeb MJ, España F, Griffin JH. Inhibition and complexation of activate protein C by two major inhibitors in plasma. *Blood* 1989;73:446-54.
5. Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP, Boulyjenkov V, et al. Inherited thrombophilia: Part 2. *Thromb Haemost* 1996;76:824-34.
6. Estellés A, García-Plaza I, Dasí A, Aznar J, Duart M, Sanz G, et al. Severe inherited "homozygous" protein C deficiency in a newborn infant. *Thromb Haemost* 1984;52:53-6.
7. Bertina R, Koeleman B, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, De Ronde H, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994;369:64-7.
8. Vicente V, España F, Taberner D, Estellés A, Aznar J, Hendl S, et al. Evidence of activation of the protein C pathway during acute vascular damage induced by Mediterranean spotted fever. *Blood* 1991;78:416-22.
9. España F, Vayá A, Mira Y, Medina P, Estellés A, Villa P, et al. Low level of circulating activated protein C is a risk factor for venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2001;86:1368-73.
10. España F, Zorio E, Medina P, Palencia MA, Estellés A, Osa A, et al. Low levels of circulating activated protein C are a risk factor for myocardial infarction. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002;32(Suppl 2):61.
11. Esmon CT, Fukudome K, Mather T, Bode W, Regan LM, Stearns-Kurosawa DJ, et al. Inflammation, sepsis, and coagulation. *Haematologica* 1999;84:254-9.
12. Esmon CT, Fukudome K. Cellular regulation of the protein C pathway. *Sem Cell Biol* 1995;6:259-68.
13. Esmon CT. Role of coagulation inhibitors in inflammation. *Thromb Haemost* 2001;86:51-6.
14. Taylor FB Jr, Stern DM, Navroth PP, Esmon CT, Hinshaw LB, Blick KE. Activated protein C prevents E. coli induced coagulopathy and shock in the primate. *Circulation* 1986;74:65a (abstr.).
15. Taylor FB Jr, Chang A, Ferrell G, Mather T, Catlett R, Blick K, et al. C4b-binding protein exacerbates the host response to *Escherichia coli*. *Blood* 1991;78:357-63.
16. Taylor FB Jr, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Ferrell G, Chang ACK, Laszik Z, et al. The endothelial cell protein C receptor aids in host defense against *Escherichia coli* sepsis. *Blood* 2000;95:1680-6.
17. Esmon CT. New mechanisms for vascular control of inflammation mediated by natural anticoagulant proteins. *J Exp Med* 2002;196:561-4.
18. Hancock WW, Grey ST, Hau L, Akalin E, Orthner C, Sayegh MH, et al. Binding of activated protein C to a specific receptor on human mononuclear phagocytes inhibits intracellular calcium signaling and monocyte dependent proliferative responses. *Transplantation* 1995;60:1525-32.
19. White B, Schmidt M, Murphy C, Livingstone W, O'Toole D, Lavler M, et al. Activated protein C inhibits lipopolysaccharide-induced nuclear translocation of nuclear factor kappaB (NF- $\kappa$ B) and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) production in the THP-1 monocytic cell line. *Br J Haematol* 2000;110:130-4.
20. Xu J, Esmon CT. Endothelial cell protein C receptor (EPCR) constitutively translocates into nucleus and also mediates activated protein C, but not protein C, nuclear translocation. *Thromb Haemost* 1999;Suppl 206a (abstr.).
21. Conway EM, Van de Wouwer S, Pollefeyt S, Jurk K, Van Aken H, Weitz JI, et al. The lectin-like domain of thrombomodulin confers protection from neutrophil-mediated tissue damage by suppressing adhesion molecule expression via nuclear factor  $\kappa$ B and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Exp Med* 2002;196:565-77.
22. Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, GeHolf B, Grinnell BW. Gene expression profile of antithrombotic protein C defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem* 2001;276:11199-203.
23. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhanaut JF, López-Rodríguez A, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001;344:698-709.
24. Riewald M, Petrovan RJ, Mueller BM, Ruf W. Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science* 2002;296:1880-2.
25. Mosnier LO, Griffin JH. Inhibition of staurosporin-induced apoptosis of endothelial cells by activated protein C requires protease-activated receptor-1 and endothelial cell protein C receptor. *Biochem J* 2003;373:65-70.
26. Shibata M, Kumar SR, Amar A, Fernández JA, Hofman F, Griffin JH, et al. Anti-inflammatory, antithrombotic, and neuroprotective effects of activated protein C in a murine model of focal ischemic stroke. *Circulation* 2001;103:1799-805.
27. Fernández JA, Xu X, Liu D, Zlokovic BV, Griffin JG. Recombinant murine-activated protein C is neuroprotective in a murine ischemic stroke model. *Blood Cells, Mol Dis* 2003;30:271-6.
28. Cheng T, Liu D, Griffin JH, Fernández JA, Castellino F, Rosen ED, et al. Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Nat Med* 2003;9:338-42.

# MOLECULAR CONTROL OF IRON METABOLISM IN MAN

M. CAZZOLA

*Division of Hematology, University of Pavia Medical School and IRCCS Policlinico S. Matteo, Pavia, Italia.*

## Introduction

Iron participates in several biologic reactions and is essential to virtually all forms of living organisms. Iron-containing proteins of the respiratory chain are involved in electron transport to provide the energy for cellular functional activities<sup>1</sup>. Iron is also required for cell growth and multiplication in view of its role in the activity of ribonucleotide reductase, a key-enzyme in DNA synthesis, responsible for the reduction of ribonucleotides to deoxyribonucleotides. This enzyme turns over rapidly and needs a continuous supply of iron to maintain activity. On the other hand, iron is a potentially toxic element, being a catalyst of the transformation of the non-toxic superoxide radical ( $O_2^-$ ) into poisonous free radicals such as  $OH^\cdot$ . Thus, the essentiality of this metal together with its potential toxicity suggests that cellular iron metabolism needs to be highly regulated, and that abnormalities in any of its different steps may affect both the survival and the proliferative activity of the cell.

For a long time, only three proteins of iron metabolism were known: transferrin, transferrin receptor (TfR), and ferritin (L and H subunit). Also, the only established genetic disorder of iron metabolism was HLA-related hereditary hemochromatosis, whose gene was unknown. In the last few years, our understanding of iron metabolism in health and disease has been explosive: novel genes and proteins have been identified, and several genetic disorders have been characterized.

## Post-transcriptional regulation of human iron metabolism and its pathology

Cellular iron homeostasis in mammalian cells is maintained by the coordinated regulation of transferrin receptor and ferritin synthesis that occurs at the translational level and is mediated by cytoplasmic mRNA-binding proteins, known as iron regulatory proteins (IRPs)<sup>2</sup>. These proteins are capable of sensing cellular iron status and of interacting with mRNA stem-loop structures known as iron-responsive elements (IREs). IREs constitute the first well-characterized family of cis-acting non-coding regulatory sequences in eukaryotic mRNA. A single functional IRE is found in the 5'-UTR of mRNAs for ferritin H and L subunits and in ALAS2. In contrast,

multiple IREs are present in the 3'-UTR of the mRNA for transferrin receptor.

Two IRP family members, IRP1 and IRP2, have been identified in humans<sup>3,4</sup>. Under conditions of intracellular iron depletion, both IRP1 and IRP2 function as RNA-binding proteins that bind IREs with high affinity. The binding of an IRP to the ferritin IRE prevents the association of the 43S translation pre-initiation complex with the mRNA by precluding the recruitment of the small ribosomal subunit. Thereby, translation of the ferritin protein is repressed. Conversely, binding of IRPs to the IREs in the 3'-UTR of transferrin receptor increases the stability of mRNA and improves the efficiency of translation. When intracellular iron concentrations rise, the IRPs dissociate from the IREs. IRP1 may acquire a [4Fe-4S] cluster and behave as a cytosolic aconitase. IRP1 exhibits approximately 30% sequence homology to mitochondrial aconitase. IRP2 lacks aconitase activity and functions solely as an RNA-binding protein. At elevated intracellular iron concentrations, IRP2 is targeted for degradation by the proteasome.

Thus, translational regulation by IRPs allows rapid and coordinated control of proteins that are crucial for cellular iron homeostasis. When cells have adequate iron, the expression of transferrin receptors decreases and the levels of ferritin rise to accommodate the excess iron. On the other hand, when cellular iron becomes scarce, the levels of ferritin fall while the expression of transferrin receptors increases to import more iron from the outside.

The above advances in the molecular regulation of iron metabolism have allowed a better understanding of genetic disorders of iron metabolism. Mutations that cause disease through increased efficiency of ferritin mRNA translation have been discovered, defining translational pathophysiology as a novel mechanism of human disease<sup>2</sup>. Hereditary hyperferritinemia/cataract syndrome (HHCS, OMIM 600886) arises from various point mutations or deletions within a protein binding sequence in the 5'-UTR of the L-ferritin mRNA. Each unique mutation confers a characteristic degree of hyperferritinemia and severity of cataract in affected individuals<sup>5</sup>. Evaluation of in vitro affinity of the IRPs for the mu-

tant IREs from HHCS patients has shown a close relationship between decreases in binding affinity and clinical severity<sup>6</sup>.

Having identified HHCS as a genetic disorder due L-ferritin IRE mutations, the next question is whether any human disorder of H-ferritin synthesis exists. So far, the only potential genetic disorder of H ferritin synthesis has been reported by Kato and coworkers<sup>7</sup>. They reported a single point mutation (A49U) in the IRE motif of H-ferritin mRNA in a family with hyperferritinemia, claiming that this is a gain-of-function mutation responsible for decreased H ferritin synthesis and elevated L ferritin production.

### **HFE and HLA-related genetic hemochromatosis**

A major step forward in our understanding of the molecular control of iron metabolism was the cloning of HFE on the short arm of chromosome 6<sup>8</sup>. Seven years later the role of HFE in the process of normal iron metabolism is still uncertain, although a series of studies have documented that the HFE protein is able to bind TfR thereby inhibiting the interaction between TfR and diferric transferrin. Townsend & Drakesmith<sup>9</sup> have proposed a molecular model in which HFE has two mutually exclusive activities in cells: inhibition of uptake or inhibition of release of iron. The balance between serum transferrin saturation and serum transferrin-receptor concentrations determines which of these functions predominates.

Following the identification of HFE as the gene of HLA-related genetic hemochromatosis (HFE, OMIM 235200), homozygosity for the HFE C282Y mutation has been found in more than 90% of North European origin clinically diagnosed with genetic hemochromatosis. However, it became later clear that both genetic and acquired factors play a role in the phenotypic expression of HFE-related hemochromatosis. Recently Beutler et al<sup>10</sup> reported that the penetrance of HFE-related hereditary hemochromatosis is much lower than generally thought, with less than 1% of homozygotes developing frank clinical hemochromatosis.

### **DMT1**

Another major advance was represented by the recognition of the divalent metal transporter in mammals, DMT1 (also known as DCT1 and Nramp2), active in the gut and expressed on the luminal membrane of the enterocyte (Fleming et al, 1997; Gunshin et al, 1997)<sup>11</sup>. DMT1 transfers iron across the apical surface of intestinal cells and out of transferrin cycle endosomes, and is not iron-specific, but serves also other metals. DMT1 mRNA in the gut has a 3'-UTR IRE and is iron-regulated, as shown in mouse models in conditions of iron deficiency or iron overload. Both *mk/mk* mice and Belgrade rats,

which have a microcytic, hypochromic anemia, carry a missense mutation (G185R) in DMT1<sup>11,12</sup>.

### **Transferrin receptor 2 (TfR2) and hemochromatosis type 3 (HFE3, OMIM 604250)**

A homolog of the transferrin receptor has been identified as transferrin receptor 2 (TfR2)<sup>13</sup>. TfR2 is a member of the "transferrin-like receptors" family with an unknown function, characterized by a restricted pattern of expression in the liver. TfR2 lacks an IRE and allows continued uptake of transferrin-bound iron by hepatocytes even after TfR has been down regulated by iron overload. Camaschella and coworkers<sup>14</sup> have conducted studies whose findings support the hypothesis that TfR2 contributes to body iron sensing.

Hemochromatosis type 3 (HFE3, OMIM 604250). In a few Italian families with non-HFE related hereditary hemochromatosis Camaschella and coworkers<sup>15</sup> found that affected individuals were homozygous for point mutations in the gene coding TfR2, suggesting that this may represent the molecular basis for this familial iron overload syndrome. The TfR2 mutations responsible for hemochromatosis type 3 appear to be private mutations.

### **Ferroportin and hemochromatosis type 4 (HFE4, OMIM 606069)**

Ferroportin1 –or, more simply, ferroportin– is a newly discovered molecule that plays a crucial role in iron export<sup>19</sup>. The gene (SLC11A3) has at least 10 transmembrane domains, a reductase site and a basolateral localization signal. Ferroportin is expressed on the basolateral surfaces of mature enterocytes within the duodenum and in macrophages of the spleen and liver.

Hemochromatosis type 4 (HFE4, OMIM 606069). In nearly simultaneous reports, a Dutch<sup>20</sup> and an Italian group<sup>21</sup> described pedigrees with atypical hemochromatosis inherited as an autosomal dominant trait. The two groups found different missense mutations in the gene encoding the iron export protein ferroportin. This dominant type of this genetic reticuloendothelial iron overload is currently defined as hemochromatosis type 4, or HFE4 (OMIM 606069), or ferroportin disease<sup>22</sup>. A peculiar type of this condition, typically presenting as selective reticuloendothelial iron overload, is the genetic disorder associated with a three base pair deletion in the coding region of the ferroportin gene (SLC11A3) involving the deletion of valine 162 of the protein<sup>23</sup>.

### **Hepcidin, hemojuvelin, anemia of inflammation and juvenile genetic hemochromatosis**

Hepcidin is an antimicrobial peptide that plays a major role in metabolism and is a mediator of ane-

mia of inflammation. This peptide, encoded by the HAMP gene, is produced by the hepatocyte and is expressed as a precursor of 84 residues that is processed to mature forms of 25, 21 and 20 amino acids. It is a secretory protein and has the structure of a beta hairpin connected by 4 disulfide bridges resulting in a molecule with hydrophobic and basic surfaces. Heparin expression is modulated by the body iron status in the mice, and the inactivation of its gene in KO mice leads to a severe iron loading<sup>24</sup>. Overexpression of this antimicrobial peptide in transgenic mice causes severe, and often lethal, iron deficiency anemia<sup>25</sup>. Heparin expression is positively regulated by inflammation<sup>26</sup>, specifically by interleukin 6<sup>27</sup>, and by iron overload, while is negatively regulated by the rate of erythropoiesis, hypoxia and iron deficiency<sup>28</sup>. Most studies on heparin expression have analyzed the transcriptional regulation of the gene, and very little is known on processing, maturation and secretion pathways of the protein. This is due to the lack of adequate antibodies and cellular models.

Recently a new protein called "hemojuvelin" was identified, encoded by the HJV gene on chromosome 1q<sup>29</sup>. This protein has a leader and a C-terminal trans-membrane sequence, with properties typical of a GPI anchor protein. However, alternative splicing products have been reported, which are possibly expressed in skeletal muscle and other organs, and are predicted to encode proteins without the leader sequence. The observations that HJV is expressed in the same tissues that express HAMP suggests that hemojuvelin is an heparin chaperon rather than the heparin receptor.

Juvenile genetic hemochromatosis, or hemochromatosis type 2 (HFE2, OMIM 602390). These patients present with hypogonadotropic hypogonadism in the second decade of life and, unless proper treatment is started, die early because of cardiac dysfunction<sup>30</sup>. In an Italian cooperative study, the juvenile locus was mapped to chromosome 1q<sup>31</sup>. Camaschella and coworkers later found that the juvenile condition which is not associated with the 1q locus (HFE2B, OMIM 602390) is caused by mutations in the HAMP gene encoding heparin<sup>32,33</sup>. Finally, we and others have shown that the most common type of juvenile genetic hemochromatosis (HFE2A, OMIM 602390) is caused by mutations in the HJV gene encoding hemojuvelin<sup>29,34,35</sup>.

Thus, heparin is a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation<sup>26</sup>.

## Conclusions

This outline documents the recent remarkable advances in our understanding of molecular regulation of iron metabolism, and shows how these achievements have provided us with opportunities to identify novel genetic disorders and their molecular basis,

and to develop new diagnostic and therapeutic strategies for these conditions.

## References

- Cazzola M, Bergamaschi G, Dezza L, Arosio P. Manipulations of cellular iron metabolism for modulating normal and malignant cell proliferation: achievements and prospects. *Blood*. 1990;75:1903-1919.
- Cazzola M, Skoda RC. Translational pathophysiology: a novel molecular mechanism of human disease. *Blood*. 2000;95:3280-3288.
- Rouault TA. Post-transcriptional regulation of human iron metabolism by iron regulatory proteins. *Blood Cells Mol Dis* 2002;29:309-14.
- Rouault TA. How mammals acquire and distribute iron needed for oxygen-based metabolism. *PLoS Biol* 2003;1:E79.
- Cazzola M, Bergamaschi G, Tonon L, et al. Hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome: relationship between phenotypes and specific mutations in the iron-responsive element of ferritin light-chain mRNA. *Blood* 1997;90:814-21.
- Allerson CR, Cazzola M, Rouault TA. Clinical severity and thermodynamic effects of iron-responsive element mutations in hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome. *J Biol Chem* 1999;274:26439-47.
- Kato J, Fujikawa K, Kanda M, et al. A mutation, in the iron-responsive element of H ferritin mRNA, causing autosomal dominant iron overload. *Am J Hum Genet* 2001;69:191-7.
- Feder JN, Tsuchihashi Z, Irrinki A, et al. The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts beta2-microglobulin interaction and cell surface expression. *J Biol Chem* 1997;272:14025-8.
- Townsend A, Drakesmith H. Role of HFE in iron metabolism, hereditary haemochromatosis, anaemia of chronic disease, and secondary iron overload. *Lancet* 2002;359:786-90.
- Beutler E, Felitti VJ, Koziol JA, Ho NJ, Gelbart T. Penetrance of 845G->A (C282Y) HFE hereditary haemochromatosis mutation in the USA. *Lancet* 2002;359:211-8.
- Fleming MD, Trenor CC 3rd, Su MA, et al. Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat Genet* 1997;16:383-6.
- Fleming MD, Romano MA, Su MA, Garrick LM, Garrick MD, Andrews NC. Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:1148-53.
- Kawabata H, Yang R, Hiramata T, et al. Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J Biol Chem* 1999;274:20826-32.
- Deaglio S, Capobianco A, Cali A, et al. Structural, functional, and tissue distribution analysis of human transferrin receptor-2 by murine monoclonal antibodies and a polyclonal antiserum. *Blood* 2002;100:3782-9.
- Camaschella C, Roetto A, Cali A, et al. The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nat Genet* 2000;25:14-5.
- Girelli D, Bozzini C, Roetto A, et al. Clinical and pathologic findings in hemochromatosis type 3 due to a novel mutation in transferrin receptor 2 gene. *Gastroenterology* 2002;122:1295-302.
- Piperno A, Roetto A, Mariani R, et al. Homozygosity for transferrin receptor-2 Y250X mutation induces early iron overload. *Haematologica* 2004;89:359-60.
- Roetto A, Daraio F, Alberti F, et al. Hemochromatosis due to mutations in transferrin receptor 2. *Blood Cells Mol Dis* 2002;29:465-70.
- Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, et al. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* 2000;403:776-81.
- Njajou OT, Vaessen N, Joosse M, et al. A mutation in SLC11A3 is associated with autosomal dominant hemochromatosis. *Nat Genet* 2001; 28:213-4.
- Montosi G, Donovan A, Totaro A, et al. Autosomal-dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the ferroportin (SLC11A3) gene. *J Clin Invest* 2001;108:619-23.
- Pietrangelo A. The ferroportin disease. *Blood Cells Mol Dis* 2004;32:131-8.
- Cazzola M, Cremonesi L, Papaioannou M, et al. Genetic hyperferritinemia and reticuloendothelial iron overload associated with a three base pair deletion in the coding region of the ferroportin gene (SLC11A3). *Br J Haematol* 2002;119:539-46.
- Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, et al. Lack of heparin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:8780-5.
- Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, et al. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver heparin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:4596-601.
- Ganz T. Heparin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood* 2003;102:783-8.
- Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, et al. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone heparin. *J Clin Invest* 2004;113:1271-6.

28. Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest* 2002;110:1037-44.
29. Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH, et al. Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet* 2004;36:77-82.
30. Cazzola M, Ascari E, Barosi G, et al. Juvenile idiopathic haemochromatosis: a life-threatening disorder presenting as hypogonadotropic hypogonadism. *Hum Genet* 1983;65:149-54.
31. Roetto A, Totaro A, Cazzola M, et al. Juvenile hemochromatosis locus maps to chromosome 1q. *Am J Hum Genet* 1999;64:1388-93.
32. Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, et al. Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet* 2003;33:21-2.
33. Roetto A, Daraio F, Porporato P, et al. Screening hepcidin for mutations in juvenile hemochromatosis: identification of a new mutation (C70R). *Blood* 2004;103:2407-9.
34. Lanzara C, Roetto A, Daraio F, et al. The spectrum of hemojuvelin gene mutations in 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Blood* 2004.
35. Lee PL, Beutler E, Rao SV, Barton JC. Genetic abnormalities and juvenile hemochromatosis: mutations of the HJV gene encoding hemojuvelin. *Blood* 2004.

# ENFERMEDAD HEMOLÍTICA DEL RECIÉN NACIDO

A. RODRÍGUEZ DE LA RÚA FERNÁNDEZ, D. HERNÁNDEZ MARAVER Y J. GRACIA COLLEFORNS

Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Universitario La Paz. Madrid.

## Introducción

La enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN) se caracteriza por el acortamiento de la vida media de los hematíes fetales debido a la acción de anticuerpos maternos que atraviesan la placenta. A pesar del término EHRN, el proceso comienza en la vida intrauterina, por lo que se ha propuesto el nombre de enfermedad hemolítica del feto y recién nacido<sup>1</sup>.

## Principales eventos históricos<sup>2</sup>

1609<sup>3</sup>: Louise Bourgeois (comadrona): primera descripción clínica de *hydrops fetalis*.

1932<sup>4</sup>: Diamond et al describen que anemia congénita, ictericia grave e *hydrops fetalis* son manifestación de la misma enfermedad: eritroblastosis fetal.

1938<sup>5</sup>: Darrow postula que la hemólisis se debe al paso transplacentario de anticuerpos maternos a la circulación fetal.

1939<sup>6</sup>: Levine y Stetson encuentran un anticuerpo que causa la EHRN.

1940<sup>7</sup>: Landsteiner y Weiner describen el grupo sanguíneo Rh.

1954<sup>8</sup>: Chow demuestra la sensibilización materna por hemorragia fetomaterna (HFM).

1966<sup>9</sup>: Prevención de la EHRN mediante profilaxis Anti-D. Estudio multicéntrico (Inglaterra y Baltimore).

1971<sup>10</sup>: OMS: Prevención de la sensibilización Rh.

1998<sup>11</sup>: Edimburgo: conferencia de consenso sobre la profilaxis Anti-D.

## Fisiopatología

De las causas más frecuentes de hemólisis por inmunoglobulinas: anemia hemolítica autoinmune, reacción hemolítica transfusional y EHRN, es esta última la más compleja, ya que implica la producción de anticuerpos en un individuo sano (madre) y la destrucción de hematíes en otro (feto).

Aunque la circulación materna y la circulación fetal transcurren anatómicamente por separado, estudios mediante citometría de flujo han demostrado la existencia de pequeñas HFM en casi todos los embarazos<sup>12</sup>. Así, hematíes fetales alcanzan la circulación materna y se produce la formación de aloanticuerpos maternos frente a antígenos eritrocitarios fetales. Una vez que se produce la aloinmunización,

la placenta transporta activamente anticuerpos IgG a la circulación fetal; estos se unen específicamente a los hematíes fetales, que serán destruidos por el sistema mononuclear fagocítico (SMF). Sin embargo, no todos los anticuerpos IgG producen EHRN; en general, producen la enfermedad aquellos anticuerpos que causan destrucción acelerada de las células incompatibles. Es por tanto improbable que esté originada por anticuerpos del sistema Chido/Rodgers y Knops.

Aunque la incompatibilidad ABO es la más frecuente, pocos fetos y recién nacidos (RN) están afectados por la enfermedad hemolítica. Los anticuerpos más frecuentemente asociados con enfermedad hemolítica moderada y grave son los del sistema Rh (especialmente el anti-D, que es 50 veces más inmunogénico que otros anticuerpos de este sistema, seguido del anti-c) y los del sistema Kell. En el caso del anti-K, además de la hemólisis, el anticuerpo produce anemia en el primer trimestre de la gestación por inhibición de la eritropoyesis intramedular<sup>1</sup>. Esto puede agravar la enfermedad en las fases iniciales de la gestación. Ocasionalmente, anticuerpos frente a antígenos de otros sistemas causan enfermedad hemolítica grave en el feto y neonato. En ocasiones la ausencia de enfermedad en presencia de anticuerpos se debe al insuficiente desarrollo de los antígenos en los hematíes fetales y/o a la neutralización del anticuerpo por antígenos solubles.

El anti-D sigue siendo la causa más frecuente de morbilidad y mortalidad fetal por enfermedad hemolítica, a pesar de que su incidencia ha disminuido sustancialmente tras la introducción de la profilaxis anti-D.

## Factores inmunogénicos

Los factores que influyen en la respuesta inmune a las células D positivas son<sup>2</sup>:

1. Dosis del antígeno (volumen de hematíes D positivos). Es el factor crítico que determina la magnitud de la respuesta. La HFM se produce por procesos fisiológicos y patológicos, o por procedimientos obstétricos que causan rotura de la barrera fetomaterna de la placenta (tabla 1) La media de

HFM durante el parto es menor de 1 ml; sin embargo, hasta un 0.24% de mujeres supera los 30 ml<sup>13,14</sup>.

2. Incompatibilidad ABO fetomaterna. Supone un efecto protector; aproximadamente un 50% de todas las mujeres con embarazos ABO compatibles tienen hematíes fetales detectables en la circulación y sólo el 19% de aquellas con embarazos ABO incompatibles. Esto es debido posiblemente a la rápida retirada de las células de la circulación materna por el sistema fagocítico mononuclear, principalmente en el hígado, órgano menos inmunorresponsador que el bazo, lo que disminuye la probabilidad de estimulación de formación de anticuerpos.

3. Patrón de expresión de antígenos Rh del feto. El fenotipo R2r expresa mayor cantidad de antígeno D que los otros fenotipos siendo más efectivo en sensibilizar a las madres.

4. Capacidad de respuesta inmune de la madre. Es muy variable durante el embarazo y está influenciada por el sistema mayor de histocompatibilidad, clase II. Sólo un 16% de madres D negativas no protegidas se sensibilizan durante el embarazo de un feto D positivo.

#### **Sensibilización y desarrollo del aloanti-D**

Puesto que los antígenos Rh están presentes sólo en los hematíes, la inmunización Rh-D se desarrolla en sujetos D negativos tras el contacto con antígeno D por inyección intramuscular o intravenosa de hematíes D positivos, o tras una HFM de un feto D positivo.

Como el antígeno D en el feto no está plenamente desarrollado hasta los 30-40 días de gestación y la HFM no se produce antes de la sexta semana, teóricamente la sensibilización materna por hemorragia transplacentaria no puede producirse antes de este período de gestación<sup>15</sup>. El riesgo de HFM es del 1-3% en el primer trimestre, 43% en el segundo y 64% en el tercero, y en más del 50% de los partos<sup>2,16</sup>.

El paso activo de la IgG es lento hasta la semana 24, y de aquí al final del embarazo se incrementa exponencialmente hasta alcanzar en el momento del parto niveles ligeramente superiores en el suero del recién nacido.

#### **Papel de las subclases de IgG**

La concentración de las cuatro subclases de IgG es sensiblemente mayor en el cordón que en el suero materno. La IgG<sub>1</sub> cruza la placenta en fases tempranas de la gestación y hacia la semana 20 es detectable en el suero del cordón en igual o mayor cantidad que en el suero materno. La IgG<sub>3</sub> no alcanza ese nivel hasta la semana 28-32 y no se eleva más en el resto del embarazo. El anti-D responsable de la EHRN se produce solo como IgG<sub>1</sub> y/o IgG<sub>3</sub>. Los casos anti-D IgG<sub>1</sub> cursan con anemia más grave que la IgG<sub>3</sub>, quizá por una exposición más prolongada del feto a esta subclase. Sin embargo, IgG<sub>3</sub> provoca un mayor incremento de bilirrubina en el neonato<sup>1,2,17,18</sup>.

Tabla 1. Causas más frecuentes de hemorragia fetomaterna

Embarazo, sobre todo en tercer trimestre
Gestación múltiple
Parto
Aborto
Terapéutico
Espontáneo seguido de legrado instrumental
Espontáneo completo o incompleto después de la 12 semana de gestación
Amenaza de aborto con sangrado abundante o asociado a dolor abdominal
Técnicas invasivas de diagnóstico prenatal
Amniocentesis
Biopsia coriónica
Funiculocentesis
Otros procedimientos intrauterinos
Inserción de shunt
Hemorragia anteparto
Versión externa del feto
Traumatismo abdominal
Embarazo ectópico
<i>Abruptio placentae</i>
Extracción manual de la placenta
Muerte intraútero
Feto muerto retenido

#### **Mecanismos de destrucción de hematíes**

Los mecanismos finales de destrucción inmune de hematíes son los mismos en caso de autoanticuerpos (anemia hemolítica autoinmune), aloanticuerpos contra hematíes transfundidos (reacción hemolítica transfusional), o aloanticuerpos maternos contra hematíes fetales. Los hematíes que tienen los anticuerpos unidos a los determinantes antigénicos de la membrana son reconocidos por los macrófagos a través de receptores específicos para la fracción Fc de la IgG<sup>19,20</sup>. La subclase IgG<sub>3</sub> es captada con mayor avidez por parte de este receptor. Además, la patogenicidad de los anticuerpos depende de otros factores:

1. Eficiencia en el paso transplacentario de anticuerpos.
2. Madurez funcional del bazo fetal.
3. Presencia de anticuerpos bloqueantes relacionados con HLA.

La hemólisis *in vivo* comienza con la opsonización de los hematíes por los anticuerpos. Posteriormente, son reconocidos y eliminados de la circulación por los macrófagos en el bazo y en menor grado en el hígado. Los hematíes también pueden perder parte de su membrana por la acción de los macrófagos, volviendo a la circulación como esferocitos para después ser atrapados en el bazo, acortándose su vida media<sup>1,17,18</sup>. Además de la fagocitosis mediada por receptor Fc, se cree actualmente que la citotoxicidad celular anticuerpo dependiente, puede tam-

bién contribuir al daño celular durante la fase de íntimo contacto con los macrófagos del bazo<sup>1,17-19</sup>.

### Rasgos clínicos de la EHRN

La EHRN se inicia durante la vida intrauterina por la hemólisis de los hematíes fetales recubiertos de anticuerpos. La anemia resultante conlleva una disminución de la capacidad de transporte de oxígeno y como mecanismo de compensación una hiperplasia intramedular de la serie roja y liberación a sangre periférica de formas inmaduras (*erythroblastosis fetalis*). Cuando la capacidad de compensación de la médula es superada, aparece la hematopoyesis extramedular en hígado y bazo, lo que origina distorsión de la circulación portal, hipertensión portal y ascitis. La hipoalbuminemia causada por la disminución de la síntesis de albúmina en el hígado da lugar a una disminución en la presión oncótica con la aparición de edema generalizado, ascitis, e incluso derrame pleural y pericárdico (*hydrops fetalis*)<sup>2,21,22</sup>. Otras manifestaciones son cardiomegalia, hemorragia pulmonar, etc.

La bilirrubina generada por la hemólisis es eliminada en el feto a través de la placenta. Sin embargo, si en el neonato se supera la capacidad de aclaramiento, presentará ictericia intensa y signos de afectación neurológica (*icterus gravis neonatorum*).

El nivel de hemoglobina y el recuento de hematíes del cordón, que están frecuentemente disminuidos, no siempre se correlacionan con la gravedad. En la extensión de sangre periférica, los hematíes presentan macrocitosis, anisocitosis y poiquilocitosis. Los reticulocitos pueden representar el 30-40 % de la serie roja en RN no tratados, pudiendo ser bajos en aquellos con transfusión intrauterina (TIU). Son frecuentes los eritroblastos circulantes. Los esferocitos se ven sobre todo en casos de enfermedad por incompatibilidad ABO o en ciertos trastornos de la membrana del hematíe.

La amenaza más grave de la hiperbilirrubinemia del neonato es el daño cerebral, conocido como kernícterus. La bilirrubina no conjugada es particularmente tóxica para el tejido cerebral en que se deposita, especialmente en los ganglios basales, el tálamo, el cerebelo, la sustancia gris y la espina dorsal. El mecanismo por el que la bilirrubina libre pasa al cerebro en el RN no está del todo aclarado, pero el nivel de albúmina sérica, pH sanguíneo y la hipoxia parecen ser factores decisivos.

El nivel de bilirrubina necesario para producir kernícterus no es conocido, pero raramente se produce daño cerebral si la bilirrubina es menor de 20 mg/dl. Este umbral parece ser inferior en RN prematuros.

Existen diferentes grados de afectación. Un 45-50 % de los casos padece una enfermedad tan leve que no requiere tratamiento; un 25-30 %, aunque no desarrollan *hydrops*, padece una anemia moderada y pueden desarrollar intensa ictericia con el consiguiente riesgo de kernícterus; un 20-25 % desarrolla *hydrops*

*fetalis*, 10-12 % antes de la 34 semanas de gestación y 10-13 % tras la semana 34. Por ello es preciso detectar precozmente y tratar a estos fetos que de otra manera tendrían alta mortalidad o probabilidad de daño cerebral irreparable<sup>23,24</sup>.

### Prevención de la isoimmunización Rh

A pesar de los avances en la monitorización y tratamiento ante y posnatal, el mayor logro histórico en la EHRN ha sido su prevención, disminuyendo con su aplicación la mortalidad de 18,4 a 1,3/100.000 nacidos vivos (1977-1992). Sin embargo este sistema de prevención es imperfecto. A diferencia de las vacunas habituales, en esta enfermedad lo que se previene es la inmunización, lo que obliga a administrar Rh IgG en dosis adecuadas cada vez que exista una exposición al antígeno<sup>25</sup>.

### Mecanismo de acción

El mecanismo exacto de acción de la IG Rh-D es desconocido aún en la actualidad. Tres teorías se han propuesto<sup>2</sup>:

1. Desviación antigénica. Existen algunas evidencias que apoyan esta teoría:

a) Disminución de la frecuencia de inmunización en los casos de incompatibilidad ABO, posiblemente por la rápida retirada de las células incompatibles por el SMF del hígado.

b) El efecto supresor de anticuerpos IgG no es antígeno-específico. En inyecciones a voluntarios D-, K- con células D+, K+ y anti-K se observó la inhibición de la respuesta a ambos antígenos.

c) Las células D positivas recubiertas de IgG Rh-D son eficazmente eliminadas de la circulación, posiblemente por los macrófagos del bazo, que tienen una elevada expresión de FcR, antes de que sean reconocidas por las células presentadoras de antígeno.

2. Inhibición competitiva por bloqueo antigénico. Este mecanismo difícilmente explica la inmunosupresión mediada por anticuerpo de la IGRh ya que menos del 20 % del antígeno presente se une a la IGRh.

3. Inhibición central. Constituiría una teoría posible ya que el aumento de la concentración de complejos antígeno-anticuerpo en el bazo y los ganglios linfáticos podría suprimir la respuesta inmune primaria bloqueando la expansión clonal de los linfocitos B específicos mediada por linfocitos T *helper*. La respuesta inmune mediada por los linfocitos B de memoria no es, sin embargo, inhibida por la IGRh, por lo que es importante la identificación de las madres Rh-D negativas antes de que la respuesta inmune haya ocurrido. Por otra parte, la eficacia de la profilaxis antenatal se justifica porque es posible que a medida que el antígeno D es procesado, moléculas libres de anti-D (de la IGRh) compitan eficazmente

por el antígeno, previniendo su unión con los receptores de los monómeros de IgM de los linfocitos B.

**Dosis e indicaciones**

La dosis óptima, el momento de administración y las indicaciones han sido objeto de estudio por los distintos grupos de Norteamérica, Reino Unido y Canadá hasta la realización de documentos de consenso y guías de administración, cuya rigurosa aplicación permitiría la erradicación casi total de la EHRN. Un principio general es que 20µg (100 U) de anti-D protegen frente a 1 ml de hematíes Rh-D positivos<sup>13,26</sup>.

La administración de IGRh a mujeres D negativas no inmunizadas previamente, en las 72 h tras cada alumbramiento de un RN-D positivo, previene la inmunización en la mayoría de los casos. Sin embargo, un 1,8 % de las mujeres con riesgo desarrollan anti-D, y de éstas, el 92 % lo hacen a partir de la 28 semana de gestación. La adición de una dosis de 300 µg en esta semana de gestación disminuye la sensibilización al 0,12 %. La dosis de 300 µg postparto protege frente a la exposición de 15 ml de hematíes D positivos; del 0,24% de las mujeres que tienen una hemorragia superior a esta cantidad en el parto sólo el 30 % quedarán sensibilizadas, por lo que el fallo con esta dosis ocurrirá en el 0,08 %. En EE.UU. todas la mujeres D negativas reciben 300 µg (1.500 U) de anti-D entre la 28 y la 35 semana de gestación en todos los embarazos. Si el neonato es D positivo, esta dosis se repite tras el parto. En la mayoría de los países Europeos se administra una dosis inferior, 200-250 µg (1.000-1.500 U) a la 28 semana y se repite a la 34 semana. Esta dosis se reduce aún más en el Reino Unido donde consideran que 100 µg a la 28 y 34 semanas confieren la misma protección. Teóricamente, las dosis divididas tienen la ventaja de mantener un nivel elevado de IGRh a lo largo del tercer trimestre. Sin embargo, y en la práctica diaria, suponen un riesgo por falta de cumplimiento al precisar una mayor adherencia por parte de las embarazadas<sup>1,3,11,27,28</sup>.

En los casos de mujeres con expresión débil del antígeno D sólo está justificada la profilaxis IGRh en los casos de D parcial (falta de uno o más epítopes). Sin embargo, si solamente existe una menor expresión del antígeno (D<sup>w</sup>) se debe considerar a la madre como Rh-D positivo. En el caso en que no se pueda diferenciar, para mayor seguridad se tratará como si fuera D negativa<sup>1,19,28</sup>.

**Protección en situaciones de hemorragia fetomaterna**

En EE.UU. se utilizan habitualmente dosis de 300 µg (1.500 U). En el Reino Unido la dosis depende del momento de la gestación en que se produce la HFM; así, se administran 50 µg (250 U) si ocurre antes de la 20 semana de gestación y 100 µg (500 U) si ocurre a partir de entonces. Esta dosis estándar es suficiente prevención para hemorragias

Tabla 2. Indicaciones de administración de Anti-D en mujeres D negativas sin Anti-D

Parto de un recién nacido Rh-D positivo
Profilaxis 28 semanas de gestación
Aborto
Terapéutico
Espontáneo seguido de legrado instrumental
Espontáneo completo o incompleto después de la 12 semana de gestación
Amenaza de aborto
Antes de la 12 semana si existe sangrado abundante o repetido o si se asocia a dolor abdominal
Después de la 12 semana en todos los casos
Si el sangrado continúa intermitentemente tras la 12 semana debe administrarse a intervalos de 6 semanas y se debe cuantificar la HFM
Técnicas invasivas de diagnóstico prenatal
Amniocentesis
Biopsia coriónica
Funiculocentesis
Otros procedimientos intrauterinos
Inserción de <i>shunt</i>
Hemorragia anteparto
Versión externa del feto
Traumatismo abdominal
Embarazo ectópico
Muerte intraútero
Feto muerto retenido

Modificada de Urbaniak<sup>2</sup>.

menores de 4 ml de hematíes fetales incrementándose la dosis (125 U/ml de hematíes) en el caso de hemorragias de mayor volumen<sup>3,21,28</sup>. La Asociación Americana de Bancos de Sangre (AABB) recomienda la cuantificación sistemática de la HFM para ajustar la dosis. La Asociación Americana de Obstetricia y Ginecología (ACOG) recomienda la cuantificación sólo en los casos de gestación múltiple, abruptio placentae, placenta previa y extracción manual de la placenta. Si se sospecha HFM intermitente es importante repetir la dosis a intervalos de 6 semanas ya que niveles bajos de IGRh pueden paradójicamente incrementar la respuesta inmune en la presencia de un estímulo antigénico.

La cuantificación de la hemorragia se recomienda hacerla por la técnica de elución ácida de Kleihauer o equivalente, técnica de rosetas o por citometría de flujo<sup>1,29-32</sup>.

Las situaciones clínicas en las que se indica la administración de inmunoglobulina anti-D se resumen en la tabla 2.

La administración rigurosa en tiempo y dosis de la inmunoprofilaxis anti-D debe ser una prioridad, ya que fallos de administración constituyen aún hoy en día una importante causa de inmunización Rh.

**Seguimiento en aloinmunización materna**

El objetivo del seguimiento antenatal es identificar a los fetos gravemente afectados (déficit de Hb > 7 g/dl de lo esperado para semanas de ges-

tación), corregir su anemia y determinar el momento óptimo del parto.

La evaluación y manejo de las pacientes obstétricas con inmunización han sido ampliamente estudiados con un consenso bastante general en el tratamiento. Sin embargo, aún existe controversia en el seguimiento respecto a las técnicas invasivas y al momento de su aplicación.

La información sobre el estado del feto se obtiene mediante la historia obstétrica, la identificación y cuantificación del anticuerpo, los ensayos funcionales, ultrasonidos, eco-Doppler de la arteria cerebral media, estudio del fenotipo fetal mediante análisis del ADN, amniocentesis estudiando la DO450 del líquido amniótico y análisis de sangre fetal para estudio de la anemia. La combinación de estos métodos invasivos y no invasivos nos permiten ser predictivos en aproximadamente el 95% de los casos.

### Métodos no invasivos

#### Historia obstétrica

La historia de embarazos previos con fetos afectados puede indicar gravedad si el padre es homocigoto. Aporta información sobre cuándo iniciar el seguimiento, la frecuencia de los estudios e incluso orientará sobre el momento de iniciar el tratamiento. El estudio del fenotipo paterno y el análisis de probabilidades del genotipo permite calcular la probabilidad de que el feto tenga el antígeno diana.

#### Estudios serológicos

Con la identificación del anticuerpo materno se empieza a conocer el pronóstico. Su cuantificación permite conocer el momento preciso para introducir los métodos invasivos. La tendencia, es decir, la evolución de la cuantificación, es lo que realmente proporciona información. Cada laboratorio, en el caso del anti-D, debe definir su título crítico, por debajo del cual se sabe que el feto tiene una enfermedad leve y no está justificado el uso de técnicas invasivas que pueden transformar la enfermedad en grave por hemorragia transplacentaria. En general, este título oscila entre  $\leq 8$ - $\leq 16$ <sup>33</sup>. En otras especificidades el valor de la titulación está menos estandarizado y es difícil establecer el título crítico. La técnica recomendada para titulación es medio salino, 60 min de incubación a 37 °C y anti-IgG<sup>34</sup>. Hay autores que recomiendan utilizar hematíes heterocigotos para el antígeno, mientras que otros, en el caso del anti-D prefieren hematíes R<sub>2</sub>R<sub>2</sub> por ser los más constantes en su expresión antigénica y los diferentes resultados más comparables. Estas células son también las indicadas para anti-c, anti-E y anti-cE.

El test de antiglobulina ligada a enzima permite en el caso del anti-D una cuantificación por el estudio comparativo con un patrón. De manera orientativa se puede estimar que si el anti-D es menor de 4 U (< 1 µg) la probabilidad de *hydrops* es re-

lativa; si el anti-D está entre 5-15 U (1-3 µg) existe un riesgo moderado; y si el anti-D es superior a 15 U (> 3 µg) el riesgo es alto<sup>2</sup>. La historia previa y la cuantificación van a definir la frecuencia de la monitorización. A partir de la 18 semana de gestación el seguimiento será cada 2-4 semanas según el caso y evolución.

#### Estudios funcionales

Todos los ensayos serológicos miden únicamente la capacidad del anticuerpo para aglutinar. Sin embargo en la destrucción *in vivo* están implicados otros factores como la interacción antígeno-anticuerpo con los receptores Fc del SMF, la presencia en la madre de anticuerpos anti-Fc y los aloanticuerpos maternos contra antígenos de los monocitos paternos, entre otros. Por esto, los ensayos funcionales tales como el MMA (Monocyte Monolayer Assay) que mide la adherencia y fagocitosis, CL (quimioluminiscencia), que mide la respuesta metabólica de los monocitos asociado con fagocitosis, y ADCC (citotoxicidad mediada por células) que estudia la hemólisis extracelular deben tener, en el caso de anticuerpos del sistema Rh, un valor más predictivo<sup>35,36</sup>. Sin embargo, debido a la dificultad en su estandarización y por ser técnicas más complejas, está menos extendido su uso<sup>33</sup>.

Es de esperar que en un futuro los estudios moleculares de madre e hijo expliquen el funcionamiento del sistema inmune y se pueda predecir el comportamiento del anticuerpo individualmente.

#### Ultrasonografía

La realización de ecografías de forma seriada, aunque no ha remplazado totalmente a las técnicas invasivas, ha reducido su uso al mínimo<sup>1,17</sup>. El engrosamiento de la placenta, la pérdida de la arquitectura de la misma, la existencia de hidramnios, cardiomegalia, hepatomegalia, esplenomegalia, líquido pericárdico y ascitis son signos de afectación; la progresión más frecuente es: hidramnios → engrosamiento de la placenta → hepatomegalia → ascitis → *hydrops*.

La realización de Doppler, con la estimación de la velocidad de flujo de la arteria cerebral media, puede correlacionarse con una sensibilidad del 98% con la anemia del feto en el caso que no sea hidrópico<sup>37</sup>.

### Métodos invasivos

#### Estudio del genotipo del feto

En una fase temprana, 12-14 semanas de gestación, si la madre tiene un niño o feto previo afectado y el padre es heterocigoto para el gen que codifica el antígeno, el estudio molecular por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del genotipo del feto puede ser de ayuda. Hoy se estudia para *Rh*, *K*, *Fy*, *Jk*. Los análisis pueden realizarse en las células del blastómero, en células fetales de la sangre peri-

férica materna, técnica menos estandarizada, o de las vellosidades coriales. Deben hacerse en paralelo estudios serológicos y moleculares, al feto y a los padres. Los falsos positivos se dan en personas serológicamente D negativas que tienen gen *RHD* intacto pero no funcionando, situación infrecuente en la raza blanca pero no tan raro entre japoneses y descendientes africanos. Para evitar los falsos negativos es esencial hacer análisis de secuencias en 2 o más exones<sup>33</sup>.

**Espectrofotometría de líquido amniótico**

El análisis espectrofotométrico a 450 nm permite según parámetros de Liley<sup>38</sup> establecer una relación entre pigmentos biliares y gravedad de la enfermedad (fig. 1). No aporta información sobre la eritropoyesis del feto y es poco predictiva antes de la 27 semana de gestación<sup>9,17</sup>. Queenan<sup>39</sup>, en su modificación, intentó extrapolar los resultados al primer trimestre.

Cuando  $\Delta$  DO 450 cae en la zona superior, zona 3, es índice de anemia severa o de *hydrops fetalis* por lo que es indicación de cordocentesis. Cuando  $\Delta$  DO 450 cae en la zona inferior, zona 1, se trata de fetos Rh negativos o levemente afectados. En la zona media, zona 2, los errores son frecuentes por la falta de relación con la anemia fetal.

Como maniobra invasiva no está exenta de riesgos y puede transformar una enfermedad leve en moderada o grave por hemorragia transplacentaria, a pesar de realizarse bajo control ecográfico.

**Cordocentesis**

El método más exacto para estimar la anemia es medir el hematocrito del feto. Debe realizarse cuando se sospecha que está anémico y antes de la descompensación e *hydrops*. Técnicamente no es seguro hacerla antes de la 18-20 semana de gestación (1-2 % de mortalidad). En caso de *hydrops* tiene un 15% de mortalidad antes de la 20 semana de gestación y 5% posteriormente<sup>2</sup>. Las complicaciones más frecuentes son: bradicardia, hematoma, hemorragia, incremento en el nivel del anticuerpo, parto prematuro e infección.

**Tratamiento**

El propósito es mantener el embarazo hasta que el feto pueda nacer con seguridad, especialmente en lo concerniente a la madurez pulmonar.

**Inducción pretérmino del parto**

La teoría de Chown<sup>40</sup> sobre el beneficio de la inducción pretérmino del parto supuso un gran avance en el tratamiento en los casos de aparición de *hydrops* a partir de la 32-34 semana de gestación. Sin embargo, hoy día con la TIU se prefiere prolongar el embarazo hasta la semana 37 de gestación para evitar el distrés respiratorio del neonato inmaduro.

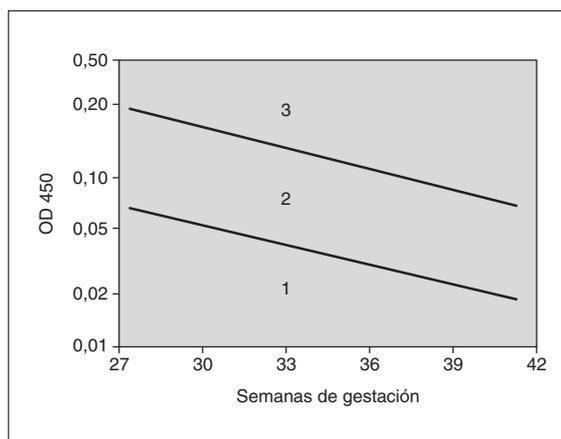


Figura 1. Curva de Liley<sup>38</sup>. Relación de la densidad óptica del líquido amniótico con la gravedad de la afectación fetal en el último trimestre del embarazo.

**Transfusión**

La introducción de la TIU por Liley en 1963<sup>41</sup> cambió el pronóstico de esta enfermedad. Inicialmente se realizaba intraperitoneal pero hoy en día, guiados por ultrasonidos, se realiza en la vena umbilical en la inserción del cordón (TIV)<sup>1,17,42,43</sup>. Actualmente la TIV es el método de elección para tratar la anemia fetal; sin embargo, la transfusión intraperitoneal tiene sus indicaciones, se sigue utilizando en fases muy iniciales, entre la semana 14 y 18, o cuando es inaccesible el cordón o para suplementar una TIV no completa. El riesgo fetal en la TIU se estima entre el 1-2 % por cada procedimiento.

Los hematíes deben ser del grupo 0, carente del antígeno correspondiente, compatibles con el suero materno, desleucotizados, irradiados, citomegalovirus negativos y de menos de 5 días.

El volumen a transfundir en ml en la transfusión intraperitoneal es igual a (30 - semanas de gestación) × 10. El cálculo del volumen en la TIV es más variable según los diferentes autores. Bowman<sup>44</sup> recomienda 50 ml/kg de peso hasta alcanzar un hematocrito de 55-60 %. Este volumen se reduce a 30-40 ml/kg de peso estimado no hidrópico para los fetos hidrópicos. Otros autores, sobre todo en el caso de fetos muy anémicos, son partidarios de elevar el hematocrito sólo 3,5 veces el original y repetir la transfusión tan pronto como sea preciso. Se tiende a que el intervalo entre dos transfusiones sea de 2 a 3 semanas, aunque el efecto de la primera es más corto debida a la persistencia en la circulación de hematíes recubiertos por anticuerpo.

Aunque no hay acuerdo en cuál es el hematocrito crítico para realizar la transfusión, se recomienda antes de la semana 26 si el hematocrito es inferior a 25% y después de la semana 26 si el hematocrito es inferior a 30%<sup>17,42</sup>.

La supervivencia de fetos no hidrópicos transfundidos es del 96 % cuando se realiza a partir de las

24 semanas y del 70 % si son hidrópicos transfundidos con menos de 24 semanas<sup>45</sup>. Múltiples transfusiones intrauterinas puede asociarse a anemia hiporregenerativa; sin embargo, los niños responden a la eritropoyetina.

Con los avances de la medicina fetal, la introducción de la transfusión intravascular y la mejora en los cuidados del neonato, hoy en día la supervivencia de los fetos afectados es mayor del 90 %<sup>2</sup>.

### Recambio plasmático e inmunoglobulinas intravenosas

La supresión selectiva de producción de anticuerpo o de su transferencia evitarían los tratamientos invasivos. Las opciones de recambio plasmático, inmunoglobulinas intravenosas, o la combinación de ambas son tratamientos muy controvertidos que pueden tener algunas indicaciones; por ejemplo, en las fases iniciales de la gestación de fetos con sospecha de afectación grave, por historia obstétrica previa y con padre homocigoto para el Rh-D, o como método alternativo en mujeres que rechazan las transfusiones. Deben iniciarse en fases muy iniciales del embarazo, semana 10-12 de gestación, para prolongarlo hasta que técnicamente sea posible realizar TIU. Los recambios plasmáticos deben ser amplios procesando 4 o 5 l utilizando como líquido de recambio soluciones albuminoideas/cristaloides. Para disminuir el nivel de anticuerpo deben repetirse 2 o 3 veces por semana<sup>1,2,21</sup>.

Se han publicado efectos beneficiosos de altas dosis de IgG intravenosas en embarazadas gravemente sensibilizadas<sup>1,17,46,47</sup>. Dosis de 2 g/kg de peso materno cada 2 semanas puede reducir los niveles del anticuerpo en un 50 % debido principalmente al mecanismo de *feed-back*. El efecto beneficioso puede ser debido también a la interferencia en el paso transplacentario de los anticuerpos maternos por saturación de los Fc receptores del trofoblasto y a la disminución de la hemólisis por saturación de los Fc de los macrófagos.

Pautas de 400-500 mg/kg/día durante 5 días han sido recomendadas por otros autores<sup>48</sup>.

### Direcciones futuras

Los avances en técnicas no invasivas que permitan determinar el fenotipo Rh del feto en el plasma materno sin incrementar el riesgo de inmunización, la futura disponibilidad de anti-D monoclonal exento de efectos adversos y sin restricciones en la dosis a administrar<sup>49</sup> y, por último, los estudios encaminados a la supresión activa de la respuesta inmune primaria y secundaria frente al Rh-D en mujeres Rh-D negativas son algunas de las expectativas que permitirán alcanzar la antes utópica erradicación de la EHRN.

### Bibliografía

- Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. Blood transfusion in clinical practice, 10<sup>th</sup> ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997.

- Urbaniak SJ, Greiss MA. RhD haemolytic disease of the fetus and the newborn. *Blood Reviews* 2000;14:44-61.
- Bowman JM. The prevention of Rh immunization. *Trans Med Rev* 1988;2:129-50.
- Diamond LK, Blackfan KD, Batty JM. Erythroblastosis fetalis and its association with universal edema of the fetus, icterus gravis neonatorum and anemia of the newborn. *J Pediatr* 1932;1:269-309.
- Darrow RR. Icterus gravis (erythroblastosis neonatorum, examination of etiologic considerations). *Arch Pathol* 1938;25:1-25.
- Levine P, Stetson RE. An unusual case of intra-group agglutination. *J Amer Med Ass* 1939;113:126-7.
- Landsteiner K, Wiener AS. An agglutinable factor in human blood recognized by immune sera for rhesus blood. *Proc Soc Exp Biol Med* 1940;43:223.
- Chown B. Anemia from bleeding of the fetus into the mother's circulation. *Lancet* 1954;1:1213-5.
- Combined study. Prevention of Rh-haemolytic disease: results of the clinical trial. A combined study from centres in England and Baltimore. *BMJ* 1966;2:904-7.
- WHO. Prevention of Rh sensitization. Technical report series 1971;468.
- Proceedings of the Joint Royal College of Physicians of Edinburgh and the Royal College of Obstetricians and Gynaecologists Consensus Conference on Anti-D Prophylaxis. Urbaniak SJ, editor. *Br J Obstet Gynaecol* 1998;(Suppl 18):105.
- Moise KJ. Management of red cell alloimmunization in pregnancy. In: *Obstetric Transfusion Practice*. En: Sacher RA, Brecher ME, editors. Bethesda, 1993.
- Pollack W, Ascari WQ, Kochesky RJ, et al. Studies on Rh Prophylaxis. Relationship between doses of anti-Rh and size of antigenic stimulus. *Transfusion* 1971;11:333-9.
- Urbaniak SJ, Robertson AG. A successful programme of immunising Rh-negative male volunteers for anti-D production using thawed blood. *Transfusion* 1981;21:64-9.
- Hann IM, Gibson BES, Letsky EA. Fetal and neonatal Haematology (Chapters 5 & 7). Balliere Tindall 1991.
- Cohen F, Zuelzer WW, Gustafson DC, et al: Mechanisms of isoimmunization. I: The transplacental passage of fetal erythrocyte in homo-specific pregnancies. *Blood* 1964;23:261.
- Anderson KC, Ness PM. Scientific basis of transfusion Medicine. Implication for clinical practice (Chapters 5, 6, 19). WB Saunders, 2000.
- Quinley ED. Immunohaematology: principles and practice. JB Lippincott, 1993.
- Issit PD, Anstee DJ. *Applied Blood Group Serology*. 4<sup>th</sup> ed. Montgomery Scientific Publications, 1998.
- Garraty G. Immunobiology of transfusion Medicine. Marcel Dekker, 1994.
- Bowman JM. The management of Rh-isoimmunization. *J Obstet Gynaecol* 1978;52:1-16.
- Schofield D, Cotran RS. Diseases of Infancy and Childhood. En: Cotran RS, Kumar V, Collins T, editors. *Robbins Pathologic Basis of Disease*. 6<sup>th</sup> edition. Chapter 11. W B Saunders, 1999.
- Bowman JM, Pollack JM. Amniotic fluid spectrophotometry and early delivery in the management of erythroblastosis fetalis. *Pediatrics* 1965;35:815-35.
- Stockman III, JA. Overview of the state of the art of Rh disease: History, current clinical management, and recent progress. *Journal of Pediatrics Hematology/Oncology* 2001;23(8).
- Greenough A. The role of immunoglobulins in neonatal Rhesus Haemolytic Disease. *Biodrugs* 2001;15(8):533-41.
- Voak D, Mitchell R, Bowell P, et al. Guidelines for blood grouping and red cell antibody testing during pregnancy. *Transfusion Medicine* 1996;6:71-74.
- Bowman JM, Pollack JM. Antenatal Rh prophylaxis: 28 week's gestation service program. *Can Med Assoc J* 1978;118:627-30.
- Lee D, Contreras M, Robson SC, et al. Recommendations for the use of anti-D immunoglobulin for Rh prophylaxis. *Transfusion Medicine* 1999;9:93-7.
- Sebring ES. Fetomaternal Hemorrhage - Incidence and Method of detection and Quantitation. Haemolytic disease of the newborn. Ed. G Garraty. American Association of Blood Banks, 1984; p. 87-117.
- Kelsey P, Reilly JT, Chapman JF, et al. The estimation of fetomaternal haemorrhage. *Transfusion Medicine* 1999;9:87-92.
- Greiss MA, Armstrong-Isher SS, Perera VS, Brown PM, Urbaniak SJ. Semiautomated data analysis of flow cytometric estimation of fetomaternal hemorrhage in D- women. *Transfusion* 2002;42(8):1067-78.
- Kennedy GA, Shaw R, Just S, Bryson G, Battistutta F, Rowell J, et al. Quantification of fetomaternal haemorrhage by flow cytometry: anti-fetal haemoglobin labelling potentially underestimates massive FMH in comparison to labelling with Anti-D. *Transfus Med* 2003;13(1):25-33.
- John Judd W, for the Scientific Section Coordinating Committee of the AABB. Practice guidelines for prenatal and perinatal immunohematology, revisited. *Transfusion* 2001;41:1445-52.
- John Judd W, Luban NLC, Ness PM, et al. Prenatal and Perinatal immunohematology: recommendations for serologic management of the fetus, newborn infant, and obstetric patient. *Transfusion* 1990;30:175-83.
- Zupánska B. Cellular immuno assays and their use for predicting the clinical significance of antibodies. En: Garraty G, editor. *Immunobiology of Transfusion Medicine*. Dekker, 1994; p. 465-91.
- Report from nine collaborating laboratories. Results of tests with different cellular bioassays in relation to severity of RhD haemolytic disease. *Vox Sang* 1991;60:225-9.

37. Mari G. Noninvasive diagnosis by Doppler ultrasonography of fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. *N Engl J Med* 2000;342:9-14.
38. Liley AW. Liquor amnii analysis in management of pregnancy complicated by rhesus immunisation. *Am J Obstet Gynecol* 1961;82:1359.
39. Queenan JT, Tomai TP, Ural SH, et al. Deviation in amniotic fluid optical density at a wave length of 450 nm in Rh- immunized pregnancies from 14 to 40 weeks gestation: a proposal for clinical management. *Am J Obstet Gynecol* 1993;168:1370-6.
40. Chown B, Bowman WD. The place of early delivery in the prevention of fetal death from erythroblastosis. *Pediatr Clin North Am* 1958;279-85.
41. Liley AW. Intrauterine transfusion of foetus in haemolytic disease. *Brit Med J* 1963;2:1107-9.
42. Tannirandorn Y, Rodeck CH. New Approach in the Treatment of Haemolytic Disease of th Fetus. En: Contreras M, editor. *Blood Transfusion: The impact of New Technologies*. Bailliere's Clinica Haematology Series. Vol. 3. London: Bailliere, 1990; p. 289-320.
43. Bowman JM. Treatment options for the fetus with alloimmune hemolytic disease. *Trans Med Rev* 1990;4:191-207.
44. Bowman JM. Intrauterine and neonatal transfusion, in *Scientific Basis of Transfusion Medicine*, eds. KC Anderson and PM Ness. Philadelphia: WB Saunders, 1994.
45. Weiner CP, Williamson RA, Wenstrom KD, Sipes SL, Widness A, Grant SS, Estle L. Management of fetal hemolytic disease by cordocentesis. II Outcome of treatment. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165:1302-7.
46. De la Cámara C, Arrieta R, González A, et al. High-dose intravenous immunoglobulin for severe Rh immunization. *N Engl J Med* 1988;318:519-20.
47. Urbaniak SJ, Duncan JI, Armstrong-Fisher SS, et al. Transfer of Anti-D antibodies across the isolated perfused human lobule and inhibition by high dose intravenous immunoglobulin: a possible mechanism of action. *Br J Haematol* 1997;96:186-93.
48. Voto, et al. High-dose gammaglobulin followed by intrauterine transfusion: a new alternative for the treatment of severe hemolytic disease. *J Perinat Med* 1997;25:85-8.
49. Bichler J, Spycher MO, Amstutz HP, Andresen I, Gaede K, Miescher. Pharmacokinetics and safety of recombinant anti-RhD in healthy RhD-negative male volunteers. *Transfus Med* 2004;14(2):165-71.

# MACROGLOBULINEMIA DE WALDENSTRÖM

R. GARCÍA SANZ, M. GONZÁLEZ Y E. OCIO

Servicio de Hematología. Hospital Universitario de Salamanca.

## Introducción

Tradicionalmente se definía la macroglobulinemia de Waldenström como el conjunto de síntomas y signos derivados de la proliferación monoclonal de linfocitos B en médula ósea y órganos linfoides con capacidad para producir grandes cantidades de inmunoglobulina M (IgM), también de tipo monoclonal. Sin embargo, la enfermedad que inicialmente describió Waldenström en 1944<sup>1</sup> ha sufrido diversas modificaciones a lo largo de la historia, ya que su situación nosológica es muy difícil de clarificar, debido a que comparte características comunes con otros síndromes linfoproliferativos de los que a veces es difícil de distinguir, en especial si se trata de procesos con componente monoclonal IgM asociado (tabla 1)<sup>2,3</sup>. Así pues, esta capacidad inmunosecretora hace que mieloma múltiple y macroglobulinemia de Waldenström compartan muchos aspectos etiopatogénicos, que también se traducen en el campo de la fisiopatología y la terapéutica. Sin embargo, en la macroglobulinemia de Waldenström las células clonales no son exclusivamente las células plasmáticas, sino que también los linfocitos B maduros y los linfoplasmocitos forman parte del clon tumoral. Por el contrario, este detalle acerca mucho los conceptos de macroglobulinemia de Wal-

denström y leucemia linfocítica crónica de célula B (LLC-B), máxime si se tienen en cuenta que también comparten otros aspectos. Así pues, en la macroglobulinemia de Waldenström se puede observar leucemización y trisomía del cromosoma 12 y no es raro encontrar casos de LLC-B con componente monoclonal IgM en el suero (prácticamente la mitad de los casos si se utilizan técnicas de inmunofijación). Esta situación se complica aún más si tenemos en cuenta la existencia de la gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) IgM, cuyos límites con la macroglobulinemia de Waldenström son realmente difíciles de situar. Ello ha hecho que la situación de la macroglobulinemia de Waldenström en los síndromes linfoproliferativos haya sido relativamente confusa. De hecho, en la actual clasificación de las neoplasias hematológicas de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la macroglobulinemia de Waldenström aparece dos veces: a) "Linfoma linfoplasmocítico con macroglobulinemia de Waldenström" dentro de los linfomas linfoplasmocíticos, y b) "Macroglobulinemia de Waldenström (inmunocitoma)" encuadrada en las enfermedades inmunosecretoras. Además, a esto había que añadir que, incluso manteniendo la clasificación OMS, los criterios de diagnóstico eran dispares dependiendo de los autores que se consideraran.

Por fortuna, el panorama nosológico de la macroglobulinemia de Waldenström parece estar cambiando, en especial desde la celebración en Atenas del 2.º *Workshop Internacional de macroglobulinemia de Waldenström* en septiembre de 2002, cuyas ponencias y resultados de consenso fueron publicados como el número 2 del volumen 30 de la revista *Seminars in Oncology* en abril de 2003. En dicha reunión se consiguió que los grupos con mayor actividad investigadora en macroglobulinemia de Waldenström llegaran a un consenso en aspectos de la enfermedad: a) definición clinicopatológica de la macroglobulinemia de Waldenström; b) factores pronósticos y criterios para iniciar el tratamiento; c) recomendaciones de tratamiento, en especial en primera línea, y d) uniformidad en los criterios de respuesta al tratamiento. En el presente trabajo abordaremos la patología, clínica y terapéutica de la macroglobulinemia de Waldenström haciendo especial hincapié en

Tabla 1. Enfermedades que pueden cursar con IgM monoclonal

Macroglobulinemia de Waldenström
Sintomática
Asintomática
Gammapatía monoclonal de significado incierto IgM
Leucemia linfocítica crónica con componente IgM
Linfomas no hodgkinianos con componente IgM
Trastornos relacionados con IgM (sin diagnóstico claro de macroglobulinemia de Waldenström)
Crioglobulinemia sintomática
Amiloidosis primaria
Autoinmunidad derivada de anticuerpos IgM (síndrome de aglutininas frías)
Mieloma IgM
Procesos autoinmunes (síndrome de Sjögren, artritis reumatoide)

IgM: inmunoglobulina M.

Tabla 2. Diagnóstico de la MW y trastornos relacionados

	Proteína IgM monoclonal <sup>a</sup>	Infiltración de médula ósea <sup>b</sup>	Síntomas por IgM	Síntomas por infiltración tumoral <sup>f</sup>
MW sintomática	+	+	+ <sup>d</sup>	+ <sup>d</sup>
MW asintomática	+	+	-	-
Trastornos relacionados con paraproteinemia IgM <sup>e</sup>	+	-	+	-
GMSI IgM	+	-	-	-

<sup>a</sup> Se considera inapropiado usar un umbral en la cantidad de inmunoglobulina M (IgM) para distinguir entre gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) y macroglobulinemia de Waldenström (MW).

<sup>b</sup> Si hay infiltración por linfoma linfoplasmocítico hablaremos de MW y si no la hay, de GMSI. En caso de duda para considerar si hay infiltración o no, es obligado acudir a técnicas como la citometría de flujo o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR): si se demuestra la existencia de monoclonalidad linfocito B, se considerará MW mientras que si no la hay, se deberá considerar una GMSI en tanto no haya otros datos.

<sup>c</sup> Incluyen: síntomas constitucionales, citopenias, organomegalias.

<sup>d</sup> Basta la presencia de uno de los dos tipos de síntomas, aunque pueden estar presentes los dos.

<sup>e</sup> Son pacientes con síntomas derivados de la proteína monoclonal IgM pero sin evidencias de linfoma o infiltración medular. Tales pacientes pueden tener crioglobulinemia sintomática, amiloidosis o fenómenos autoinmunes como neuropatía periférica y síndrome de aglutininas frías. Estos pacientes constituyen un grupo diferenciado para el que se ha propuesto el término de "Trastornos relacionados con IgM".

esos 4 aspectos de la enfermedad sobre los que se han conseguido notables avances de consenso.

### Definición clínico-patológica de la macroglobulinemia de Waldenström

La definición clínico-patológica de la macroglobulinemia de Waldenström fue consensuada tomándose como base el espíritu que impulsó el desarrollo de la clasificación REAL y la posterior OMS, es decir, definir una entidad clínica con un sustento patológico real. La definición fue acordada en el primer panel de consenso del Workshop de Atenas, y fue probablemente uno de los mayores logros de la misma<sup>4</sup>. Hay que destacar que en sus criterios se excluye de forma taxativa la fijación de un umbral mínimo de IgM monoclonal en el suero para definir la enfermedad. Este hecho facilitó en gran medida la adopción del consenso, ya que se trata de uno de los puntos que más discrepancias ha generado en la literatura especializada. Así, para diagnosticar una macroglobulinemia de Waldenström, los grupos Francés y del MD Anderson aceptaban una IgM de 5 g/dl, mientras que para los grupos Español y de la Clínica Mayo se exigían 30 g/dl, pasando por los 10 g/dl de los grupos inglés e italiano. Ha habido algunas críticas al respecto, ya que era muy sencillo y cómodo disponer de un nivel de IgM dentro de los criterios de diagnóstico. Sin embargo, aparte de la falta de consenso, este criterio tenía otros dos inconvenientes: a) pese a estar hablando de un número, sigue siendo un criterio subjetivo, ya que resulta muy difícil explicar por qué un paciente con una IgM de 31,1 g/dl tiene una macroglobulinemia de Waldenström mientras que otro con 29,9 no, y b) al utilizar un nivel de IgM se pueden estar diagnosticando como MGUS IgM casos con poca IgM pero que requieren tratamiento, mientras que ello no evita tener que subclasificar los casos por encima del umbral entre macroglobulinemia de Waldenström sintomática y asintomática.

Por ello, la macroglobulinemia de Waldenström ha quedado definida como un "trastorno linfoproliferativo B poco común caracterizado primariamente por la infiltración de la médula ósea por células linfocíticas con patrón predominantemente intertrabecular, junto a la demostración de la presencia de una gammapatía IgM monoclonal". Hay que resaltar que la macroglobulinemia de Waldenström es una entidad clínico-patológica individual y no un síndrome secundario a la secreción de IgM independientemente del diagnóstico patológico subyacente. En la macroglobulinemia de Waldenström, dicha entidad patológica es el linfoma linfoplasmocítico de la clasificación OMS. Por tanto, quedan excluidos de esta definición, los casos con IgM sin infiltración medular (tabla 1) y los casos con ausencia de IgM monoclonal (p. ej., linfoma linfoplasmocítico con IgG e IgA monoclonal).

Es obvio que esta definición deja pendiente la decisión terapéutica, ya que dentro de la misma caben muchos casos de macroglobulinemia de Waldenström que no precisan tratamiento. Para ello, se incluye una subclasificación de macroglobulinemia de Waldenström: asintomática y sintomática, considerando la existencia o no de síntomas atribuibles a la infiltración tumoral (síntomas constitucionales, citopenias, organomegalias) o a la proteína monoclonal (síndrome de hiperviscosidad, crioglobulinemia, amiloidosis, fenómenos inmunes, etc.). Por último, merece la pena hacer una consideración final respecto a la diferencia entre macroglobulinemia de Waldenström asintomática y GMSI IgM, donde hay que recalcar la definición de macroglobulinemia de Waldenström, ya que si no se puede demostrar la existencia de infiltración medular ni de síntomas derivados de la paraproteína, debemos hablar de GMSI, independientemente de la concentración sérica de IgM. Mención aparte merecen los escasos casos que hay en los que la IgM monoclonal genera síntomas sin que se demuestre infiltración medular.

Dada la existencia de síntomas no podemos hablar de GMSI, pero la ausencia del infiltrado ha hecho que se les considere como un grupo aparte denominado "Trastornos Relacionados con IgM"<sup>4</sup>.

### Epidemiología y etiopatogenia

La frecuencia de la macroglobulinemia de Waldenström se desconoce, en especial si tenemos en cuenta que los criterios diagnósticos que se utilizaban no eran comunes, por lo que los datos disponibles deben ser revisados. En EE.UU. se estimaba una incidencia anual de 2 a 5 casos por millón de habitantes<sup>5,6</sup>; en España las estimaciones eran similares (3,1 casos/millón/año)<sup>7</sup>. Afecta sobre todo a pacientes de edad media y avanzada (> 55 años) sin ser excepcional en jóvenes. Es más frecuente en varones (70%) y no tiene predilección étnica, aunque es rara en asiáticos.

Al igual que en otros SLP, su causa se desconoce. Se sabe que hay acumulación familiar de casos, posible asociación con algunos tipajes HLA (antígeno de histocompatibilidad), posible relación con la infección por herpesvirus tipo 8, pero sigue sin haberse encontrado ninguna causa o causas con relación directa. Al igual que en el mieloma múltiple la teoría más extendida es la existencia de un proceso multifásico de transformación neoplásica que va acumulando fenómenos oncogénicos. En esta línea estarían los cambios cromosómicos entre diagnóstico y progresión (aparición de subclones cada vez más agresivos). La citogenética ha hecho pocas aportaciones por el momento, ya que los datos están siendo sometidos a revisión continua. Así pues, la trisomía del cromosoma 12 se considera en la actualidad muy poco frecuente, habiendo sido sustituida por las deleciones de 6q21 (40-60%) en la cabeza de la lista de anomalías cromosómicas en esta entidad<sup>8</sup>. Dicha alteración se ha encontrado fundamentalmente en macroglobulinemia de Waldenström sintomáticas lo que puede indicar que se trate de un criterio de enfermedad avanzada<sup>8</sup>. Además, las aneuploidías y las deleciones en los cromosomas 13q14 y 17p53, frecuentes en mieloma múltiple y LLC-B son muy poco frecuentes (< 5%). Por otro lado, la presencia de traslocaciones que afectan a 14q32 (reordenamientos ilegítimos de la región de *switching*), tan frecuentes en el mieloma múltiple, son excepcionales en la macroglobulinemia de Waldenström<sup>9</sup>. Sin embargo, estudios recientes han descrito la presencia de un 14% de alteraciones de 14q32<sup>10,11</sup>. Además, aunque se han buscado, no se han encontrado las t(14;18), t(11;14) y t(11;18) propias de los linfomas no hodgkinianos (LNH) de las zonas folicular, manto y marginal, respectivamente. En la misma línea está la t(9;14) que está presente en el 50% de los LNH linfoplasmocíticos sin paraproteína IgM, no habiendo sido encontrada hasta la fecha en la macroglobulinemia de Wal-

denström<sup>12</sup>. Todo ello unido, y pese a la escasez de los datos, indica que desde el punto de vista genético, la macroglobulinemia de Waldenström es una entidad biológica claramente separada de otros SLP-B<sup>8</sup>.

Los datos moleculares son también muy escasos, pero van en la misma línea. El estudio del reordenamiento de los genes de las inmunoglobulinas ha permitido saber que las células que inician el clon tumoral en la macroglobulinemia de Waldenström son linfocitos B que han sufrido el proceso de mutación somática pero que no han sido capaces de llevar a cabo el proceso de cambio de clase<sup>13</sup>. Esto situaría a la célula clonotípica cerca de la salida del centro germinal (posfolicular) pero sin haberlo hecho de forma completa, ya que el proceso de cambio de clase tiene lugar al final del proceso de maduración folicular. Sin embargo, hay datos recientes que indican que pese a conservar estas características (mutación somática, *pre-switched*) la célula clonogénica podría provenir de la transformación de una subpoblación linfoide B policlonal extragerminal, rara e inusual<sup>14</sup>. Es decir, se trataría de una célula que probablemente no haya pasado por el centro germinal, completando su maduración de una forma anómala o diferente a la conocida hasta ahora. Si esto se confirma, la macroglobulinemia de Waldenström dejaría de ser una enfermedad rara y poco interesante para transformarse en una de las claves para explicar algunos de los detalles más oscuros de la diferenciación linfoide B.

Otra de las características etiopatogénicas que ha contribuido a reforzar el interés científico en la macroglobulinemia de Waldenström es la heterogeneidad del clon tumoral, que ha permitido aportar nuevas ideas en el estudio de la patogenia de los tumores linfoides. Así pues, en la macroglobulinemia de Waldenström podemos encontrar linfocitos B maduros, linfoplasmocitos y células plasmáticas que son todos pertenecientes al mismo clon tumoral. De ello se concluye que la célula clonogénica no ha perdido la capacidad de diferenciación y va madurando progresivamente. Por otro lado, pese a que la célula tumoral por excelencia en la macroglobulinemia de Waldenström es el linfocito B, la presencia de un componente monoclonal IgM obliga a considerar si la célula plasmática, que es la célula productora de inmunoglobulinas, no tiene un papel más relevante en la etiopatogenia de la macroglobulinemia de Waldenström. No obstante, todavía está pendiente de dilucidar si el componente M está producido exclusivamente por las células plasmáticas o si linfocitos B y linfoplasmocitos participan también en su producción.

### Anatomía patológica e inmunofenotipo

Como ya hemos comentado antes, el cuadro histológico de macroglobulinemia de Waldenström es el del LNH linfoplasmocítico<sup>15</sup>, similar al del LNH

linfocítico de célula pequeña (tipo leucemia linfoblástica crónica, LLC), al que se añaden los linfoplasmocitos. La infiltración tumoral debe afectar a la médula ósea, aunque también puede afectar a otros órganos linfoides y regiones extraganglionares.

En el *medulograma*<sup>16</sup> siempre hay infiltración linfóide (criterio diagnóstico), aunque la intensidad es variable y polimorfa. El aspirado suele ser pobre e incluso seco, por aumento de viscosidad y/o hiperplasia reticulínica. La célula característica es el *linfoplasmocito*, que tiene aspecto de linfocito pequeño con contorno ligeramente triangular, citoplasma escaso e hiperbasófilo y núcleo excéntrico con cromatina densa, pero sin distribución en rueda de carro ni nucléolo. A veces tienen inclusiones PAS+ citoplasmáticas y/o nucleares, denominadas cuerpos de Russell y Dutcher, respectivamente. La naturaleza de estas inclusiones es inmunoglobulínica, indicando la capacidad secretora de estas células. Junto a los linfoplasmocitos también puede haber linfocitos maduros y células plasmáticas, que pueden plantear problemas de diagnóstico diferencial con la LLC-B y el mieloma múltiple. Con los criterios previos al 2.º Wokshop, había un umbral mínimo de infiltración linfóide para establecer el diagnóstico de macroglobulinemia de Waldenström, que variaba según los grupos (20-30%). Sin embargo, el criterio diagnóstico actual se basa en la presencia de infiltración medular por linfoma linfoplasmocítico, con patrón predominantemente intertrabecular. Este criterio exige la práctica de una biopsia ósea que demostrará la presencia de dicha infiltración, aunque si existen dudas, se debe apoyar el diagnóstico con el empleo del inmunofenotipo o la biología molecular.

Una característica de la macroglobulinemia de Waldenström a la que recientemente se le está prestando mucho interés es a la presencia de mastocitos en el aspirado y biopsia medulares, que a diferencia de otras neoplasias linfoides, están aumentados en número en la macroglobulinemia de Waldenström, pero con fenotipo normal<sup>17</sup>. Hasta hace poco, el aumento de mastocitos era un dato recurrente en la macroglobulinemia de Waldenström, pero no se le daba mucho valor biológico o diagnóstico. Estudios del grupo del MD Anderson aún no publicados revelan que los mastocitos tienen una gran importancia en la macroglobulinemia de Waldenström. Al parecer, mastocitos y linfoplasmocitos son dos poblaciones celulares estrechamente relacionadas, ya que en las mastocitosis también es frecuente encontrar un aumento de los linfoplasmocitos. Se ha sugerido que la clave estaría en la molécula *CD40* expresada por los mastocitos, que resultaría decisiva en la patogenia de la macroglobulinemia de Waldenström.

Desde el punto de vista fenotípico<sup>18</sup>, la célula de la macroglobulinemia de Waldenström expresa tanto antígenos propios del linfocito B (inmunoglobulina de superficie [SIg], CD19, CD20, CD22) como de la célula plasmática (CD38, CD9). La SIg más fre-

cuente es IgM pero, como en la LLC-B, un 60% de los casos coexpresan IgD. Sin embargo, se diferencian del linfocito de la LLC-B en que en la macroglobulinemia de Waldenström no forman rosetas con hematíes de ratón y son FMC7+. Además, el antígeno CD5 suele ser negativo (80-95%), y cuando se expresa el caso suele estar leucemizado. El porcentaje de células CD30+, CD71+ y Ki67+ (antígenos de activación y proliferación) es escaso, indicando una baja tasa proliferativa. Con todos estos datos, el consenso es que la célula de la macroglobulinemia de Waldenström es CD19+, CD20+, CD22+, CD79+, CD10-, CD23-, CD103- y CD138-, y aunque suele ser CD5-, su positividad no excluye una macroglobulinemia de Waldenström. En este sentido, cabe recordar aquí los criterios de diagnóstico de la LLC-B, donde cada vez más expertos reconocen que para su diagnóstico basta la presencia de una población linfóide B CD19+, CD5+, CD23+, independientemente de la cifra de linfocitos en sangre periférica<sup>18</sup>; por tanto, la presencia de una población de este tipo en un paciente con IgM monoclonal invalidaría el diagnóstico de macroglobulinemia de Waldenström cambiándolo por el de LLC-B. En cuanto a la posible confusión con el LNH del manto (CD19+, CD5+, CD23-), cabe destacar las que en el LNH del manto la presencia de IgM monoclonal es excepcional, que el cuadro histológico y clínico es muy distinto<sup>19</sup> y que para diagnosticar un LNH del manto cada vez se exige más la presencia de la t(11;14), fácilmente identificable por hibridación *in situ*<sup>20</sup>. Por su parte, se sabe que las células plasmáticas de la macroglobulinemia de Waldenström pertenecen al mismo clon tumoral, aunque su porcentaje es pequeño y en ocasiones puede haber también células plasmáticas residuales normales. Su patrón fenotípico difiere del de las células plasmáticas tanto normales como mielomatosas. Generalmente son CD38+, CD19+ heterogéneas, CD45+, CD56- y CD138- o CD138+ muy débiles, con un CD20+ sólo en el 50% de los casos, y generalmente débil. Como es obvio, son SIg positivas, pero a diferencia del mieloma múltiple, también son SIg positivas (en el 85% de los casos, frente al 35% en el mieloma múltiple)<sup>21</sup>.

La *biopsia ósea* suele mostrar una infiltración intertrabecular, que generalmente es difusa. En la tercera parte de los casos el patrón es nodular, lo que justifica que no haya infiltración en los aspirados de algunos pacientes, hecho favorecido por la frecuente presencia de hiperplasia reticulínica<sup>15,16</sup>.

Antes de la era de la citometría de flujo, la *leucemización* se consideraba rara (< 10% de los casos), pero dado que es frecuente la presencia una linfocitosis moderada que, cuando se analiza por anticuerpos monoclonales o biología molecular, se ve que es monoclonal, este es un dato que debe ser revisado<sup>17</sup>.

Si hay adenopatías biopsiables, la *histología ganglionar* es la del *linfoma linfoplasmocítico* en *Clasificación de la OMS*<sup>15</sup>. El diagnóstico diferencial con el linfoma lin-

focítico de célula pequeña puede ser difícil, en especial si los linfoplasmocitos son escasos o se tiñen mal. El problema se resuelve si se observan las inclusiones PAS+ nucleares o citoplasmáticas que ya descritas. En este punto conviene recordar que todas las macroglobulinemias de Waldenström tienen histología de LNH linfoplasmocítico pero no todos los LNH linfoplasmocíticos pueden ser diagnosticados de macroglobulinemia de Waldenström (sólo el 20-40% de estos LNH tienen infiltración medular y menos del 30% cursan con componente monoclonal sérico, habitualmente IgM, pero también IgG o IgA). En la macroglobulinemia de Waldenström la infiltración por linfocitos maduros y linfoplasmocitos es casi constante en hígado y bazo, frecuente en riñón y rara en otros sitios. No obstante, se ha descrito infiltración en casi cualquier tejido (gastrointestinal, piel, pleuropulmonar, neurológica, etc.).

### Cuadro clínico

La enfermedad generalmente tiene un curso crónico, de modo que puede permanecer estable durante mucho tiempo sin síntomas importantes<sup>7,22-25</sup>. En caso de presentar síntomas, son frecuentes los constitucionales (astenia, anorexia, pérdida de peso) así como de tendencia al sangrado incluso desde varios años antes del diagnóstico. Los casos asintomáticos con pocas probabilidades de progresar se suelen caracterizar por ausencia de anemia (hemoglobina > 12,5 g/dl) y  $\beta_2$ -microglobulina normal, aun teniendo un componente monoclonal muy elevado.

### Motivo de consulta

El síntoma inicial más frecuente es astenia progresiva, generalmente debida a anemia. También puede haber manifestaciones hemorrágicas y neurológicas, así como adenopatías. Finalmente un 10-20% de los casos tienen manifestaciones iniciales inusuales: respiratorias, oculares, insuficiencia renal, síntomas cutáneos, etc.<sup>7,22-26</sup>. El diagnóstico también puede ser casual, al observar un proteinograma con un CM o una velocidad de sedimentación globular (VSG) elevada en un estudio realizado por cualquier causa. Por último, también hay casos de GMSI tipo IgM, que pueden evolucionar a macroglobulinemia de Waldenström ( $\approx 10\%$ ).

### Características clínicas

Los síntomas y signos clínicos pueden clasificarse según se deban al crecimiento tumoral o a la paraproteinemia IgM, aunque en ocasiones una misma manifestación puede tener origen doble.

#### Manifestaciones clínicas dependientes del crecimiento tumoral

Dado que el crecimiento es lento, los síntomas que origina suelen ser leves. Sin embargo, hasta el 50% de los casos tienen un cuadro constitucional más o menos evidente (astenia, anorexia, pérdida de

peso)<sup>7,26</sup>. Además, puede haber síntomas por infiltración linfomatosa en diversos órganos.

**Médula ósea.** Se manifiesta como citopenias. La anemia está presente en más del 50% de los pacientes, pero no hay que olvidar que puede ser falsa por hemodilución secundaria a hipervolemia por hiperviscosidad, que puede llegar a reducir el hematocrito hasta en un 30%. La neutropenia es poco frecuente y por lo general leve. En el 20% de los casos hay trombopenia, también leve, pero junto a otros mecanismos puede favorecer diátesis hemorrágica.

**Órganos linfoides.** La mitad de los pacientes tiene adenopatías palpables, generalmente no muy grandes. La frecuencia sube a dos tercios si se utilizan técnicas de imagen (tomografía computarizada [TC], resonancia magnética [RM]). También hay esplenomegalia en la mitad de los casos, generalmente sin hiperesplenismo. La infiltración periportal es una constante histológica pero sólo  $\approx 35\%$  de los pacientes tienen hepatomegalia palpable, generalmente asintomática.

**Infiltración extraganglionar.** Es frecuente pero sólo en un 10-20% de los enfermos tiene repercusión clínica. Las manifestaciones pleuropulmonares son raras, generalmente como lesiones nodulares asimétricas, de pequeño tamaño y localización basal. La infiltración pleural suele ser bilateral y asociada a la parenquimatosa, siendo en ocasiones el síntoma clínico inicial. La *infiltración del parénquima renal* es frecuente, pero asintomática, traducéndose como un mero aumento del volumen renal. Las *manifestaciones cutáneas por infiltración* son excepcionales (< 3%) en forma de nódulos o pápulas en extremidades y cara. La *osteoporosis* es frecuente, pero probablemente más debida a la edad del paciente que a la enfermedad. El *dolor óseo* es poco frecuente (< 5%) y las *lesiones osteolíticas* son muy raras (< 1%) por lo que su presencia obliga a plantearse el diagnóstico diferencial con el mieloma múltiple IgM. La *infiltración gastrointestinal* también es rara (< 5%) y requiere un diagnóstico diferencial con otras neoplasias, con frecuencia asociadas a la macroglobulinemia de Waldenström. En cambio, las *manifestaciones neurológicas* son frecuentes, pero generalmente tienen un origen central y se deben a hiperviscosidad. La afectación meníngea cursa con IgM monoclonal en líquido cefalorraquídeo y mientras que la infiltración cerebral suele ser multifocal y perivascular, manifestándose a veces como un proceso expansivo intracranial. La neuropatía periférica es frecuente en la macroglobulinemia de Waldenström (25% de los casos), pero además de infiltración del nervio también puede tener otras causas (amiloidosis, actividad anticuerpo de la IgM, lesiones vasculares, etc.).

#### Manifestaciones clínicas dependientes de la paraproteína monoclonal

La macroglobulinemia de Waldenström tiene tendencia a producir hiperviscosidad debido a que la

concentración de la IgM puede ser muy elevada, y a que su gran tamaño molecular y disposición pentamérica le confieren una gran viscosidad intrínseca. Además, la IgM se une con gran facilidad a otros componentes sanguíneos y tisulares favorecida por el alto contenido en hidratos de carbono de la IgM (7%) –facilita la formación de complejos y la precipitación en frío– y por su capacidad funcional como anticuerpo.

**Síndrome de hiperviscosidad.** Más del 70% de los enfermos con macroglobulinemia de Waldenström tienen la viscosidad sanguínea elevada. Sin embargo, las manifestaciones clínicas sólo aparecen cuando la viscosidad es de 5 a 10 veces superior a la normal (20-30% de los casos). El síndrome de hiperviscosidad es raro si la IgM es mayor de 3 g/dl, pero no es constante cuando los niveles son superiores. Parece haber una susceptibilidad individualizada para cada paciente, sin que hay una relación exacta entre tasa de inmunoglobulina y sintomatología.

Las manifestaciones clínicas varían de unos pacientes a otros. Las más llamativas son las *neurológicas y oculares*, que se deben a trastornos circulatorios intracerebrales derivados del estasis sanguíneo. El cuadro clínico suele ser progresivo apareciendo cefalea, confusión, vértigo, somnolencia, estupor y finalmente coma, pudiendo aparecer convulsiones. El cuadro se puede complicar con trombosis o hemorragias intracraneales. Puede aparecer neuropatía periférica progresiva derivada de oclusiones microvasculares en los *vasa nervorum* (síndrome de Bing & Neel). En la retina se observan imágenes de dilatación y restricción vascular (en ristra de salchichas), así como exudados y hemorragias entre otras alteraciones. El oído interno también se puede afectar por trombosis venosas, desarrollándose sordera.

También puede haber *manifestaciones cardíacas*, ya que la hiperviscosidad puede precipitar una insuficiencia cardíaca, sobre todo en ancianos. Su patogenia es multifactorial, ya que al aumento de la resistencia al flujo sanguíneo se pueden unir la hipervolemia y la anemia. En caso de transfundir concentrados de hematíes hay que hacerlo con precaución, ya que se incrementa la viscosidad sanguínea y ello puede agravar una cardiopatía previa o incluso precipitar un episodio de insuficiencia cardíaca aguda.

Finalmente, son frecuentes las *manifestaciones hemorrágicas*, debidas al estasis sanguíneo capilar, agravadas además por factores como trombopenia, trombopatía y coagulopatía.

**Crioglobulinemias.** El 10-20% de los pacientes presentan una paraproteína con características de crioglobulina monoclonal (tipo I) o mixta monoclonal y policlonal (tipo II), pero pocos tienen manifestaciones clínicas. Los síntomas se deben a la crioprecipitación en capilares cutáneos: fenómeno de Raynaud, necrosis acra (oreja, nariz, dedos) y púrpura vascular en extremidades inferiores. Con menor frecuencia aparece urticaria, acrocianosis, úlceras su-

pramaleolares y *livedo reticularis*, y en otros órganos, artralgias o insuficiencia renal.

**Clínica por actividad anticuerpos e interacción con otras proteínas<sup>27</sup>.** Este mecanismo patogénico puede afectar a diferentes órganos y sistemas. En la coagulación puede favorecer la diátesis hemorrágica por trastornos de agregación derivados del recubrimiento de las plaquetas por la paraproteína, así como por defectos de coagulación (interacción entre la IgM y algunos factores). Las hemorragias pueden ser de cualquier tipo, pero predominan la púrpura petequeal y las hemorragias retinianas y mucosas. La paraproteína puede tener actividad anticoagulante lúpico, favoreciendo en este caso la trombosis. En el campo de la inmunohematología se han descrito síndromes por aglutininas frías e inmunodeficiencia por interferir en el sistema del complemento.

Como ya se ha mencionado, puede haber trastornos neurológicos por este mecanismo. Se ha descrito hasta un 5-10% de casos de macroglobulinemia de Waldenström en los que la IgM tiene actividad anticuerpo anti-MAG (glucoproteína asociada a mielina), que puede provocar polineuropatía periférica desmielinizante. Este mecanismo, unido a otros hace que la prevalencia de *neuropatía periférica* en la macroglobulinemia de Waldenström sea de hasta un 25%.

La insuficiencia renal y la amiloidosis son raras, así como las alteraciones articulares, poliartalgias son raras, pese a que el factor reumatoide es frecuente ( $\approx 30\%$  de los casos). Finalmente, se han descrito casos ocasionales de *edema angioneurótico* (actividad anticuerpo antiinhibidor de la fracción C1s del complemento), *malabsorción* (depósito de IgM en intestino delgado) y *lesiones papulosas nodulares* (depósito intradérmico de IgM).

## Datos biológicos y exploraciones complementarias

### Hematología

El 60-70% de los enfermos tienen anemia normocítica con escasa respuesta reticulocitaria, aunque puede haber mecanismos periféricos (sangrado, aglutininas frías o hemodilución). Los leucocitos son normales, pero hay linfocitosis moderada ( $> 4.10^9/l$ ) en un tercio de los pacientes y no es infrecuente la neutropenia leve. Hay trombopenia en menos del 20% de los casos, generalmente de mecanismo central. En el frotis son característicos los hematíes en pilas de monedas (fenómeno de *rouleaux*) por la paraproteinemia y pueden observarse linfoplasmocitos<sup>16</sup>.

También hay trastornos de la función plaquetaria (tiempo de hemorragia alargado, retracción de coágulo alterada) pudiendo acompañarse de los déficit de diversos factores.

### Estudios proteicos

Las proteínas totales están aumentadas por la paraproteína IgM, con aceleración de la VSG. La elec-

troforesis pone de manifiesto la existencia de una banda monoclonal cuya identificación se hará por inmunolectroforesis o inmunofijación. La cuantificación nefelométrica de IgM puede discrepar de la medición de medida por electroforesis debido a errores de dilución. En este caso es más fiable la cuantificación mediante electroforesis. Las inmunoglobulinas policlonales (IgG e IgA) suelen ser normales, pero pueden estar bajas o más raramente, altas. Ocasionalmente (5%) puede observarse un pico monoclonal doble (por la presencia de un segundo componente monoclonal IgM o de otro tipo: IgG, IgA, IgE o cadenas  $\gamma$ ). En la tercera parte de los enfermos hay proteinuria de Bence-Jones, en general escasa (< 2 g/24 h). Además, la IgM puede comportarse crioglobulina (20-30%), piroglobulina (a 50-60 °C precipita de forma irreversible) o como aglutinina fría (contra los grupos sanguíneos II). Puede dar pruebas cruzadas positivas por unión inespecífica de la IgM a los hematíes.

#### **Aspirado y/o biopsia de médula ósea**

Aún en pacientes ancianos, su realización es imprescindible ya que es criterio diagnóstico de macroglobulinemia de Waldenström. Ya hemos comentado que sus hallazgos característicos son infiltración linfoide polimorfa (linfoplasmocitos, linfocitos y plasmocitos maduros), pero monoclonal, presencia de mastocitos y fibrosis reticulínica.

#### **Exploraciones complementarias**

En ocasiones pueden ser necesarias exploraciones complementarias como la *biopsia ganglionar*, estudio de fondo de ojo, estudio de amiloide, *electromiograma*, *biopsia del nervio sural*, etc., que arrojarán resultados compatibles con infiltración tumoral o acumulación de inmunoglobulina monoclonal.

#### **Diagnóstico diferencial**

Como ya hemos comentado, el diagnóstico de macroglobulinemia de Waldenström se apoya en la presencia de una componente M sérico IgM e infiltración medular linfoide. El diagnóstico diferencial más difícil se plantea con la LLC-B y el linfoma con componente monoclonal IgM asociado. El estudio inmunofenotípico es imprescindible para distinguir la LLC-B, mientras que el LNH se distinguirá por la biopsia ganglionar, y si se trata de un linfoplasmocítico, por la presencia o no de la IgM y la presencia o no de la infiltración medular.

Dadas las implicaciones que tiene en la práctica clínica, el mayor problema es la distinción entre macroglobulinemia de Waldenström y GMSI tipo IgM. Esta última se caracteriza por la presencia asintomática de componente monoclonal IgM con ausencia de infiltración medular. Este último aspecto es la única diferencia con la macroglobulinemia de Waldenström asintomática, que no obstante puede tener un comportamiento semejante al de la GMSI.

Según datos del grupo español de macroglobulinemia de Waldenström, los casos de macroglobulinemia de Waldenström asintomática con poca probabilidad de progresar son los que tienen una hemoglobina (Hb)  $\geq 12,5$  g/dl y una  $\beta_2$ -microglobulina normal; más de la mitad de ellos no precisará tratamiento a lo largo de 6 años de evolución; por el contrario, casi todos los demás pacientes suelen necesitar tratamiento antes de transcurrir un año desde el diagnóstico<sup>7,28</sup>.

Finalmente, hay otras dos entidades que deben ser tenidas en cuenta en el diagnóstico diferencial, que son la enfermedad de cadenas pesadas  $\mu$  o de enfermedad de Franklin (más próxima a LLC-B) y el mieloma IgM. En la enfermedad de cadenas  $\mu$ , la IgM carece de cadenas ligeras<sup>29</sup> y en el mieloma múltiple<sup>30</sup> IgM hay infiltración medular por células plasmáticas y lesiones osteolíticas, lo que facilita del diagnóstico definitivo.

#### **Tratamiento**

##### **Indicación de tratamiento**

Una de las áreas de debate que mayor controversia ha desatado hasta la fecha en la macroglobulinemia de Waldenström ha sido la decisión de cuándo empezar a tratar a los pacientes. En muchas ocasiones se ha valorado la posibilidad de iniciar un tratamiento precoz con la esperanza de que pudiera ofrecer mejores resultados. Por otro lado, hay casos en los que la paraproteína aumenta progresivamente hasta niveles muy elevados en los que no es raro caer en la tentación de tratar pacientes asintomáticos basándose sólo en el criterio de excesivo componente M. Sin embargo, en la actualidad se ha llegado al consenso de que los pacientes con macroglobulinemia asintomática o *smoldering* deben ser identificados y mantenidos sin tratamiento, ya que permanecen estables durante muchos años. Esto ya fue advertido por el propio Jan Waldenström con su máxima "*let well alone*", enfatizando que nunca se debe tratar a un paciente con el objetivo de normalizar los valores de laboratorio, sino que se debía escuchar al paciente y llevar a cabo una exploración física cuidadosa. Por todo, el segundo panel de consenso en macroglobulinemia de Waldenström del 2.º *Workshop Internacional de macroglobulinemia de Waldenström*<sup>31</sup> recomienda iniciar el tratamiento en pacientes en los que se demuestra una Hb  $\leq 10$  g/dl y/o plaquetas inferior a  $100 \times 10^9/l$  atribuibles a la enfermedad, presencia de adenopatías bulky, organomegalias sintomáticas o cualquier sintomatología lo suficientemente seria como para justificar el tratamiento, incluyendo fiebre recurrente, sudoración nocturna, pérdida de peso, fatiga, o manifestaciones asociadas a macroglobulinemia de Waldenström como hiperviscosidad, neuropatía sintomática, nefropatía, amiloidosis, crioglobulinemia o transformación de la enfermedad (a formas agresivas). Si no

se dan estas circunstancias la abstención terapéutica vigilada es lo más razonable.

En el seguimiento también se dan algunas recomendaciones. Así, se considera razonable ver a los pacientes cada 3 a 6 meses. Si el diagnóstico es de GMSI IgM, los niveles de IgM deben ser vueltos a evaluar a los 3 meses y si se demuestra su estabilidad, se puede reducir la frecuencia de las revisiones a una vez cada año.

#### Tratamiento de primera línea

Hasta hace poco tiempo, el tratamiento de primera elección era un agente alquilante. Sin embargo, y pese a que no hay ninguna demostración de que las nuevas terapéuticas son más eficaces (en supervivencia global y libre de progresión), el tercer panel de consenso del 2.º *Workshop Internacional de macroglobulinemia de Waldenström*<sup>32</sup> acordó que en la actualidad se deben considerar como razonable el administrar como primera línea de tratamiento hasta tres tipos distintos de estrategia: agente alquilante, análogos de los nucleósidos y el AcMo Rituximab. Además, lo expertos consideraron que no hay ninguna base para considerar un tratamiento mejor que otro, pero que en pacientes jóvenes y posibles candidatos a tratamiento con altas dosis de quimioterapia y rescate con células progenitoras autólogas, el tratamiento debe ser bien evaluado, tratando de

limitar al máximo el empleo de alquilantes y análogos de las purinas. Asimismo, los expertos no se olvidan de recomendar la inclusión de este tipo de pacientes en ensayos clínicos controlados.

Antes de comentar estas tres líneas de tratamiento, es necesario hacer algún comentario. En primer lugar, no debemos olvidar que el tratamiento más barato es el alquilante. Por ello, en ausencia de ensayo clínico, parece que es el más recomendable. Además, los análogos de las purinas han demostrado su eficacia como segunda línea, sin que se sepa como funcionan los alquilantes en este caso, por lo que este argumento también apoya la utilización de los análogos de las purinas fármacos como segunda línea. Finalmente, los datos que hay sobre anti-CD20 son todavía escasos, con series de pocos pacientes y esquemas heterogéneos, por lo que su verdadera utilidad en primera línea puede ser puesta en cuestión, máxime si tenemos en cuenta su mayor precio.

#### Agentes alquilantes

Tanto el clorambucilo, como la ciclofosfamida y el melfalán, solos o en combinación con prednisona han demostrado su eficacia a lo largo del tiempo. El fármaco más utilizado ha sido el clorambucilo en monoterapia continua o cíclica, sin prednisona o con ella (tabla 3)<sup>7,33,34</sup>. La asociación de esteroides

Tabla 3. Esquemas de uso de los principales fármacos activos en macroglobulinemia de Waldenström

Fármaco	Dosis	Vía	Días		
Clorambucilo	Monoterapia	LEUK	0,1 mg/kg/día	Oral	Continuo (6-12 meses)
		LEUK	0,3 mg/kg/día	Oral	7 días cada 6 semanas
	Con prednisona	LEUK	40 mg/m <sup>2</sup> /día	Oral	1 día cada 28 días
		LEUK	0,4 mg/kg/día	Oral	2 días cada 2 semanas
		LEUK	12 mg/m <sup>2</sup> /día	Oral	7 días de cada 28 días
		PDN	30 mg/m <sup>2</sup> /día		
		LEUK	0,4 mg/kg/día	Oral	5-6, cada 2 semanas 1-4, cada 2 semanas
		PDN	60 mg/m <sup>2</sup> /día		
Melfalán y prednisona	MF	9 mg/m <sup>2</sup> /día	Oral	1-4, cada 28 días	
	PDN	60 mg/m <sup>2</sup> /día			
Ciclofosfamida	CTX	50 mg/día	Oral	Continuo	
	CTX	150 mg/día	Oral	7 días cada 2-4 semanas	
Fludarabina	FLD	30 mg/m <sup>2</sup> /día	IV	5 días cada 4 semanas	
	FLD	50 mg/m <sup>2</sup> /día	Oral	5 días cada 4 semanas	
2-cloro-desoxi-adenosina	2CdA	0,12 mg/m <sup>2</sup> /día	IV	5 días, 1-2 cursos (6 sem)	
	2CdA	0,10 mg/m <sup>2</sup> /día	IV		
	PDN	60 mg/m <sup>2</sup> /día	Oral	7 días, 1-2 cursos (6 sem)	
	2CdA	1,5 mg/m <sup>2</sup> /8 h	SC	7 días, 1-2 cursos (6 sem)	
	CTX	40 mg/m <sup>2</sup> /12 h	Oral		
Anti-CD20	Rituximab	375 mg/m <sup>2</sup> /día	IV	Cada 7 días, 4 semanas	

IV: intravenosa.

no ha demostrado ningún beneficio, excepto en los casos con anemia hemolítica o con crioglobulinas o crioaglutininas<sup>34</sup>. En España el régimen que más se ha utilizado es el que diseñó el grupo PETHEMA para el tratamiento de la LLC. Con estos esquemas o algún otro semejante, las dos terceras partes de los pacientes responden al tratamiento en 6 meses (se han publicado tasas del 68 al 100%). En el estudio español, el 71% de los pacientes tratados con esta fórmula alcanzó algún grado respuesta (completa, parcial o menor). La duración de la respuesta es variable –de pocos meses a 6 u 8 años– con una mediana en torno a los 4 años y un 43% de pacientes libres de progresión a los 5 años (28% a los 10 años). Ninguna de las pautas de clorambucilo parece superior, algo observado incluso en estudios aleatorizados como el llevado a cabo en la clínica Mayo, en el que se comparó una pauta continua con otra intermitente. En pacientes con intolerancia al clorambucilo, se puede sustituir por ciclofosfamida (50-150 mg/día).

#### *Análogos de las purinas*

A pesar de la eficacia de los alquilantes y de que no hay ninguna prueba definitiva de que haya algún otro fármaco superior, cada vez se tiende más a considerar a los análogos de las purinas como tratamiento de primera elección en la macroglobulinemia de Waldenström. Ello se base en la eficacia que han mostrado en pacientes refractarios donde se consigue un 40-60% de respuestas en pacientes que habían recibido tratamiento previo con alquilantes<sup>35-45</sup>.

Con fludarabina la tasa de respuestas es muy variable, desde el 38 al 100%<sup>35-39</sup>, si bien esto depende tanto de los criterios de inclusión de los pacientes como de los de evaluación de la respuesta al tratamiento, y aunque se empiezan a proporcionar casos de remisión completa, su tasa es muy baja (3-5%). Los resultados con 2-CdA parecen ser ligeramente superiores a primera vista<sup>40-45</sup>. Así, en primera línea la tasa de respuestas es del 85-95% (12% completas) dependiendo del régimen y las drogas acompañantes (sola, prednisona, ciclofosfamida, anti-CD20) con la ventaja añadida de que precisa un menor número de cursos (en torno a 2) y que su toxicidad es tolerable (descenso de CD4+, algunos casos de infecciones virales). Además, en caso de recaída, la mayoría de los pacientes vuelve a responder.

Hay que recalcar que la respuesta suele ser mucho más rápida con estos fármacos que con los alquilantes, por lo que se ha propuesto su utilización preferente en los casos con mucha masa tumoral o muy sintomáticos (hiperviscosidad, pancitopenia o neuropatía periférica)<sup>32</sup>. Sin embargo también se han descrito casos con repuesta tardía, hasta 12 meses tras el inicio del tratamiento.

#### *Anticuerpos monoclonales*

Con rituximab los estudios son relativamente escasos en primera línea. El grupo Griego ha publica-

do en una serie de 17 pacientes tratados con anti-CD20, alcanzando respuesta parcial en el 35% de los casos y enfermedad estable en el 47%<sup>46</sup>. Casi al mismo tiempo se publicó una ampliación de dicha serie con 27 pacientes tratados, con una tasa de respuestas similar<sup>47</sup>. Por su parte, el grupo de la clínica Mayo ha comunicado un excelente 94% de respuestas globales (18% completas) en pacientes tratados con una combinación de 2-CdA, ciclofosfamida y rituximab<sup>45</sup>. Un detalle importante con respecto al tratamiento con anti-CD20 es que durante su uso se pueden producir incrementos abruptos pero transitorios en el nivel de IgM, que tienen el riesgo de producir hiperviscosidad<sup>32</sup>.

Finalmente, cabe repetir que no hay datos suficientes para afirmar que una de estas estrategias es mejor que la otra. Además, cabe decir que tampoco hay datos suficientes para defender que alguno de los dos análogos de las purinas sea mejor y que las combinaciones de varios fármacos de los antes descritos pueden ser utilizadas sólo en el contexto de ensayos clínicos controlados.

#### *Tratamiento de segunda línea o posterior*

En pacientes en recaída o con enfermedad refractaria es razonable utilizar una de las estrategias de primera línea alternativa a la ya utilizada. En caso de recaídas después de respuestas duraderas (más de un año) la reutilización de la misma línea empleada al principio también es razonable. De nuevo conviene repetir que si se contempla el uso de dosis altas de quimioterapia y rescate con trasplante autólogo, se debe minimizar la exposición a alquilantes y análogos de las purinas. En pacientes refractarios a un análogo de las purinas suele haber resistencia cruzada al otro, aunque se han documentado casos de respuesta<sup>32</sup>.

El empleo de combinaciones de poli-quimioterapia no parece recomendable en primera línea, pero sí podrían estar indicados regímenes como CVP, CHOP, CAP, M2 y VAD en pacientes refractarios a tratamiento inicial si los pacientes pueden tolerar tal tipo de tratamientos<sup>32,48,49</sup>. Hay algunas publicaciones con buenos resultados utilizando talidomida sola<sup>50</sup> o en combinación con dexametasona y/o claritromicina<sup>51</sup>, y ya hay también algunos datos esperanzadores con análogos de la talidomida como el REVIMID<sup>52</sup>. También hay publicaciones anecdóticas de respuestas a dosis altas de dexametasona o a interferón alfa<sup>32</sup>.

Al igual que en otras enfermedades hematológicas, en algunos enfermos jóvenes y refractarios a otros tratamientos también se han ensayado las dosis altas de quimioterapia seguidas de trasplante de progenitores hematopoyéticos tanto autólogos como alogénicos<sup>53-56</sup>. Sin embargo, esta información se restringe a la publicación de casos aislados o series con menos de 10 casos. En el 2.º Workshop internacional de Atenas se recopilaron 6 series con 24 casos hubo 9 respuestas completas (RC) y

14 respuestas parciales (RP), pero hay una selección evidente<sup>56</sup>. De hecho, no hay datos a largo plazo de 5 casos, y de los 19 restantes sólo se puede concluir que 15 estaban vivos entre 5 meses y 11 años. En cuanto a 6 pacientes sometidos a trasplante alogénico, hubo 2 muertes precoces y un fallo de injerto. Los tres restantes obtuvieron dos RP y una RC. El grupo francés dispone de una serie más homogénea<sup>55</sup>, con 19 trasplantes autólogos y 10 alogénicos, casi todos con acondicionamiento de intensidad reducida. Dentro de los autólogos se contabilizó un 95 % de respuestas globales, incluyendo un 55 % de respuestas mayores y 12 pacientes largo supervivientes. En los alogénicos la respuesta global fue del 80 % con un 70 % de respuestas mayores, pero con una mortalidad relacionada con el procedimiento del 40 %.

Por último, se están ensayando nuevos fármacos muy prometedores, tales como análogos de la talidomida (REVIMID, ACTIMID)<sup>52</sup>, anticuerpos monoclonales sencillos o marcados con isótopos radioactivos (alemtuzumab, anti-CD22, Zevalin<sup>®</sup>)<sup>52,57</sup>, oligonucleótidos antisentido (para BCL-2)<sup>58</sup>, bortezomib,<sup>59</sup> etc., que tienen un gran potencial en la macroglobulinemia de Waldenström.

#### Tratamiento de soporte

En los pacientes que presentan síntomas de hiperviscosidad, el tratamiento de elección es la plasmaféresis precoz, que es muy eficaz dado que la IgM es mayoritariamente intravascular. Las plasmaféresis deben ser diarias hasta que desaparezca la sintomatología, y después deben repetirse cada 1 o 2 semanas. Al mismo tiempo, se debe iniciar tratamiento citostático para reducir la producción de IgM. En algunos enfermos la plasmaféresis puede estar indicada durante bastante tiempo, incluso indefinidamente si la quimioterapia no es eficaz y se mantiene clínica de hiperviscosidad<sup>32</sup>.

Otras medidas de soporte incluyen el empleo de factores de crecimiento (G-CSF [factor estimulante de colonias de granulocitos], agentes eritropoyéticos, transfusiones) en caso de citopenias sintomáticas, así como el empleo de antibióticos, analgésicos, fármacos de acción central, etc., en caso necesario.

#### Criterios de respuesta

La respuesta al tratamiento fue otro de los puntos de consenso más relevantes del 2.º *Workshop Internacional de macroglobulinemia de Waldenström*<sup>60</sup>, ya que hasta la fecha había sido otro de los principales puntos de desencuentro entre los diferentes grupos, no sólo en los criterios de respuesta sino también en cuanto a los métodos para determinarla. En el consenso alcanzado no sólo se consiguió acordar unos criterios concretos para definir la respuesta, sino que además se dieron varias recomendaciones para determinarla. Así pues, se recomendó usar la electroforesis mejor que la nefelometría para medir

la proteína monoclonal, incluir la TC como necesaria para definir la respuesta (no así la RM o la tomografía por emisión de positrones [PET]), etc. Así mismo, se consideró que, a diferencia de las leucemias agudas, no es necesario el requisito de la recuperación hematológica en la definición de la respuesta al tratamiento, dado que la presencia de una o varias citopenias puede estar relacionada con muchos mecanismos y no sólo la presencia de la macroglobulinemia de Waldenström.

En cuanto a la respuesta quedó definida como:

*Respuesta completa (RC)*. Desaparición del componente monoclonal en suero y en orina determinado por inmunofijación, resolución de adenopatías y organomegalias, desaparición de signos y síntomas atribuibles a la macroglobulinemia de Waldenström (fiebre no explicada  $\geq 38,4$  °C, sudoración nocturna, pérdida de peso  $\geq 10$  % del total corporal, hiperviscosidad o crioglobulinemia sintomática) y ausencia de células malignas mediante evaluación histológica de la médula ósea. Se debe confirmar a las 6 semanas.

*Respuesta parcial (RP)*. Reducción del componente monoclonal sérico en 50 % o más medido con electroforesis y reducción en 50 % o más de las organomegalias y adenopatías medido por TC, sin aparición de síntomas o signos nuevos.

*No evaluable (NE)*. Datos o tiempo transcurrido insuficientes como para determinar la respuesta.

*Enfermedad progresiva (EP)*. Incremento del componente M en suero superior al 25 % del nivel más bajo alcanzado en la respuesta (medido por electroforesis) confirmado al menos en otra investigación posterior, o progresión clínicamente significativa de los signos y síntomas relacionados.

*Recaída tras RC*. Reparición del componente monoclonal sérico determinado por inmunofijación, confirmado por al menos otra investigación, o progresión de síntomas atribuibles a la macroglobulinemia de Waldenström o aparición de nuevos. El grupo también acordó puntualizar que en estos casos, recaída no equivale a necesidad de reiniciar el tratamiento. En este punto conviene recordar los criterios establecidos antes para iniciar el tratamiento.

#### Evolución y pronóstico

La evolución de la macroglobulinemia de Waldenström varía, desde casos que permanecen estables durante años a otros con comportamiento clínico agresivo y supervivencia superior a un año. En general, la macroglobulinemia de Waldenström tiene un curso crónico pero progresivo (salvo casos raros de remisiones espontáneas, duraderas o temporales, coincidiendo con procesos infecciosos). Muchas variables pueden actuar como factores pronósticos, siendo las más importantes la presencia de enfermedad sintomática, edad avanzada, anemia y o niveles elevados de  $\beta_2M$ , que confieren un pronós-

tico adverso a la supervivencia<sup>7,24-28,31,61,62</sup>. Por otro lado, el pronóstico también es mejor en los pacientes que responden al tratamiento, siendo la respuesta más prolongada en los enfermos tratados con clorambucilo respecto a COP y en los de edad inferior a 65 años o con ausencia de síntomas B al diagnóstico.

Hasta hace poco se creía que las causas de muerte más frecuentes eran las relacionadas con la progresión de la enfermedad (hiperviscosidad, hemorragia, anemia hemolítica, etc.) y los procesos infecciosos. Sin embargo, estudios recientes<sup>62-64</sup> indican que la tercera parte de los pacientes fallecen a consecuencia del desarrollo de otras neoplasias, entre las que destacan el cáncer de pulmón (la cuarta parte de todas las neoplasias de estos pacientes), síndrome mielodisplásico y cáncer de colon. Inicialmente se creía que la aparición de estas neoplasias era más frecuente en pacientes que habían recibido mucho tratamiento, pero esto no está tan claro. Por último, es frecuente la transformación a linfoma de inmunoblastos (6% de todas las muertes, 19% de los casos de segundas neoplasias), que generalmente se acompaña de aumento de las masas tumorales linfoides y disminución del CM sérico.

## Bibliografía

- Waldenström J. Incipient myelomatosis or essential hyperglobulinemia with fibrinogenemia - A new syndrome? *Acta Med Scand* 1944;117: 217-47.
- González M, Caballero MD. Macroglobulinemia de Waldenström. En: López-Borrascas A, Arocha CL, Campos CC, Parreira A, Pavlovsky S, Ruiz-Argüelles G, San Miguel JF, editores. *Enciclopedia iberoamericana de hematología*, Ediciones Universidad de Salamanca 1992, Salamanca España. PP II-57-567.
- García-Sanz R, San Miguel JF. Macroglobulinemia de Waldenström. En: García-Conde J, San Miguel JF, Sierra J, Urbano-Ispizua A, Vicente V, Vives-corrons JL, editores. *Hematología*. Madrid: Arán, 2004; p. 933-40.
- Owen RG, Treon SP, Al-Katib A, et al. Clinopathological definition of Waldenström macroglobulinemia: Consensus panel recommendations from the international workshop Waldenström macroglobulinemia. *Sem Oncol* 2003;30:110-5.
- Herrinton LJ, Weiss NS. Incidence of Waldenström's macroglobulinemia. *Blood* 1993;10:3148-50.
- Groves FD, Travis LB, Devesa SS, Ries LAG, Fraumeni JF. Waldenström's macroglobulinemia. Incidence patterns in the United States, 1988-1994. *Cancer* 1998;82:1078-81.
- García-Sanz R, Montoto S, Torreguadrada A, et al. Waldenström Macroglobulinemia: Presenting features and outcome in a series with 217 cases. *Br J Haematol* 2001;115:575-82.
- Schop RFJ, Fonseca R. Genetics and cytogenetics of Waldenström Macroglobulinemia. *Sem Oncol* 2003;30:142-5.
- Avet-Loiseau H, Garand R, Lode L, et al. 14q32 Translocations discriminate IgM multiple myeloma from Waldenström's macroglobulinemia. *Semin Oncol* 2003;30:153-5.
- Chang H, Samiee S, Li D, et al. Analysis of IgH translocations, chromosome 13q14 and 17p13.1(p53) deletions by fluorescence in situ hybridization in Waldenström's macroglobulinemia: a single center study of 22 cases *Leukemia* 2004;18:1160-2.
- Ocio EM, González B, Castellanos M, et al. Molecular Cytogenetics in Waldenström's Macroglobulinemia. 45<sup>th</sup> annual meeting of the American Society of Hematology 2003;102(Suppl):2532-5a.
- Offit, et al. *Blood* 03.
- Sahota SS, Forconi F, Ottensmeier CH, et al. Typical Waldenström macroglobulinemia is derived from a B-cell arrested after cessation of somatic mutation but prior to isotype switch events. *Blood* 2002;100: 1505-7.
- Kriangkum J, Taylor BJ, Treon SP, et al. Clonotypic IgH VDJ sequence analysis in Waldenström's macroglobulinemia suggests an unusual B cell origin and expansion of polyclonal B cells in peripheral blood. *Blood First Edition Paper*, prepublished online February 5, 2004; DOI 10.1182/blood-2003-11-4024.
- Berger F, Isaacson PG, Piris MA, Harris NL. Lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenström macroglobulinemia. En: Jaffe ESD, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, editors. *Pathology and Genetics: Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. World Health Organization (WHO) Blue Books on the web. ([www.iarc.fr/who-bluebooks](http://www.iarc.fr/who-bluebooks)). pp 132-7.
- Woessner S, Florensa L, eds. *La citología óptica en el diagnóstico hematológico*. 4.ª ed. Fundación Española de Hematología y Hemoterapia. Madrid: Ediciones Acción Médica, 2000; p. 455-7.
- San Miguel JF, Vidriales MB, Ocio E, et al. Immunophenotypic analysis of Waldenström's Macroglobulinemia. *Sem Oncol* 2003;30:187-95.
- Kay NE, Hamblin TJ, Jelinek DF. Chronic lymphocytic leukemia. *Hematology* 2002;2002:193-213.
- Swerdlow SH, Berger F, Isaacson PI, Müller-Hermelink HK. Mantle cell lymphoma. En: Jaffe ESD, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, editors. *Pathology and Genetics: Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. World Health Organization (WHO) Blue Books on the web. ([www.iarc.fr/who-bluebooks](http://www.iarc.fr/who-bluebooks)). p. 168-70.
- Haralambieva E, Kleiverda K, Mason DY, et al. Detection of three common translocation breakpoints in non-Hodgkin's lymphomas by fluorescence in situ hybridization on routine paraffin-embedded tissue sections. *J Pathol* 2002;198:163-70.
- Ocqueteau M, San Miguel JF, González M, Almeida J, Orfao A. Do myelomatous plasma cells really express surface immunoglobulins? *Haematologica* 1996;81:460-3.
- Kyle RA, Treon SP, Alexanian R, et al. Prognostic markers as criteria to initiate therapy in Waldenström macroglobulinemia: Consensus panel recommendations from the second international Workshop on Waldenström Macroglobulinemia. *Sem Oncol* 2003;30:116-20.
- Dhodapkar MV, Jacobson JL, Gertz MA, et al. Prognostic factors and response to fludarabine therapy in patients with Waldenström macroglobulinemia: results of United States intergroup trial (Southwest Oncology Group S9003). *Blood* 2001;98:41-8.
- Dimopoulos MA, Alexanian R. Waldenström macroglobulinemia. *Blood* 1994;83:1452-9.
- Alexanian R, Weber D, Delasalle K, et al. Asymptomatic Waldenström's disease. *Sem Oncol* 2003;30:206-10.
- Merlini G. Waldenström's Macroglobulinemia: Clinical Manifestations and Prognosis. *ASH Education Program Book* 1999;358-69.
- Stone MJ, McElroy Y, Pestronk A, et al. Human monoclonal macroglobulins with antibody activity. *Sem Oncol* 2003;30:318-44.
- Morel P, Monconduit M, Jacomy D. Prognostic factors in Waldenström macroglobulinemia: a report on 232 patients with the description of a new scoring system and its validation on 253 other patients. *Blood* 2000;96:852-8.
- Witzig TE, Wahnner-Roedler DL. Heavy chain disease. *Curr Treat Options Oncol* 2002;3:247-54.
- Avet-Loiseau H, Garand R, Lode L, et al. Translocation t(11;14) (q13;q32) is the hallmark of IgM, IgE, and nonsecretory multiple myeloma variants. *Blood* 2003;101:1570-1.
- Gobbi PG, Bettini R, Montecucco C. Study of prognosis in Waldenström's macroglobulinemia: a proposal for a simple binary classification with clinical and investigational utility. *Blood* 1993;83:2939-45.
- Gertz MA, Anagnostopoulos A, Anderson K, et al. Treatment recommendations in Waldenström macroglobulinemia: Consensus panel recommendations from the second international Workshop on Waldenström Macroglobulinemia. *Sem Oncol* 2003;30:121-6.
- Kyle RA, Greipp PR, Gertz MA. Waldenström's macroglobulinemia: a prospective study comparing daily with intermittent oral chlorambucil. *Br J Haematol* 2000;108:737-42.
- Buckle RM, Jenkins GC, Mills GL. Waldenström's macroglobulinemia treated with cyclophosphamide and chlorambucil. *J Clin Pathol* 1996; 19:55-9.
- Foran JM, Rohatiner AZ, Coiffier B, Barbuti T, Johnson SA, Hiddemann W, et al. Multicenter phase II study of fludarabine phosphate for patients with newly diagnosed lymphoplasmacytoid lymphoma, Waldenström's macroglobulinemia, and mantle-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 1999;17:546-53.
- Leblond V, Ben-Othman T, Deconinck E. Activity of fludarabine in previously treated Waldenström's macroglobulinemia: a report of 71 cases. *Groupe Cooperatif Macroglobulinemie*. *J Clin Oncol* 1998;16: 2060-4.
- Leblond V, Cloquet S. Fludarabine in Waldenström's macroglobulinemia. *Sem Oncol* 2003;30:239-42.
- Zinzani PL, Gherlinzoni F, Bendandi M. Fludarabine treatment in resistant Waldenström's macroglobulinemia. *Eur J Haematol* 1995;54: 120-3.
- Foran JM, Rohatiner AZ, Coiffier B, et al. Multicenter phase II study of fludarabine phosphate for patients with newly diagnosed lymphoplasmacytoid lymphoma, Waldenström's macroglobulinemia, and mantle-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 1999;17:546-53.
- Dimopoulos MA, Kantarjian H, Weber D, O'Brien S, Estey E, Delasalle K, et al. Primary therapy of Waldenström's macroglobulinemia with 2-chlorodeoxyadenosine. *J Clin Oncol* 1994;12:2694-8.
- Delannoy A, Ferrant A, Martiat P, Bosly A, Zenebergh A, Michaux JL. 2-Chlorodeoxyadenosine therapy in Waldenström's macroglobulinemia. *Nouv Rev Fr Hematol* 1994;36:317-20.
- Dimopoulos MA, Weber D, Delasalle KB, Keating M, Alexanian R. Treatment of Waldenström's macroglobulinemia resistant to standard therapy with 2-chlorodeoxyadenosine: identification of prognostic factors. *Ann Oncol* 1995;6:49-52.
- Betticher DC, Hsu Schmitz SF, Ratschiller D, Von Rohr A, Egger T, Pugin P, et al. Cladribine (2-CDA) given as subcutaneous bolus injections is active in pretreated Waldenström's macroglobulinemia. *Swiss*

- Group for Clinical Cancer Research (SAKK). *Br J Haematol* 1997;99:358-63.
44. Hellmann A, Lewandowski K, Zaucha JM, Bieniaszewska M, Halaburda K, Robak T. Effect of a 2-hour infusion of 2-chlorodeoxyadenosine in the treatment of refractory or previously untreated Waldenström's macroglobulinemia. *Eur J Haematol* 1999;63:35-41.
  45. Weber DM, Dimopoulos MA, Delasalle K, et al. 2-Chlorodeoxyadenosine alone and in combination for previously untreated Waldenström disease. *Semin Oncol* 2003;30:243-7.
  46. Dimopoulos MA, Zervas C, Zomas A, et al. Extended rituximab therapy for previously untreated patients with Waldenström's macroglobulinemia. *Clin Lymphoma* 2002;3:163-6.
  47. Dimopoulos MA, Zervas C, Zomas A, et al. Treatment of Waldenström's macroglobulinemia with rituximab. *J Clin Oncol* 2002;20:2327-33.
  48. Case DC Jr, Ervin TJ, Boyd MA, Redfield DL. Waldenström's macroglobulinemia: long-term results with the M-2 protocol. *Cancer Invest* 1991;9:1-7.
  49. Leblond V, Levy V, Maloisel F, et al. Multicenter, randomized comparative trial of fludarabine and the combination of cyclophosphamide-doxorubicin-prednisone in 92 patients with Waldenström macroglobulinemia in first relapse or with primary refractory disease. *Blood* 2001;98:2640-4.
  50. Dimopoulos MA, Zomas A, Viniou NA, et al. Treatment of Waldenström's macroglobulinemia with thalidomide. *J Clin Oncol* 2001;19:3596-601.
  51. Coleman M, Leonard J, Lyons L, et al. BLT-D (clarithromycin [Biaxin], low-dose thalidomide, and dexamethasone) for the treatment of myeloma and Waldenström's macroglobulinemia. *Leuk Lymphoma* 2002;43:1777-82.
  52. Zeldis JB, Schafer PH, Bennett BL, et al. Potential new therapeutics for Waldenström's macroglobulinemia. *Semin Oncol* 2003;30:275-81.
  53. Dreger P, Glass B, Kuse R, Sonnen R, Von Neuhoff N, Bolouri H, et al. Myeloablative radiochemotherapy followed by reinfusion of purged autologous stem cells for Waldenström's macroglobulinemia. *Br J Haematol* 1999;106:115-8.
  54. Martino R, Shah A, Romero P. Allogeneic bone marrow transplantation for advanced Waldenström's macroglobulinemia. *Bone Marrow Transplant* 1999;23:747-9.
  55. Tournilhac O, Leblond V, Tabrizi R, et al. Transplantation in Waldenström macroglobulinemia - The French experience. *Semin Oncol* 2003;30:291-6.
  56. Anagnostopoulos A, Alemán A, Giralt S. Autologous and allogeneic stem cell transplantation in Waldenström's macroglobulinemia. Review of the literature and future directions. *Semin Oncol* 2003;30:286-90.
  57. Owen RG, Rawstron AC, Osterborg A, et al. Activity of Alemtuzumab (Mabcampath) in Relapsed / Refractory Waldenström's Macroglobulinemia. 45<sup>th</sup> Congress of the American Society of Hematology, San Diego, CA, December 2003. Abstract 2380.
  58. Frankel SR. Oblimersen sodium (G3139 Bcl-2 antisense oligonucleotide) therapy in Waldenström's macroglobulinemia: a targeted approach to enhance apoptosis. *Semin Oncol* 2003;30:300-4.
  59. Mitsiades CS, Mitsiades N, McMullan CJ. The Proteasome Inhibitor Bortezomib (PS-341) Is Active Against Waldenström's Macroglobulinemia (WM). 45<sup>th</sup> Congress of the American Society of Hematology, San Diego, CA, December 2003. Abstract 631.
  60. Weber D, Treon SP, Emmanouilides C, et al. Uniform response criteria in Waldenström macroglobulinemia: Consensus panel recommendations from the second international Workshop on Waldenström Macroglobulinemia. *Semin Oncol* 2003;30:127-31.
  61. Facon T, Brouillard M, Duhamel A, Morel P, Simon M, Jouet JP, et al. Prognostic factors in Waldenström macroglobulinemia: a report of 167 cases. *J Clin Oncol* 1993;11:1553-8.
  62. Dimopoulos MA, Panayiotidis P, Mouloupoulos LA, Sfikakis P, Dalakas M. Waldenström's macroglobulinemia: clinical features, complications, and management. *J Clin Oncol* 2000;18:214-26.
  63. García R, Hernández JM, Caballero MD, González M, San Miguel JF. Immunoblastic lymphoma and associated non-lymphoid malignancies following two cases of Waldenström's macroglobulinemia. A review of the literature. *Eur J Haematol* 1993;50:299-301.
  64. Waldenström JG. Macroglobulinemia: A review. *Haematologica* 1996;71:437-40.

# ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL. SIGNIFICADO DE LA REMISIÓN EN ENFERMEDADES ONCOHEMATOLÓGICAS

J.F. TOMÁS, A. ROMÁN, D. SUBIRÁ, E. VIZCARRA, P. LLAMAS Y J. FERNÁNDEZ DE VELASCO

Servicio de Hematología. Fundación Jiménez Díaz. Madrid.

## Introducción

El concepto de enfermedad mínima residual (EMR) es consecuencia de los límites de nuestra definición actual del estado de remisión completa que empleamos en la evaluación tras la terapéutica de las enfermedades oncohematológicas. La definición de remisión completa clásica es crítica en la evaluación y el diseño de las distintas estrategias terapéuticas empleadas en el tratamiento de pacientes con leucemia y linfoma y viene determinada por la ausencia de células detectables por morfología o en el caso de las leucemias agudas la presencia de < 5 % de elementos de aspecto blástico. Casi todas las grandes series clínicas y la evaluación de la eficacia de los principales tratamientos de rutina empleados en la actualidad se basan en protocolos de actuación diseñados sobre esta definición.

La incorporación en las dos últimas décadas de métodos de diagnóstico más precisos y objetivos que la morfología, como la citogenética, la citometría de flujo y las técnicas de biología molecular han permitido poner de manifiesto una gran variabilidad de estados de enfermedad medible por los anteriores métodos en los pacientes con recuperación completa morfológica, con masas tumorales residuales que oscilan entre 0 y  $10^{10}$  células leucémicas. Pero lo más relevante ha sido que algunos estudios han demostrado de forma incontestable que la presencia de esa enfermedad residual por encima de un nivel predice de forma muy certera la probabilidad de recidiva.

Teniendo en cuenta que de la presencia de EMR pueden derivar decisiones terapéuticas agresivas y que un sobretratamiento de los pacientes es a todas luces inaceptable, la seguridad que nos ofrezcan los resultados en la evaluación de la EMR es mandatorio. Es más si estos criterios resultan clínicamente relevantes y técnicamente reproducibles se impondrán como estándares en la definición de las respuestas al tratamiento y como sucede hoy en la leucemia aguda promielocítica o en la leucemia mielóide crónica (LMC) serán parte de nuestro quehacer diario.

Las propiedades que debe reunir una técnica para la detección de EMR son: a) especificidad (capacidad de distinguir las células malignas de las norma-

les, evitando así falsos positivos o negativos; b) sensibilidad (límite de detección); c) reproducibilidad (facilidad de estandarización entre diferentes laboratorios); d) sencillez técnica; e) Correlación clínica, y f) coste ajustado.

En la actualidad las técnicas que empleamos fundamentalmente son: a) citometría de flujo; b) citogenética convencional e hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), y c) técnicas de biología molecular.

## Aplicación de la citometría de flujo en la evaluación de la EMR

Su aplicación es especialmente útil en la evaluación y seguimiento de las leucemias agudas, las leucemias linfoides crónicas y algunos otros síndromes linfoproliferativos con infiltración medular o expresión en sangre periférica. La evaluación mediante citometría de flujo de aneuploidías en el ADN (contenido global de ADN) se ha demostrado especialmente útil en el mieloma múltiple y algunas leucemias agudas.

La determinación mediante métodos inmunológicos de fenotipos propios de la población leucémica, su persistencia en la recidiva y la presencia de fenotipos aberrantes son de enorme utilidad en la evaluación de la EMR. Sin embargo debemos partir de la idea de que las células leucémicas, salvo raras excepciones, no presentan antígenos específicos de que permitan diferenciarlas de las células normales. Lo que sucede es que las células leucémicas presentan fenotipos que o bien están escasamente representados en sujetos normales o son indetectables en las células normales y que denominamos fenotipos leucémicos. Estos fenotipos leucémicos suelen caracterizarse por la coexpresión en una misma célula de antígenos asociados a dos líneas celulares, la presencia de asincronismos madurativos e incluso alteraciones en la cantidad del antígeno expresado, o la localización aberrante de fenotipos restringidos a ciertos tejidos.

La sensibilidad de este método se ha calculado mediante estudios de dilución de células leucémicas en médulas óseas normales entre  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ , esto es, una célula leucémica por cada 10.000-100.000 células.

En las tablas 1, 2 y 3 se muestran algunas de las combinaciones de fenotipos utilizadas en el segui-

miento de leucemias agudas y síndromes linfoproliferativos crónicos.

Desde un punto de vista clínico la evaluación de la EMR mediante citometría en las leucemias agudas se ha llevado a cabo en distintos momentos del tratamiento: tras la inducción, al finalizar la quimioterapia, en los productos de aféresis para trasplante, en el seguimiento o sencillamente en la evaluación de cualquier sospecha clínica de recidiva. Aún está por definir su valor en cada una de estas situaciones si bien muchos estudios han demostrado su valor predictivo de recaída.

### Aplicación de la citogenética convencional y FISH en la evaluación de la EMR

La realización de un estudio citogenético convencional es mandatorio en la evaluación después del tratamiento en todos los pacientes con neoplasias hematológicas que presentaban alteraciones al diagnóstico. Aunque su sensibilidad es inferior a todas las otras técnicas que estamos revisando, se estima en una célula leucémica cada 20 normales, esto es, similar a la morfología, un 5 %, la especificidad de algunas alteraciones genéticas como marcadores leucémicos es relevante. Otras limitaciones son la restricción del análisis a células en metafase, el cultivo puede seleccionar otras poblaciones celulares no representativas del tumor, y que bajo algunos tratamientos no se consiguen suficientes metafases para analizar. No obstante, como hemos indicado con anterioridad, continua siendo un estudio obligado en la evaluación de la EMR.

La hibridación *in situ* es una técnica que permite localizar secuencias específicas de ADN no sólo en cromosomas en metafase sino también en núcleos en interfase, sin precisar que las células se dividan, lo que la hace especialmente útil en neoplasias con baja actividad proliferativa como los síndromes linfoproliferativos crónicos y el mieloma múltiple. Su sensibilidad oscila con el tipo de sonda y la alteración que queremos detectar. Así la sensibilidad con sondas centroméricas en el estudio de trisomías es del 1 %, aunque pueden alcanzar  $10^{-4}$  y  $10^{-6}$  cuando coexisten dos o tres trisomías, al multiplicarse los puntos de señal en una misma célula. Pero sin duda es la detección de traslocaciones cromosómicas específicas que utilizan sondas que comprenden los fragmentos de ADN de los genes implicados en las mismas como *bcr-abl*, *pml-rar $\alpha$* , *c-myc/Ig $\lambda$* , las más utilizadas en la actualidad. Su sensibilidad en estudio de células en interfase, la situación más común, es baja ( $10^{-1}$ ).

### Aplicación de la biología molecular en la evaluación de la EMR

Aunque inicialmente se utilizó la técnica del Southern blot en la evaluación molecular de la EMR, su baja sensibilidad, 4-5 %, no permite considerarla una técnica útil para estos estudios. Las técnicas de

Tabla 1. Frecuencia de fenotipos aberrantes en LMA

Aberrant phenotypes	Number of cases
<i>Cross-lineage infidelity, 37 of 126 (29 %)</i>	
CD2	26 (21)
CD7	11 (9)
CD19	3 (2)
CD20	1 (0,8)
CD5	1 (0,8)
<i>Antigen overexpression, 26 of 126 (21 %)</i>	
CD33 <sup>+++</sup>	14 (11)
CD34	11 (9)
CD13	3 (2)
CD117	1 (0,8)
CD15 <sup>a</sup>	1 (0,8)
HLA DR	1 (0,8)
<i>Abnormal light scatter, 22 of 126 (17 %)</i>	
High FSC/SSC	
CD2	4 (2,6)
CD34	4 (2,6)
CD7	4 (2,6)
CD117	2 (1,5)
CD19	2 (1,5)
CD20	1 (0,8)
Low FSC/SSC	
CD13 <sup>b</sup>	3 (2)
CD33 <sup>b</sup>	1 (0,8)
CD15	1 (0,8)
<i>Asynchronous antigen expression, 98 of 126 (78 %)</i>	
CD34 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>-</sup> CD33 <sup>+</sup>	11 (9)
CD34 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	10 (8)
CD34 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup>	6 (5)
CD34 <sup>+</sup> CD33 <sup>++</sup>	4 (3)
CD34 <sup>+</sup> CD14 <sup>+</sup>	4 (3)
CD34 <sup>+</sup> CD117 <sup>+</sup> HLA-DR	3 (2,3)
CD34 <sup>+</sup> CD117 <sup>-</sup> CD15 <sup>+</sup>	3 (2,3)
CD34 <sup>+</sup> CD33 <sup>-</sup> CD13 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	2 (1,5)
CD34 <sup>+</sup> CD33 <sup>-</sup> CD13 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>-</sup>	1 (0,8)
CD34 <sup>+</sup> CD33 <sup>-</sup> CD117 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	1 (0,8)
CD117 <sup>+</sup> CD33 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>-</sup>	14 (11)
CD117 <sup>+</sup> CD34 <sup>-</sup> CD15 <sup>-c</sup>	8 (6)
CD117 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup>	7 (5,5)
CD117 <sup>+</sup> CD33 <sup>+</sup> CD34 <sup>-</sup> CD15 <sup>+</sup>	5 (4)
CD117 <sup>+</sup> DR <sup>-</sup> CD15 <sup>+</sup>	3 (2,3)
CD117 <sup>+</sup> DR <sup>-</sup> CD15 <sup>-d</sup>	2 (2,3)
CD117 <sup>+</sup> DR <sup>+</sup> CD33 <sup>+</sup> CD34 <sup>-</sup>	1 (0,8)
CD33 <sup>++</sup> HLA-DR <sup>-</sup> CD34 <sup>-</sup> CD15 <sup>-</sup> CD14 <sup>-</sup>	22 (17)
CD33 <sup>-</sup> CD13 <sup>+</sup>	18 (14)
CD33 <sup>+</sup> CD13 <sup>-</sup>	9 (7)
CD33 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45 <sup>dim</sup>	1 (0,8)
CD33 <sup>++</sup> HLA-DR <sup>+</sup> CD15 <sup>-</sup> CD14 <sup>-d</sup>	1 (0,8)
CD33 <sup>+</sup> CD45 <sup>d</sup> CD34 <sup>-</sup> CD15 <sup>-e</sup>	1 (0,8)
CD33 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD13 <sup>+</sup>	1 (0,8)

<sup>a</sup> Overexpression of CD15 in nongranulocytic lineage.

<sup>b</sup> Basophilic lineage.

<sup>c</sup> Mast cells express this phenotype with a higher expression of CD117.

<sup>d</sup> Dendritic cells.

<sup>e</sup> Basophilic lineage.

LMA: leucemia mieloblástica aguda.

Tomada de San Miguel et al, Blood 2001;98:1746-51.

Tabla 2. Fenotipos aberrantes en LMA: frecuencia y significado clínico ¡¡¡ojo no se ve tabla picada-formato no texto!!

Aberrant phenotypes	FAB classification								
	M0 (n = 1) N	M1 (n = 7) N	M2 (n = 8) N	M3 (n = 4) N	M4 (n = 5) N	M5 (n = 6) N	M6 (n = 1) N	M7 (n = 2) N	Total (n = 35) N (%)
CD2	0	1	0	0	1	2	0	0	4 (11,4)
CD7	1	2	1	0	2	2	0	1	9 (25,7)
CD10	0	1	0	0	0	0	0	0	1 (2,8)
CD19	0	0	3	0	0	0	0	0	3 (8,6)
CD117 CD34 CD15	0	4	3	0	4	2	0	0	13 (38,2)
CD117 CD34 CD65	0	2	2	0	4	2	0	0	10 (29,4)
CD117 CD34 CD11c	0	3	3	0	4	2	1	2	15 (44,1)
CD117 CD34 CD14	0	0	0	0	1	2	0	0	3 (8,8)
CD117 CD34 CD15	0	0	1	3	1	1	0	0	6 (17,6)
CD117 CD34 CD55	0	0	2	3	0	0	0	0	5 (14,7)
CD117 CD34 CD11c	0	2	2	0	1	1	0	0	6 (17,6)
CD117 CD34 CD14 <sup>+</sup>	0	0	1	0	1	1	0	0	3 (8,8)
CD117 CD34 CD15	0	0	0	0	0	2	0	0	2 (5,9)
CD117 CD34 CD65	0	0	0	0	0	2	0	0	2 (5,9)
CD117 CD34 CD11c	0	0	0	0	0	2	0	0	2 (5,9)
CD117 CD34 CD14	0	0	0	0	0	2	0	0	2 (5,9)
CD34 CD56	0	0	2	0	0	2	1	0	5 (14,7)
N	1	7	7	3	5	5	1	2	31 (88,6)
> 1 phenotype*	0	4	6	3	5	5	1	1	25 (80,6)
> 3 phenotypes*	0	0	3	0	4	4	0	0	11 (35,5)

N: number of cases with aberrant phenotypes; \*: number of aberrant phenotypes/cases; ??????ojo no se entiende-tabla picada!!  
Tomada de Bahía et al, *Haematologica*. 2001 Aug;86:801-6.

Tabla 3. Diseño de combinaciones inmunofenotípicas para la búsqueda de EMR en distintos síndromes linfoproliferativos B\*

LLC/LNH de célula pequeña	CD22/CD23/CD19/CD5 Kappa/Lambda/CD19/CD5
Tricoeucemia	CD103/CD25/CD19 CD22/CD11c/CD19
LNH esplénicos	FMC7/CD22/CD19/CD10 Kappa/Lambda/CD19/CD22
LNH del manto	CD10/CD22/CD19/CD5
LNH folicular	CD22/CD23/CD19/CD10

EMR: enfermedad mínima residual; LLC: leucemia linfocítica crónica;  
LNH: linfoma no hodgkiniano.  
Tomada de Sánchez et al, *Leukemia*.

reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permiten la amplificación selectiva de un fragmento de ADN o ADNc, lo que en aquellas neoplasias en las que se genera un fragmento de ADN específico del tumor, permite la detección del mismo en presencia de un número bajo de células tumorales. De hecho como veremos a continuación esta exquisita sensibilidad (entre  $10^{-4}$  y  $10^{-6}$ ) genera en ocasiones enormes dificultades en la evaluación de la EMR mediante PCR. El otro problema deriva de la posible aparición de

Tabla 4. Combinaciones empleadas en la evaluación de la EMR en leucemias agudas linfoblásticas

CD4/CD8/CD3
CD7/CD5/CD3
CD19/CD34/CD45
CD10/CD13/CD19
CD5/CD33/CD20
CD65/CD2/HLA-DR
CD34/CD38/CD19
CD10/CD20/CD19
CD7/CD2/CD3
CD34/CD22/CD19
TdT/CD10/CD19

Además en las LAL-T y en las L3 un panel CD7/CD34/CD38 y la presencia de (Slg) light chain Slg-Kappa/Slg-Lambda/CD19 con triple marcaje se utilizó respectivamente.

EMR: enfermedad mínima residual.

Tomada de Vidriales et al. *Blood* 15 June 2003, Vol. 101:4695-700.

falsos positivos ocasionados por la contaminación de muestras, especialmente en los métodos basados en ARN.

Los estudios de PCR convencionales son cualitativos, esto es, sólo podemos indicar la presencia (positividad) o ausencia (negatividad) de un fragmento específico, pero no aporta información sobre la cuantía de tumor presente. En los últimos años se ha logrado poner en marcha una técnica de PCR cuantitativa, PCR a tiempo real, cuya utilidad en la me-

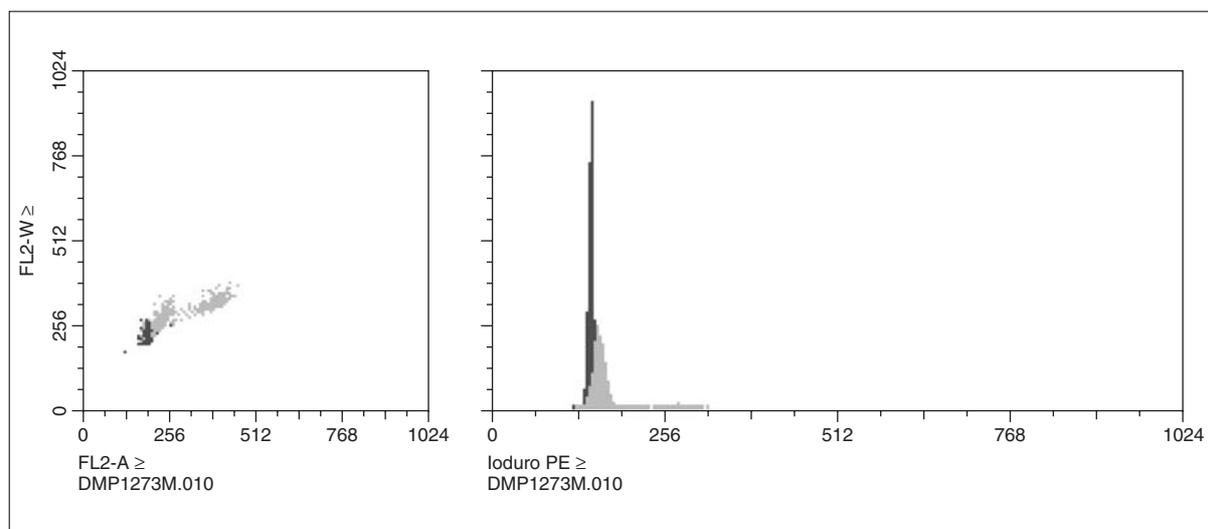


Figura 1. Búsqueda de enfermedad mínima residual en el mieloma múltiple a través del estudio del ciclo celular.

dición de la EMR deriva de su capacidad de cuantificarla y, lo que es más importante, su variación en el tiempo, se está imponiendo en el estudio, seguimiento y actitud terapéutica de muchos pacientes con leucemias (fig. 2).

En la tabla 5 se recogen los principales genes estudiados mediante tecnología de PCR y que comprenden los dos grupos de marcadores moleculares más empleados en la detección de EMR mediante esta tecnología: *a)* análisis de reordenamientos clonales de los genes de las inmunoglobulinas y del receptor de célula T (TCR), propios de los síndromes

linfoproliferativos B y T, y *b)* detección de aberraciones cromosómicas en las que se conocen los oncogenes implicados que dan lugar a regiones quiméricas de fusión características de algunas enfermedades (p. ej., bcr/abl en la LMC).

El estudio de los reordenamientos de las inmunoglobulinas y del receptor TCR es complejo ya que precisa, para ser específica y suficientemente sensible, la secuenciación de las regiones clonospecíficas V(D)J de cada paciente y posterior diseño de oligonucleótidos/sondas específicos de las regiones hipervariables CDRIII. Para ello existen, desde un

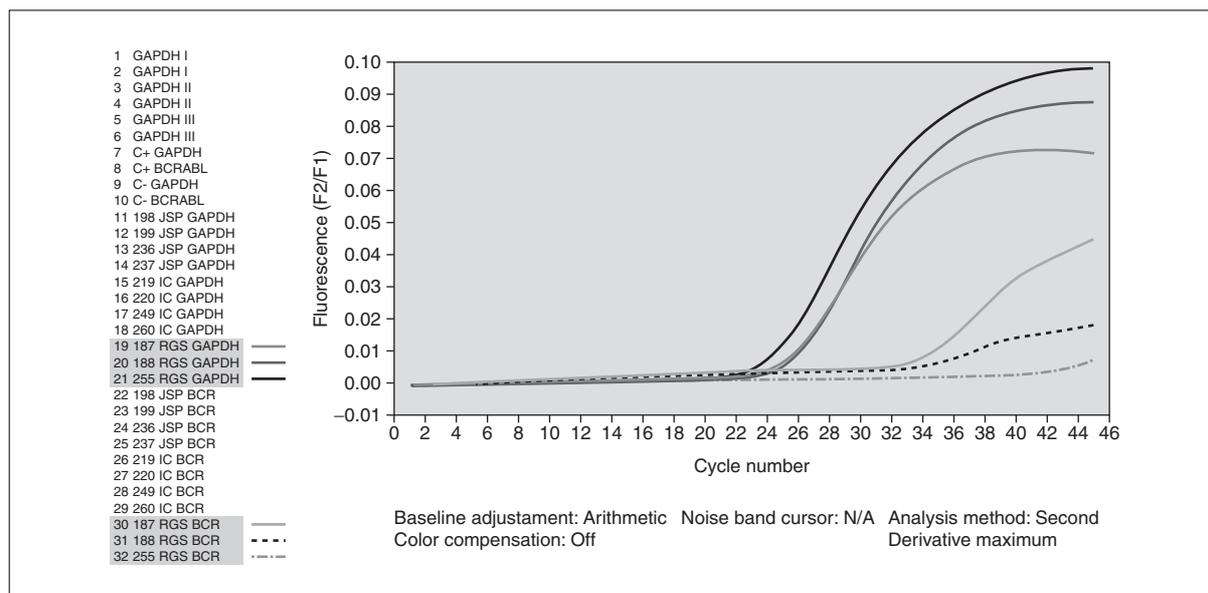


Figura 2. Cuantificación mediante tecnología Light-Cycler de bcr-abl.

Tabla 5. Estudio de EMR mediante PCR

Alteración guía	Enfermedad
A. Reordenamiento de inmunoglobulinas y TCR	LLA B y T LNH-B MM
B. Estudio de genes implicados en alteraciones cromosómicas	
ETO-AML1, t(8,21)	LMA (fundamentalmente M2, un 10% de todas las LMA)
PML-RAR $\alpha$ t(15,17)	LMA M3 (> 90% de las LMA M3)
CBFB/MYH11, inv 16	LMA M4 (4% de todas las LMA)
DEK-CAN, t(6,9)	LMA-Tdt + (1% de todas las LMA)
AF4-ALL 1, t(4,11)	LMA (en aquellas con alteración 11q23)
TEL-AML1, t(12,21)	LLA pre-pre-B (10% de todas LLA de línea B)
PBX-EA2, t(1;19)	LLA (30% de leucemias infantiles B)
SIL-TAL1, del1p32	LLA pre-B (1/3 de LLA pre-B)
TAL1-RCT, t(1;14)	LLA-T (hasta un 30% de los casos)
HOX 11-RCT t(10;14)	LLA-T (5% de los casos)
BCR-ABL, t(9;22)	LMC (98% casos) LLA (5% infantiles, 25% adultos)
IgH-BCL2 t(14;18)	LNH foliculares (un 80%) LNH difusos (un 25%)
BCL1-IgH, t(11;14)	LNH del manto (65% casos)
NPM-ALK t(2;5)	LNH anaplásicos
API2-MALT1 t(11;18)	LNH MALT
c-MYC-IgH t(8;14)	LNH Burkitt
C. Estudio de otras alteraciones genéticas que sirven como marcador	
Tumor de Wilms	Sobreexpresión > 90% de LMA y un alto porcentaje de SMD, LMC y LLA
FLT3	Alterado hasta en un 30% de LMA

EMR: enfermedad mínima residual; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; TCR: receptor de célula T; LLA: leucemia linfoblástica aguda; LNH: linfoma no hodgkiniano; LMA: leucemia mieloblástica aguda; LMC: leucemia mieloide crónica; SMD: síndrome mielodisplásico.

punto de vista técnico, diferentes estrategias dependiendo de cuál de los oligonucleótidos/sondas empleados es el complementario a la región hipervariable CDR3. En el caso de los SLP-B crónicos maduros al estudiar los reordenamientos de las inmunoglobulinas debemos añadir un problema que deriva de la presencia de mutaciones somáticas en dichos genes que impiden la correcta hibridación de las sondas y cebadores consenso, dando lugar a la pérdida de sensibilidad en los estudios de EMR por RQ-PCR. Ello podría subsanarse sintetizando sondas y cebadores específicos de cada paciente, lo que encarece enormemente el análisis al mismo tiempo que aumenta la laboriosidad.

El seguimiento mediante PCR a tiempo real de los reordenamientos PML/RAR $\alpha$ , AML1/ETO y BCR/ABL puede considerarse que hoy en día forma parte de la rutina clínica en las leucemias agudas mieloides y la LMC, en la que están respectivamente implicados. Sin embargo conviene insistir en la necesidad de estandarización de muchos de estos estudios y que resulta crítica la experiencia del laboratorio de referencia en el que se practican estos análisis.

Especial mención merece el estudio de un marcador que apunta una importante utilidad en el seguimiento de la EMR de las hemopatías agudas mieloides y los síndromes mielodisplásicos (SMD). El gen del tumor de Wilms (WT1) es un gen identificado por análisis de delección citogenética en pacientes

afectados de tumor de Wilms, que se originaría como resultado de la inactivación de ambos alelos del gen *WT1*. Este gen *WT1* que se localiza en el cromosoma 11p13, codifica una proteína *zinc finger DNA-binding* con un complejo patrón de 4 *splicing* alternativos con diferentes especificidades de unión y probablemente dianas diferentes, que se ha implicado en el desarrollo de tejidos, en la proliferación y diferenciación celular, y en la apoptosis. La proteína del gen *WT1* es altamente homóloga con proteínas de los genes considerados de respuesta precoz de crecimiento y funciona como un potente represor transcripcional de genes promotores como IGF-II, PDGF-A, CSF-1 e IGF-R, considerándose por ello, un gen supresor tumoral. Otros genes diana de la proteína *WT1* parecen ser M-CSF, TGF-beta, RAR- $\alpha$ , c-myc, c-myc, bcl-2, N-myc y el propio gen *WT1*. Sin embargo puede actuar también como activador transcripcional sugiriendo que es un regulador bifuncional de la transcripción y a diferencia de otros genes supresores de tumores como P53 y Rb (los cuales se expresan ubicuamente), la expresión del gen *WT1* está restringida a determinados tejidos, expresándose fuertemente en riñones fetales y desempeñando un papel importante en el desarrollo genitourinario, con posterior reducción de su expresión en adultos sanos y quedando limitada a parénquima esplénico, testículos y ovario. Es controvertida la expresión de *WT1* en progenitores hematopoyéticos

CD34+. Por otra parte, aunque el gen *WT1* fue identificado originariamente como un gen supresor tumoral, su significado en la tumorigénesis no está aclarado, sin embargo se ha visto que oligómeros antisentido *WT1* inhiben el crecimiento de células leucémicas humanas frescas y de líneas celulares, lo cual implicaría una fuerte participación del gen *WT1* en la leucemogénesis. Así mismo, recientemente se reconoce para *WT1* una función principalmente oncogénica en la leucemogénesis y tumorigénesis de varios tipos de tumores sólidos por la evidencia de una alta expresión del gen en estas patologías.

En diversos trabajos se ha objetivado la expresión del gen *WT1* mediante PCR en más del 80% de las muestras leucémicas analizadas, independientemente del subtipo leucémico (incluyendo leucemia mieloblástica aguda [LMA], leucemia linfoblástica aguda [LLA], LMC y síndrome mielodisplásico [SMD]) y que los niveles de expresión del gen *WT1* aumentan paralelamente a la progresión de la enfermedad en pacientes con LMC y SMD e inversamente con el pronóstico en pacientes con leucemia aguda. De esta forma, la sobreexpresión aberrante de *WT1* en la mayoría de las leucemias lo convertirían en un marcador "panleucémico" de gran utilidad en el seguimiento de enfermedad residual, debido además a que las células maduras sanguíneas carecen de expresión significativa de *WT1*, mientras que las inmaduras de la médula ósea lo expresan con niveles altos. Recientemente se ha demostrado la existencia de una correlación entre niveles aumentados de expresión del gen *WT1* en tumores hematopoyéticos y una evolución desfavorable. Por ello, diversos grupos estudian la utilidad de la cuantificación de la expresión de *WT1* al diagnóstico y fundamentalmente en el seguimiento posquimioterapia o postrasplante autólogo o alogénico con el objeto de optimizar los tratamientos disponibles. La monitorización de EMR mediante la cuantificación de los niveles de expresión de dicho gen, podría correlacionarse con la probabilidad de recaída. Un conocimiento precoz de la recaída a nivel molecular permitiría realizar pautas terapéuticas individualizadas, cuando la carga tumoral es mínima y quizá más controlable.

## Bibliografía

1. Arico M, Germano G, Del Giudice L, Ziino O, Locatelli F, Basso G. Late relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia and PCR-monitoring of minimal residual disease: how much time can elapse between "molecular" and clinical relapse? *Haematologica* 2002;87(4):ELT19.
2. Bader P, Niemeyer C, Weber G, Coliva T, Rossi V, Kreyenberg H, et al. *WT1* gene expression: useful marker for minimal residual disease in childhood myelodysplastic syndromes and juvenile myelo-monocytic leukemia? *Eur J Haematol* 2004;73:25-8.
3. Ballerini P, Blaise A, Mercher T, Pellegrino B, Perot C, Van den Akker J, et al. A novel real-time RT-PCR assay for quantification of OTT-MAL fusion transcript reliable for diagnosis of t(1;22) and minimal residual disease (MRD) detection. *Leukemia* 2003;17:1193-6.
4. Brisco MJ, Sykes PJ, Hughes E, Neoh SH, Snell LE, Dolman G, et al. Comparison of methods for assessment of minimal residual disease in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2001;15:385-90.
5. Campana D, Coustan-Smith E. Minimal residual disease studies by flow cytometry in acute leukemia. *Acta Haematol* 2004;112:8-15.
6. Cazzaniga G, Lanciotti M, Rossi V, Di Martino D, Arico M, Valsecchi MG, et al. Prospective molecular monitoring of BCR/ABL transcript in children with Ph+ acute lymphoblastic leukaemia unravels differences in treatment response. *Br J Haematol* 2002;119:445-53.
7. Chen JS, Coustan-Smith E, Suzuki T, Neale GA, Mihara K, Pui CH, et al. Identification of novel markers for monitoring minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2001;97:2115-20.
8. Cilloni D, Gottardi E, De Micheli D, Serra A, Volpe G, Messa F, et al. Quantitative assessment of *WT1* expression by real time quantitative PCR may be a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute leukemia patients. *Leukemia* 2002;16:2115-21.
9. Cilloni D, Saglio G. *WT1* as a universal marker for minimal residual disease detection and quantification in myeloid leukemias and in myelodysplastic syndrome. *Acta Haematol* 2004;112:79-84.
10. Dodge W, Cruz J, Zamkoff K, Hurd D, Pettenati MJ. Use of fluorescence in situ hybridization to detect minimal residual disease in hematopoietic stem cell assays from peripheral blood stem cells of 2 patients with trisomy 8 acute myeloid leukemia. *Stem Cells Dev* 2004;13:23-6.
11. Feller N, Van Der Pol MA, Van Stijn A, Weijers GW, Westra AH, Evertse BW, et al. MRD parameters using immunophenotypic detection methods are highly reliable in predicting survival in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2004.
12. Gabert J, Beillard E, Van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 2003;17:2318-57.
13. Garg M, Moore H, Tobal K, Liu Yin JA. Prognostic significance of quantitative analysis of *WT1* gene transcripts by competitive reverse transcription polymerase chain reaction in acute leukaemia. *Br J Haematol* 2003;123:49-59.
14. Guerrasio A, Pilatino C, De Micheli D, Cilloni D, Serra A, Gottardi E, et al. Assessment of minimal residual disease (MRD) in CBFbeta/MYH11-positive acute myeloid leukemias by qualitative and quantitative RT-PCR amplification of fusion transcripts. *Leukemia* 2002;16:1176-81.
15. Kern W, Danhauser-Riedl S, Ratei R, Schnitger S, Schoch C, Kolb HJ, et al. Detection of minimal residual disease in unselected patients with acute myeloid leukemia using multiparameter flow cytometry for definition of leukemia-associated immunophenotypes and determination of their frequencies in normal bone marrow. *Haematologica* 2003;88:646-53.
16. Kottaridis PD, Gale RE, Langabeer SE, Frew ME, Bowen DT, Linch DC. Studies of FLT3 mutations in paired presentation and relapse samples from patients with acute myeloid leukemia: implications for the role of FLT3 mutations in leukemogenesis, minimal residual disease detection, and possible therapy with FLT3 inhibitors. *Blood* 2002;100:2393-8.
17. Krampera M, Perbellini O, Maggioni A, Scognamiglio F, Todeschini G, Pizzolo G. Flow-cytometric detection of minimal residual disease in adult acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2001;86:322-3.
18. Li AH, Rosenquist R, Forestier E, Lindh J, Roos G. Detailed clonality analysis of relapsing precursor B acute lymphoblastic leukemia: implications for minimal residual disease detection. *Leuk Res* 2001;25:1033-45.
19. Liu Yin JA. Minimal residual disease in acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2002;15:119-35.
20. Lucio P, Gaipa G, Van Lochem EG, van Wering ER, Porwit-MacDonald A, Faria T, et al. BIOMED-I concerted action report: flow cytometric immunophenotyping of precursor B-ALL with standardized triple-stainings. BIOMED-1 Concerted Action Investigation of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia: International Standardization and Clinical Evaluation. *Leukemia* 2001;15:1185-92.
21. Malec M, Bjorklund E, Soderhall S, Mazur J, Sjogren AM, Pisa P, et al. Flow cytometry and allele-specific oligonucleotide PCR are equally effective in detection of minimal residual disease in ALL. *Leukemia* 2001;15:716-27.
22. Matsushita M, Ikeda H, Kizaki M, Okamoto S, Ogasawara M, Ikeda Y, et al. Quantitative monitoring of the PRAME gene for the detection of minimal residual disease in leukaemia. *Br J Haematol* 2001;112:916-26.
23. Ogawa H, Tamaki H, Ikegame K, Soma T, Kawakami M, Tsuboi A, et al. The usefulness of monitoring *WT1* gene transcripts for the prediction and management of relapse following allogeneic stem cell transplantation in acute type leukemia. *Blood* 2003;101:1698-704.
24. Ostergaard M, Olesen LH, Hasle H, Kjeldsen E, Hokland P. *WT1* gene expression: an excellent tool for monitoring minimal residual disease in 70% of acute myeloid leukaemia patients - results from a single-centre study. *Br J Haematol* 2004;125:590-600.
25. Sakatani T, Shimazaki C, Hirai H, Okano A, Hatsuwa M, Okamoto A, et al. Early relapse after high-dose chemotherapy rescued by tumor-free autologous peripheral blood stem cells in acute lymphoblastic leukemia: importance of monitoring for *WT1*-mRNA quantitatively. *Leuk Lymphoma* 2001;42:225-9.
26. San Miguel JF, Vidriales MB, López-Berges C, Díaz-Mediavilla J, Gutiérrez N, Canizo C, et al. Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification. *Blood* 2001;98:1746-51.
27. San-Miguel JF, Vidriales MB, Orfao A. Immunological evaluation of minimal residual disease (MRD) in acute myeloid leukaemia (AML). *Best Pract Res Clin Haematol* 2002;15:105-18.

28. Scaravaglio P, Guglielmelli T, Giugliano E, Marmont F, Audisio E, Gallo E, et al. Detection of minimal residual disease in peripheral blood stem cells from two acute myeloid leukemia patients with trisomy 8 predicts early relapse after autologous bone marrow transplantation. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;133:98-101.
29. Schmidt HH, Strehl S, Thaler D, Strunk D, Sill H, Linkesch W, et al. RT-PCR and FISH analysis of acute myeloid leukemia with t(8;16)(p11;p13) and chimeric MOZ and CBP transcripts: breakpoint cluster region and clinical implications. *Leukemia* 2004;18:1115-21.
30. Schnittger S, Schoch C, Dugas M, Kern W, Staib P, Wuchter C, et al. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood* 2002;100:59-66.
31. Schnittger S, Schoch C, Kern W, Hiddemann W, Haferlach T. FLT3 length mutations as marker for follow-up studies in acute myeloid leukaemia. *Acta Haematol* 2004;112:68-78.
32. Scholl C, Breiting H, Schlenk RF, Dohner H, Frohling S, Dohner K. Development of a real-time RT-PCR assay for the quantification of the most frequent MLL/AF9 fusion types resulting from translocation t(9;11)(p22;q23) in acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;38:274-80.
33. Scolnik MP, Morilla R, De Bracco MM, Catovsky D, Matutes E. CD34 and CD117 are overexpressed in AML and may be valuable to detect minimal residual disease. *Leuk Res* 2002;26:615-9.
34. Shih LY, Huang CF, Wu JH, Lin TL, Dunn P, Wang PN, et al. Internal tandem duplication of FLT3 in relapsed acute myeloid leukemia: a comparative analysis of bone marrow samples from 108 adult patients at diagnosis and relapse. *Blood* 2002;100:2387-92.
35. Szczepanski T, Orfao A, Van der Velden VH, San Miguel JF, Van Dongen JJ. Minimal residual disease in leukaemia patients. *Lancet Oncol* 2001;2:409-17.
36. Szczepanski T, Willemsse MJ, Brinkhof B, Van Wering ER, Van der Burg M, Van Dongen JJ. Comparative analysis of Ig and TCR gene rearrangements at diagnosis and at relapse of childhood precursor-B-ALL provides improved strategies for selection of stable PCR targets for monitoring of minimal residual disease. *Blood* 2002;99:2315-23.
37. Uzunel M, Ringden O. Poor correlation of kinetics between BCR-ABL and WT1 transcript levels after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2004;33:47-52.
38. Van der Pol MA, Feller N, Ossenkoppele GJ, Weijers GW, Westra AH, Van Stijn A, et al. Minimal residual disease in acute myeloid leukemia is predicted by P-glycoprotein activity but not by multidrug resistance protein activity at diagnosis. *Leukemia* 2003;17:1674-7.
39. Van der Velden VH, Schoch C, Langerak AW, Schnittger S, Hoogeveen PG, Van Dongen JJ. Low frequency of reverse transcription polymerase chain reaction-detectable chromosome aberrations in relapsed acute myeloid leukaemia: implications for detection of minimal residual disease. *Br J Haematol* 2001;113:1082-3.
40. Van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, Van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 2003;17:1013-34.
41. Van Stijn A, Kok A, Van der Pol MA, Feller N, Roemen GM, Westra AH, et al. A flow cytometric method to detect apoptosis-related protein expression in minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2003;17:780-6.
42. Van Stijn A, Kok A, Van Stalborch MA, Van Der Pol MA, Feller N, Westra AH, et al. Minimal residual disease cells in AML patients have an apoptosis-sensitive protein profile. *Leukemia* 2004;18:875-7.
43. Yin JA, Grimwade D. Minimal residual disease evaluation in acute myeloid leukaemia. *Lancet* 2002;360(9327):160-2.
44. Yin JA, Frost L. Monitoring AML1-ETO and CBFbeta-MYH11 transcripts in acute myeloid leukemia. *Curr Oncol Rep* 2003;5:399-404.

# FRONTLINE THERAPY FOR PATIENTS WITH NEWLY DIAGNOSED CHRONIC MYELOID LEUKEMIA IN CHRONIC PHASE IN THE YEAR 2004

G. GARCÍA-MANERO

*Department of Leukemia, University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas.*

## Abstract

Treatment options for patients with chronic myeloid leukemia (CML) have evolved significantly over the last 30 years. This process has included the development of the cytoreductive agent hydroxyurea, of complex technologies such as allogeneic stem cell transplantation (alloSCT) and donor lymphocyte infusions, the immunomodulatory agent interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), and more recently the small molecule imatinib mesylate (imatinib). In the previous decade, an intense debate centered on whether alloSCT or a trial of IFN- $\alpha$  was the best initial approach for patients with newly diagnosed CML. This debate now seems almost irrelevant in view of the excellent results of imatinib. Whether imatinib or alloSCT should be offered as initial therapy is a question partly answered by the lack of universally available donors for alloSCT, and the fact that most patients want a trial of imatinib as their initial therapy. Here, I discuss the most recent results of imatinib, provide a perspective of the results of alloSCT, and describe our current initial approach for patients with chronic phase CML.

## Introduction

Chronic myelogenous leukemia (CML) is a myeloproliferative disorder characterized by the excessive proliferation of a neoplastic stem cell pool. Molecularly, CML is defined by the *BCR/ABL* gene rearrangement, that is cytogenetically evidenced as the Philadelphia (Ph) chromosome: t(9;22)(q34;q11). The *BCR-ABL* fusion gene encodes the p210<sup>BCR-ABL</sup> oncoprotein that has constitutive tyrosine kinase activity. This aberrant kinase activity induces the abnormal signal transduction cascades characteristic of the CML cell, that result in increased proliferation and failure to undergo apoptosis<sup>1</sup>.

Clinically CML is divided in three phases: chronic, accelerated and blastic. Most patients present in chronic phase. The median survival of patients with CML has improved from 3 to 4 years when treated with busulfan or hydroxyurea to 6 to 8 years in the era of interferon-alpha (IFN- $\alpha$ ) therapy. The introduction of newer therapies such as imatinib mesylate (imatinib), a BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, have resulted in significantly better outcomes com-

pared with combination IFN- $\alpha$  therapy for patients with CML. Allogeneic stem cell transplantation (alloSCT) can produce long-term event-free survival rates of 40% to 80%, depending on several factors such as disease stage, patient age, and degree of host-donor matching. These results are offset by the lack of universally available donors, and the excessive mortality and morbidity related to graft-versus-host (GVHD) disease encountered the first few years after transplantation<sup>2</sup>.

At the present time, imatinib and alloSCT are the most frequently offered therapies for patients with newly diagnosed chronic phase CML. In contrast with the IFN- $\alpha$  era and based on the excellent results observed with imatinib, nowadays most centers offer a trial of imatinib to the majority of patients with standard risk CML disease prior to transplantation. The decision to transplant is subsequently made based on the response achieved with imatinib. A criterion for imatinib failure is currently not well defined, but is an area of intense investigation that needs maturation of ongoing studies.

## Treatment of chronic myeloid leukemia

Busulfan was the first agent shown to provide effective hematological control in CML. Due to its toxicity, its use should be discouraged outside the setting of preparative regimens for allogeneic SCT<sup>3</sup>. Hydroxyurea is an excellent debulking agent that allows rapid control of peripheral blood counts. Cytogenetic responses are rare, and it should not be considered definitive therapy of CML, even in older patients.

Prior to imatinib, IFN- $\alpha$  was the most active non-transplant therapy in CML. Achieving a complete cytogenetic response was associated with 10-year survival rates of 70% to 80%<sup>4</sup>. IFN- $\alpha$  has been combined with low doses of cytosine arabinoside (ara-C). With IFN- $\alpha$  daily and ara-C 10 mg subcutaneous daily, complete hematological responses (CHR) was achieved in 92% of patients, and a cytogenetic response in 74%. The rates of major cytogenetic responses were higher with IFN- $\alpha$  and daily ara-C, compared with IFN- $\alpha$  and intermittent ara-C, or IFN- $\alpha$  alone. Two randomized trials comparing IFN- $\alpha$  plus ara-C with IFN- $\alpha$  have been reported. In a French multicenter study, IFN- $\alpha$  plus

ara-C was associated with a significantly higher CHR rate at 6 months (66% vs 55%,  $p < 0.01$ ), a higher cytogenetic response rate at 12 months (61% vs 50%,  $p < 0.01$ ), and significantly better survival (5-year rate 70% vs 60%;  $p = 0.02$ )<sup>5</sup>. In an Italian study the combination of IFN- $\alpha$  plus ara-C demonstrated better major cytogenetic response rates than IFN- $\alpha$  alone, but not better survival. It should be noted that the median duration of ara-C therapy was only 7 months<sup>6</sup>. At the present time, IFN- $\alpha$  is rarely used as frontline therapy in CML. This is based on the results of an international multicenter study randomizing IFN- $\alpha$  plus ara-C to imatinib that demonstrated the superiority of imatinib in terms of activity, toxicity and quality of life<sup>7</sup>. The use of IFN- $\alpha$  is being studied in combination therapy with imatinib in ongoing studies.

### Allogeneic Stem Cell Transplantation

AlloSCT is curative in selected patients with CML, and is most effective when performed in chronic phase. In chronic phase CML, alloSCT results in 3- to 5-year survival rates of 40% to 80%, and 10-year survival rates of 30% to 60%. Transplant related mortality (TRM) ranges from 5% to 50%, depending on patient age, donor origin (related, unrelated) and degree of matching, patient and host cytomegalovirus status, adequate use of anti-infective prophylaxis, preparative regimens, and institutional expertise, among other factors<sup>8</sup>. Relapse rates are 20% and the risk of relapse plateaus 5 to 7 years post-transplantation. The two most significant factors influencing transplantation outcome are patient age and phase of disease. Disease-free survival (DFS) rates with matched-related alloSCT are 40% to 80% in chronic phase, 15% to 40% in accelerated phase, and 5% to 20% in blastic phase. In chronic phase, patients younger than 30 to 40 years have DFS rates of 60% to 80%, 1-year TRM rates of 5% to 20%, and relapse rates of 20%. Outcome worsens with older age. Large series have reported 5-year survival rates of 30% to 40% in patients older than 50 years. The European Bone Marrow Transplantation Registry reported a TRM of 47% and a 5-year DFS of 25% in patients older than 45 years<sup>9</sup>. The optimal timing of transplantation is controversial; most transplant centers recommend transplantation in early chronic phase CML within one year from diagnosis. Several recent updates show little difference in long-term outcome among patients transplanted in the first 12 months after diagnosis compared with those transplanted during the first 24 months<sup>10</sup>.

Toxicity from preparative regimens is observed in 100% of patients. Acute GVHD occurs in 10% to 60% of patients and is the cause of death in 10% to 15%. Chronic GVHD occurs in 75% of patients and its associated mortality is 10%. The most common causes of death post-transplantation are acute GVHD (2%-13%), chronic GVHD (8% to 10%), in-

terstitial pneumonitis (4%-32%), opportunistic infections (3% to 24%), veno-occlusive disease (1% to 4%), and resistant relapse (5% to 10%). Long-term complications of alloSCT include sterility, cataracts, hip necrosis, secondary cancers (5% to 10%), chronic GVHD complications, and worse quality of life.

One limitation of alloSCT is the availability of related donors. HLA-compatible unrelated donors can be found in 50% of patients. Patients of Caucasian origin have an 85% chance of identification of a perfect match. Median time from donor search to transplant is 3 to 6 months. The use of unrelated donors is associated with higher morbidity and mortality rates. Recent single institutional studies have reported similar outcomes with unrelated SCT compared with related SCT when the transplant is provided by a molecularly perfect matched donor<sup>11</sup>. More than 50% of the mortality associated with unrelated alloSCT is secondary to acute and chronic GVHD.

Non-ablative preparative regimens (mini-transplants, reduced intensity transplants) have attempted to expand the indications of alloSCT to older patients, and to reduce transplant mortality and complications. Preparative regimens rely on immunosuppressive therapy to allow for donor cell engraftment. Early results of non-ablative regimens in patients not eligible for standard transplant show acceptable degrees of engraftment, less mortality, more persistent residual disease, and perhaps similar degrees of GVHD. The improved results from reduced morbidity and mortality may be offset by the higher incidence of persistent or recurrent disease, which could be approached with post SCT maneuvers such as donor lymphocyte infusions (DLI), IFN- $\alpha$ , or imatinib.

### Imatinib Mesylate (Gleevec, STI571)

Imatinib has revolutionized the treatment of CML. Following preclinical studies, imatinib entered phase I trials in 1998, and was approved by the FDA in 2001 for the treatment of CML in chronic phase post IFN- $\alpha$  failure, accelerated phase, and blastic phase. Imatinib is a small molecule 2-phenylaminopyrimidine that acts as an ATP mimic thus occupying the binding site for ATP within BCR-ABL which then leads to inhibition of the phosphorylation of tyrosine residues on substrate proteins and BCR-ABL itself<sup>12</sup>. Consequently, imatinib prevents activation of signal transduction pathways that are crucial for CML leukemogenesis.

In a phase I study of patients with late chronic phase and blastic phase CML, including Ph-positive ALL, the dose of imatinib was escalated from 25 mg to 1000 mg orally daily<sup>13,14</sup>. Common but rarely serious side effects included nausea and vomiting, diarrhea, skin rash, muscle cramps, bone or joint aches, myelosuppression, and weight gain. Less common side effects occurring at higher doses were fluid retention, periorbital and peripheral edema, fever, occasional liver dysfunction, and decreased skin pig-

mentation. No maximum tolerated dose or dose-limiting toxicities were defined, but toxicities were more significant at doses of 800 mg or more daily. In the Phase I chronic phase study, 83 patients were treated. Among 54 patients who received imatinib mesylate at doses of 300 mg or more, the CHR rate was 98 %, and the cytogenetic response rate 31 % (complete in 13%)<sup>13</sup>. In CML blastic phase, the marrow complete remission rate (marrow blasts < 5 % with or without peripheral count recovery) was 32 % in myeloid blastic phase and 55 % in lymphoid blastic phase; but responses were transient<sup>14</sup>.

Three multi-institutional multinational pivotal studies of imatinib in IFN- $\alpha$  failure late chronic phase, accelerated phase, and blastic phase were completed. The phase II study in chronic phase CML post IFN- $\alpha$  failure included 532 patients<sup>15</sup>. Major cytogenetic responses were observed in 65 % of patients, and were complete in 48 %. The estimated 24-month transformation rate was 13 %; the estimated 24-month survival rate was 92 %. A lower incidence of major cytogenetic response was observed in patients with splenomegaly, thrombocytopenia, anemia, longer duration of chronic phase, active disease, clonal evolution, and 100 % Ph positivity at the start of therapy.

A multinational study randomized 1106 patients to either imatinib 400 mg orally daily or a combination of IFN- $\alpha$  5 Mu/m<sup>2</sup> daily with ara-C 20 mg/m<sup>2</sup> subcutaneous daily  $\times$  10 every month<sup>7</sup>. The median follow-up time is 19 months. After 18 months of therapy, imatinib was associated with significantly higher rates of major cytogenetic responses (83 % versus 20 %) and complete cytogenetic responses (68 % versus 7 %), and with lower rates of progression (3 % versus 20 %), transformation (1.5 versus 9 %), and intolerance (1 % versus 19 %). Survival rates were 97 % versus 95 % ( $p = 0.16$ ). However, the median duration of IFN- $\alpha$  plus ara-C therapy was only 8 months, and 89 % of patients have either crossed over to imatinib therapy (58 %) or elected to be taken off therapy and treated with commercially available imatinib. Therefore a survival advantage of imatinib will not be detectable with this study. Based on these results, imatinib is now considered the frontline standard of care for CML patients in early chronic phase.

The incidence of qualitative or quantitative RT-PCR negativity is currently about 10 % in chronic phase post IFN- $\alpha$  failure (median follow-up 3 years), 10 % in newly diagnosed patients after 12 months of imatinib 400 mg daily, and 30 % or more in similar patients treated with imatinib 800 mg daily<sup>16</sup>.

### Choice of initial therapy for patients with chronic phase CML

Patients with newly diagnosed chronic phase CML treated outside the setting of a clinical trial may be offered therapy either with imatinib or alloSCT. The choice of therapy is based on: 1) the benefit: risk ra-

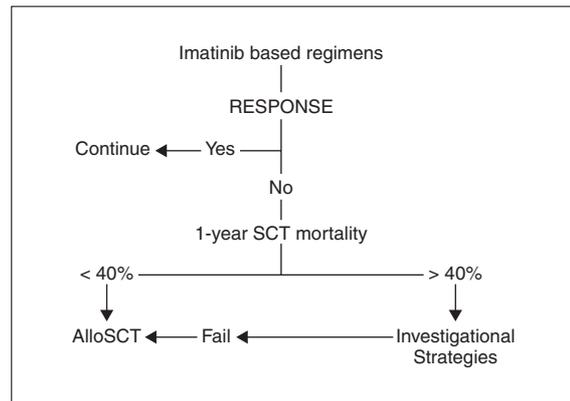


Figure 1. Treatment algorithm for patients with newly diagnosed chronic phase CML. Response is considered as the achievement of a complete cytogenetic response at 12 to 24 months.

tio of alloSCT versus imatinib, 2) patient risk group, and 3) patient preference. Although the standard of care is still controversial and continuously updated, the treatment algorithm at our center is based on the following principles (fig. 1):

1. Postponing allogeneic SCT for up to 24 months, and pre-transplantation use of imatinib do not influence transplant outcome adversely<sup>10</sup>.
2. The 1-year TRM is age-related and may define what is a reasonably acceptable risk of transplant in exchange for long-term outcome.
3. The median survival with IFN- $\alpha$  based regimens is 6 to 7 years, for good risk patients it is 9 years, for patients who achieve a complete cytogenetic response, the 10-year survival rate is 70 % to 80 %<sup>2</sup>.
4. Since imatinib induces complete cytogenetic response rates of 60 % or more<sup>7</sup>, the median survival in CML may exceed 10 years if the significance of a complete cytogenetic response is similar with imatinib as with IFN- $\alpha$  therapy.

Arguments favoring upfront allogeneic SCT are:

1. It is the only proven curative modality.
2. Delaying alloSCT may worsen patient outcome; and long-term follow up results with imatinib are not yet available; hence: *a*) it could have a transient benefit, *b*) it may not have the same association of cytogenetic response with survival, *c*) it may have unexpected long-term toxicities, and *d*) it may adversely affect alloSCT results.

Arguments favoring imatinib as frontline CML therapy are:

1. There is the potential of long-term event-free survival outside the setting of alloSCT (10 % at 10-years with IFN- $\alpha$ ).

2. Comparing imatinib to IFN- $\alpha$ , the complete cytogenetic response rates (68% versus 7%) and major cytogenetics response rates (83% versus  $\leq 20\%$ ), surrogate endpoints for better survival, are much higher with imatinib.

3. Aside from alloSCT mortality (5% to 20% in some series, 10% to 50% in others), there are considerable toxicities associated with alloSCT (cataracts, sterility, second cancers, hip necrosis, decrease quality of life, GVHD).

4. The follow up studies with imatinib have not shown significant unusual or unexpected side effects, or high rates of resistance in chronic phase.

### Frontline therapy for patients with newly diagnosed chronic phase CML at MD Anderson Cancer Center

Based on the above discussion, and until the data from imatinib and alloSCT matures further, patients may be offered both options as initial therapies, after detailed discussion of updated results. Our current recommendation for patients with newly diagnosed CML is a trial of imatinib. This is based on several facts including:

1. Lack of data indicating that delaying transplantation for 12 to 24 months results in worse post-transplantation outcomes.

2. Lack of data suggesting that prolonged use of imatinib results in unexpected serious side effects (our combined experiences goes back to 1998).

3. Practical considerations including the fact that related donors are only available for a fraction of patients, that there is a delay from initial diagnosis to actual transplantation, and that unrelated transplantation is associated with significantly worse outcomes.

Finally, and more importantly, in my experience patients are electing to receive a trial of imatinib prior to transplantation. This is probably based not only on the activity of imatinib but on the relative excellent toxicity profile of the drug, and the fact that patients do not need to change their life styles as significantly as they would if they had received alloSCT. Also there is a trend changing the concept of cure in leukemia where a patient is considered "cured" if he or she does not die from complications of the disease or its treatment, similar to that of other chronic diseases.

Because of these issues, it is crucial at the present time to develop a proper definition of imatinib failure. Such criteria has not been fully developed. Most investigators accept several criteria, including:

1. Lack of complete hematological response at 3 months post-imatinib.
2. Lack of complete cytogenetic response at 12 to 24 months.

3. Loss of cytogenetic response after successful imatinib therapy. This is temptatively defined as reappearance of Ph positive metaphases after achievement of complete cytogenetic response, although strict criteria has not been clearly established.

4. Imatinib associated toxicity that precludes its use above doses of 300 mg even with the use of maximal supportive care including growth factors.

Finally, it should be noted that at the prognostic value of molecular responses, or lack of them, and the fluctuation of *BCR-ABL* levels has not been established, nor for the presence of *BCR-ABL* mutations. Therefore data maturation is needed before using these molecular markers to decide on therapy.

### Conclusion

At the present time both imatinib and alloSCT are acceptable frontline therapies for patients with newly diagnosed chronic phase CML. The decision to choose one or another is based on donor availability and patient preference. In our center, we consider that providing a trial of imatinib prior to transplantation is the optimal approach for these patients. Although clear criteria for imatinib failure exists, such as failure to achieve a CHR after 3 months of therapy, more refined molecular endpoints are required to define the best time for transplantation.

### References

1. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999;341:164-72.
2. García-Manero G, Faderl S, O'Brien S, Cortés J, Talpaz M, Kantarjian HM. Chronic myelogenous leukemia: a review and update of therapeutic strategies. *Cancer* 2003;98:437-57.
3. Clift RA, Buckner CD, Thomas ED, et al. Marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: a randomized study comparing cyclophosphamide and total body irradiation with busulfan and cyclophosphamide. *Blood* 1994;84:2036-43.
4. Bonifazi F, De Vivo A, Rosti G, et al. Chronic myeloid leukemia and interferon-alpha: a study of complete cytogenetic responders. *Blood* 2001;98:3074-81.
5. Guilhot F, Chastang C, Michallet M, et al. Interferon alfa-2b combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia. French Chronic Myeloid Leukemia Study Group [see comments]. *N Engl J Med* 1997;337:223-9.
6. Baccarani M, Rosti G, De Vivo A, et al. A randomized study of interferon-alpha versus interferon-alpha and low-dose arabinosyl cytosine in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2002;99:1527-35.
7. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003;348:994-1004.
8. van Rhee F, Szydlo RM, Hermans J, et al. Long-term results after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase: A report from the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1997;20:553-60.
9. Gratwohl A, Hermans J, Niederwieser D, et al. Bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: Long-term results. Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Bone Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1993;12:509-16.
10. Hehlmann R, Hochhaus A, Kolb HJ, et al. Interferon-alpha before allogeneic bone marrow transplantation in chronic myelogenous leukemia does not affect outcome adversely, provided it is discontinued at least 90 days before the procedure. *Blood* 1999;94:3668-77.
11. Hansen JA, Gooley TA, Martin PJ, et al. Bone marrow transplants from unrelated donors for patients with chronic myeloid leukemia [see comments]. *N Engl J Med* 1998;338:962-8.

12. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 1996;2:561-6.
13. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001;344:1031-7.
14. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, et al. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* 2001;344:1038-42.
15. Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, et al. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 2002;346:645-52.
16. Kantarjian H, Talpaz M, O'Brien S, et al. High-dose imatinib mesylate therapy in newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic phase chronic myeloid leukemia. *Blood* 2004;103:2873-8.

# PROGENITOR CELLS TRANSPLANTS IN SOLID TUMORS (BREAST CANCER)

G. ROSTI<sup>a</sup>, O. CARMINATI<sup>a</sup> Y T. DEMIRER<sup>b</sup> (ON BEHALF OF THE EBMT SOLID TUMORS WORKING PARTY)

<sup>a</sup>Department of Oncology and Hematology. Ospedale Civile Santa Maria delle Croci. Ravenna. Italy. <sup>b</sup>University of Ankara. Turkey.

## Progenitor cells transplantation in Solid Tumors (breast cancer)

Few aspects of Medical Oncology have been so extensively debated as high-dose chemotherapy and hematopoietic rescue in the treatment of solid tumors in the last two decades or so. Everything started in the mid eighties when this policy was moved from hematologic neoplastic disorders to solid tumors. Early experiences conducted mainly in the US<sup>1,2</sup>, showed interesting results in far advanced breast carcinoma, with nearly 30 % complete response rates in heavily pretreated patients and a conversion rate on 30-40 % (i.e. the response upgrade from partial to complete). The concept of high-dose was considered as a synonymous with late intensification in those early years, i.e. patients received high-dose chemotherapy after several courses (or lines) of standard treatment. Concomitantly, reports of decreased survival associated with reduced doses of chemotherapy, provided additional stimulus for the concept of dose intensification. Hryniuk and others<sup>3</sup> were instrumental in crystallizing this concept, providing a scientific platform for the development of multiple approaches to dose enhancement. Treatment related toxicity proved to be extremely high in the first experiences (in the range of 10-15 %), whereas in the last years of the past decade the fatal toxicity declined at least for breast cancer to 1-3 %. What are the reasons for such a dramatic decline in lethal events during high-dose chemotherapy and autologous hematopoietic transplantation? Certainly the possibility of employing peripheral blood progenitor cells instead of autologous marrow is one of the reasons<sup>5</sup>, together with the wide application of hematopoietic growth factors (G and GM-CSF) in order to accelerate recovery. But even a better patients selection and higher level of knowledge among groups did play a major role in such a reduction.

The number of patients receiving high-dose chemotherapy programs in Europe increased nearly exponentially during the first part of the last decade, reaching the incredible number of nearly 1,800 patients yearly. In the second half of the nineties virtually all patients received PBPCT and not ABMT as hematopoietic support.

But it was time to move from phase II studies to randomised phase III clinical trials. In May 1999 at the annual ASCO Meeting held in Atlanta, three randomised studies have been presented in a very crowded room. One study on high-risk operable breast carcinoma presented by a South African author proved to be a total flake some months later after a commission onsite visit in Johannesburg. This created an atmosphere of ostracism and pessimism among the scientific community. We will not take into consideration in this review this study because it was not a "study". Nevertheless the damage to the image of research in such field proved to be enormous. At the same ASCO Meeting an Interscandinavian study<sup>6</sup> was presented on adjuvant therapy for breast carcinoma comparing "standard" dose FEC versus high-dose chemotherapy. No difference emerged at a short follow up of less than three years; but it has to be remembered that in this trial the so called "standard" therapy was in fact a sort of "high-dose" one with tailored doses. This study was unable to show if high is better than low. A third study on high-risk patients was presented by the Dukes University Group<sup>7</sup> and it has not yet been extensively published, but re-proposed two years later with updated follow-up. This trial did not show any difference between the two arms, but anyway it showed a dramatic improve in terms of event-free survival for both arms (nearly 60% DFS at 5 years) if we take into consideration the known results of other standard dose studies. Nevertheless this has been considered as a negative trial by several Medical Oncologists and by media. Surprisingly in subsequent studies on high-risk breast carcinoma, the Peters' standard arm has never been employed by others, despite the high DFS rate with a very low morbidity. In the field of metastatic disease, the PBT 1 trial<sup>8</sup> (also known as the Philadelphia study) compared standard CMF (which is not a standard regimen in such a disease) with high-dose chemotherapy, single shot of thiotepa, cyclophosphamide and cisplatin (so called STAMP V). The study contained possible biases, but as the results in terms of overall survival were the same, the majority of Medical Oncologists abandoned the ship of high-dose chemotherapy in metastatic breast cancer. A very

Table 1. High-Risk Breast Cancer: Randomized Studies of High-Dose Chemotherapy (Jan 2004 update)

Author	Patients	Selection	Conventional ARM	High-dose ARM	RFS analysis
Rodenhuis	885	4N	5 × FEC	4 × FEC - CTC	HD better, p = 0.02
Peters	785	10N	4 × CAF + ID-CPB	4 × CAF + HD-CPB	No difference, HD less relapses
Crown	605	4N	4 × A + 8 × CMF	4 × A + HD-C - CT	No difference
Tallman	540	10N	6 × CAF	6 × CAF + CT	No difference, HD less relapses
Bergh	525	8N	9 × FEC	3 × miniFEC + CTCb	9 × FEC better
Nitz	403	10N	4 × ddEC + 3 × ddCMF	2 × EC + 2 × EC-Thiotepa	HD better, p = 0.002
Gianni	382	4N	3 × Epi + 6 × CMF	HD-sequential	HD better NS
Basser	344	High-risk	4 × AC + 3 × CMF	3 × E200C4000	HD better, NS
Roché	314	8N	4 × FEC	4 × FEC + CMA	HD better
Zander	307	10N	4 × EC + 3 × CMF	4 × EC + CTM	HD better, NS
Bliss	281	4N	6 × FEC	3 × FEC + CTCb	No difference
Tokuda	97	10N	6 × CAF	6 × CAF + CT	HD better, NS
Rodenhuis	81	Infraclav biopsy	4 × FEC	4 × FEC + CTC	No difference
Hortobagyi	78	4N/10N	8 × CAF	8 × CAF + 2 × CEP	No difference

small study carried out in France and named PEGASE 04 was presented by Dr Lotz; this study clearly showed in advanced disease an increment in terms of overall survival (which doubled in the high-dose arm), but as the study has been prematurely closed with nearly 60 patients it could not be considered as body of Evidence Based Transplantology. So after the shipwreck of ASCO 1999, many other studies in breast carcinoma have been closed in Europe and in the USA (SWOG, Belgian, etc); the reduction in number of patients grafted each year dramatically declined specially in North America and leaving only few hundreds patients receiving a form of intensification therapy with peripheral blood progenitor cell support in the world.

Nevertheless, some investigators survived the shipwreck and in recent years other trials became mature with definitive positive results. This is the case for the National Dutch Adjuvant trial which included nearly 900 patients<sup>9</sup> and was carried out in less than 6 years. This trial compares in patients with four or more positive lymph-nodes standard FEC chemotherapy versus standard FEC followed by a single shot of the European version of the STAMP V program, including double dose of Carboplatin (1,600 mg/sqm). Overall survival was not different among the two groups, but recurrence-free survival was better for the high-dose arm (hazard ratio 0.79 with p = 0.025). Surprisingly patients with HER2/neu negative tumors did significantly better than those with positive ones (Hazard ratio 0.71 with p = 0.02). Moreover in the planned subgroup analysis on 317 patients with 10 or more positive axillary nodes high-dose chemotherapy compared favourably with standard FEC, with Hazard ratio of 0.64 and p = 0.006 (the same applies also to

overall survival in the 10 and plus cohort). As in other studies, curves tend to progressively separate from 36 months on, so further improvements are possibly to come. The somehow unexpected result on HER2/neu may be justified by the less sensitivity to alkylating agents shown by HER2/neu tumors as shown in several other studies in the recent years. These tumors do much better when anthracyclines are used, and HDCT programs generally do not include such drugs. In February 2004 the West German study was updated at a Meeting in Ravenna by Prof. Nitz. In this study patients with 4 or more positive nodes have been randomized between two courses: EC (Epidoxorubicin and Cyclophosphamide) followed by two high-dose shots: Epidoxorubicin 90 mg/sqm, Cyclophosphamide 3 g/sqm and Thiotepa 400 mg/sqm supported by PBPC or EC × 4 courses and thereafter CMF per three courses. Overall and recurrence-free survival are significantly better for the high-dose arm (p = 0.020). Other studies are coming nowadays to a mature follow-up including the PEGASE 01, the Hamburg Adjuvant Study and so on. An updated list of the most important studies in adjuvant therapy is presented in table 1. Despite these recent results it seems quite difficult to restore scientific interest in high-dose chemotherapy for breast carcinoma; it should be remembered that in several countries (Switzerland, Canada, Belgium, Spain and others) these procedures fell down to zero in the last years and virtually no patient is planned to receive such treatment in 2004. Moreover recent update of the data from the EBMT Solid Tumors Registry clearly show that the baby has not to be thrown away with the bath water<sup>10</sup>. This report which takes into consideration the

EBMT reports between 1990 and 1999, shows that 5-year disease free survival for women with metastatic disease transplanted in complete remission is 29%; moreover the 5-year disease free survival for patients with high-risk (10 or more positive nodes) is 53%.

Nevertheless some randomized clinical studies are going on, on behalf of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT), one in patients with partial remission after standard chemotherapy and one in those achieving complete response. It will be quite difficult to finish such studies without an International consensus and collaboration, also taking into consideration the huge number of patients to be treated to see a significant difference, if it exists. But taking into consideration the recent positive results on the dose-dense hypothesis<sup>11</sup>, we think that the role of dose and timing in the treatment of breast cancer patients is far from being solved. To slam the door of high-dose chemotherapy, as recently reiterated by opinion leaders<sup>12</sup> may not be the best way to go. The best future approach will be use of tailored therapies based on DNA micro-arrays, to find out those who are candidate to a high-dose program and those who are not.

## References

1. Spitzer G, et al. High-dose combination chemotherapy with autologous bone marrow transplantation in adult solid tumors. *Cancer* 1980; 45:3075-3085.
2. Steward PS. Autologous bone marrow transplantation in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1982;2:85-92.
3. Hryniuk WM, Bush H. the importance of dose intensity in chemotherapy of metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1984;2:1281-8.
4. Gratwohl A, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for solid tumors in Europe. *Ann Oncol* 2004;15:653-60.
5. Siena S, et al. Durability of hematopoiesis following autografting with peripheral blood hematopoietic progenitors. *Ann Oncol* 1994;10:935-41.
6. Bergh J, et al. Tailored fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide compared with bone marrow supported high-dose chemotherapy as adjuvant treatment for high-risk breast cancer. A randomised trial- Scandinavian Breast Group 9401 study. *Lancet* 2000;356:1384-91.
7. Peters W, et al. A prospective randomised comparison of two doses of combination alkylating agents as consolidation after CAF in high-risk primary breast cancer involving ten or more axillary lymph-nodes. Preliminary results of CALGB 9082/SWOG 9114/NCIC MA-13. *Proc ASCO* 20; 21a, 2001 (abstract 81).
8. Stadtmauer EA, et al. Conventional-dose chemotherapy compared with high-dose chemotherapy plus autologous hematopoietic stem-cell transplantation for metastatic breast cancer. Philadelphia Bone Marrow Transplant Group. *N Engl J Med* 2000;342:1069-76.
9. Rodenhuis S, et al. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for high-risk breast cancer. *N Engl J Med* 2003;349:7-16.
10. Pedrazzoli P, et al. Autologous hematopoietic stem-cell transplantation for breast cancer in Europe: critical evaluation of data from the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) Registry 1990-1999. *Bone Marrow Transplant* 2003;32:489-94.
11. Citron M. Randomized trial of dose-dense versus conventionally scheduled and sequential versus concurrent combination chemotherapy as postoperative adjuvant treatment of node-positive primary breast cancer: first report of Intergroup Trial C9741/Cancer and Leukemia Group B. *J Clin Oncol* 2003;21:1431-9.
12. Hortobagyi GN. What is the role of High-Dose Chemotherapy in the era of targeted therapies? *J Clin Oncol*, in press, 2004.

# ESTUDIO DEL QUIMERISMO HEMATOPOYÉTICO EN EL TRASPLANTE ALOGÉNICO DE MÉDULA ÓSEA

A. URBANO-ISPIZÚA<sup>a</sup>, F. FERNÁNDEZ-AVILÉS<sup>a</sup>, J. BRIONES<sup>b</sup> Y M. AYMERICH<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Hospital Clínic y <sup>b</sup>Hospital Sant Pau. Departamento de Hematología. Barcelona.

## Introducción

En los últimos años, las técnicas basadas en el análisis del ADN se han constituido en la principal herramienta para el estudio del quimerismo. Si bien el Southern blot era la técnica más usada, ésta ha sido sustituida por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Además, también han ido cambiando los distintos tipos de polimorfismos de ADN utilizados para distinguir al donante del paciente. En el momento actual, el más empleado es el denominado de secuencias polimórficas repetitivas STR (*short tandem repeat*)<sup>1-3</sup>. Para un correcto estudio del quimerismo, los marcadores utilizados deben ser capaces de distinguir el ADN de dos individuos emparentados, esto es ser *informativos*, y la técnica empleada debe poder detectar material genético de ambos aun cuando la cantidad de uno de ellos esté muy poco representada en la muestra biológica, es decir ha de ser suficientemente *sensible*. El cumplimiento de estos dos conceptos es crucial para una correcta clasificación de los pacientes en cuanto a su “estado quimérico”. La sensibilidad obtenida va a depender de la técnica utilizada para el estudio, aunque existen otros factores que, como se verá más adelante, también pueden influir. En general, la PCR es la técnica de mayor sensibilidad y, por tanto, la recomendada para el análisis del quimerismo<sup>1-4</sup>.

La elección de los marcadores polimórficos que se van a analizar es igualmente importante para obtener un resultado correcto y evitar interpretaciones erróneas. Deben de cumplir dos requisitos: *a)* un alto índice de heterozigosidad, y *b)* un número elevado de alelos en la población. Lo ideal es que el donante y el paciente no tengan ningún alelo en común, y en el caso de que lo tuvieran, el donante y el paciente han de tener un alelo específico de cada uno no compartido. Los STR presentan las características que ha de tener todo marcador genético susceptible de ser utilizado en el análisis del quimerismo; por otra parte, el pequeño tamaño de las secuencias hace que todas ellas se puedan detectar mediante PCR y, en muchos casos, incluso es posible el estudio simultáneo de varios *loci* STR mediante la PCR multiplex. Si ésta se combina con una técnica automatizada de tinción multicolor de los cebadores y lectura en ABI Prism, podremos definir el tamaño de los diferentes fragmentos amplificados y cuantificar cada uno de ellos<sup>5</sup>. El estado del quimerismo hematopoyético conviene analizarlo en poblaciones celulares puras de linfocitos T y de neutrófilos, que pueden fácilmente separarse mediante métodos físicos o inmunomagnéticos. Con estos métodos, en la fracción linfóide T, más del 95 % de las células son CD3+, detectadas mediante citometría de flujo<sup>6</sup> (fig. 1).

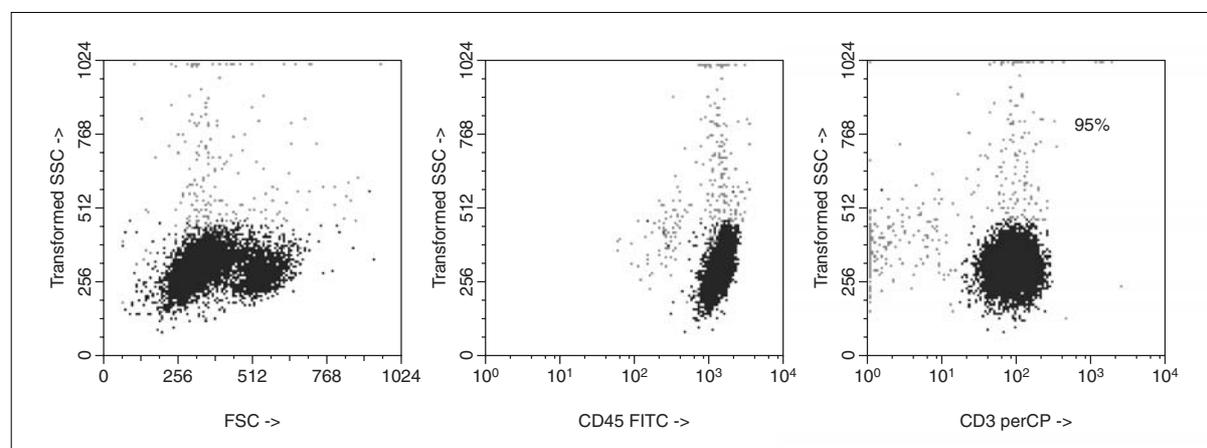


Figura 1. Representación de la fracción linfóide T (CD3+) detectada mediante citometría de flujo.

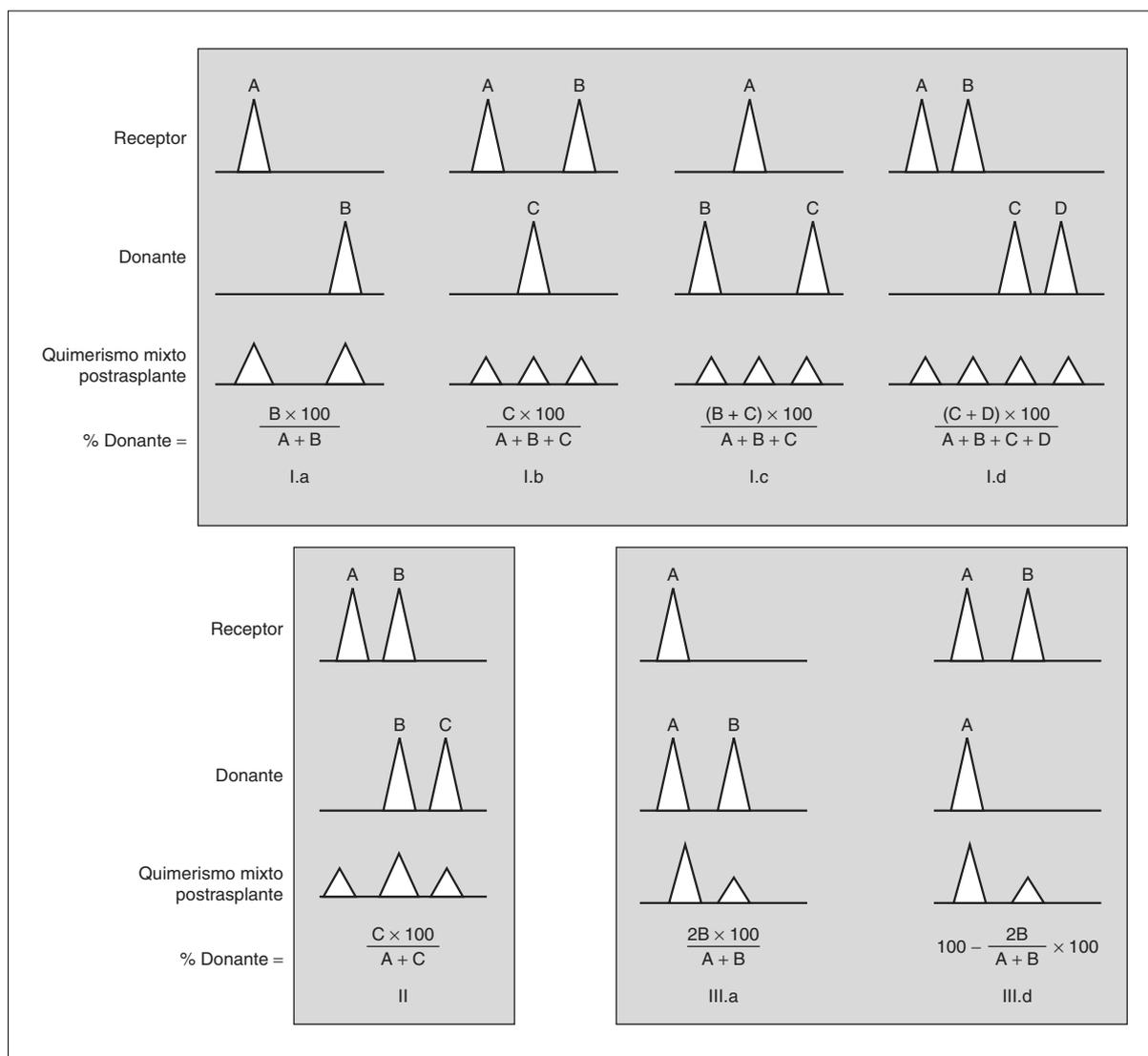


Figura 2. Cuantificación del porcentaje del donante en el quimerismo mixto postrasplante. I. Las bandas del receptor (R) y del donante (D) son homo-heterocigotas (I.a, I.b, I.c, I.d) y no presentan alelos en común. II. R y D son heterocigotas y comparten un alelo. III. Cualquiera D (III.a) o R (III.b) son heterocigotas y un alelo es idéntico a la banda homocigota del otro. % Donante: el porcentaje de quimerismo del donante se calcula con la correspondiente fórmula utilizando una hoja del sistema Excel. (Modificada de Leukemia 2001;15:303-6.)

Para el análisis del quimerismo mediante PCR/STR se puede utilizar un *kit* comercial (AmpFISTR Profiler Plus PCR; Perkin-Elmer, Norwalk, CT, EE.UU.) que analiza nueve STR: D3S1358, vWA, FGA, D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317, D7S820, y un segmento del gen de la amelogenina para distinguir el cromosoma X o Y<sup>5,6</sup>. La separación y detección de los productos amplificados por PCR se lleva a cabo mediante un secuenciador automático de ADN (ABI Prism 310 automated DNA sequencer; Applied Biosystems). El tamaño de los fragmentos se detecta automáticamente mediante dos métodos informáticos (ABI Prism GeneScan 2.0 y GenoTyper; Applied Biosystems). La tinción con diferentes colores per-

mite identificar alelos de tamaño muy similar. Además, en esta técnica sólo está marcado uno del par de cebadores, evitándose así el problema de los dobletes vistos con el empleo de los geles. Por último, la cuantificación del quimerismo mixto (QM) se efectúa calculando el porcentaje de componente del donante y del receptor utilizando las fórmulas que se detallan en la figura 2. Se considera QM cuando el porcentaje de linfocitos T o de neutrófilos del receptor es superior al 5%. En nuestra experiencia, con la técnica automatizada de PCR/STR (ABI Prism) para el estudio del quimerismo obtuvimos un nivel de sensibilidad del 5% de forma constante<sup>6</sup> (fig. 3), aunque en algunas muestras este nivel llegó a ser del 1%.

A parte de los aspectos técnicos que condicionan la sensibilidad del análisis quimerismo hematopoyético mediante PCR/STR, existen dos aspectos prácticos que pueden ayudar a optimizarlo. Por un lado, la obtención de muestras de forma secuencial y en intervalos de tiempo cortos y, por otro, el análisis del quimerismo en subpoblaciones celulares separadas. En 1995, Socie et al<sup>7</sup> sugirió que el conocimiento del patrón del quimerismo y su cinética tras el trasplante, realizando el análisis en varias líneas celulares y de forma secuencial, permite monitorizar estrechamente la dinámica del implante hematopoyético y detectar precozmente la recidiva leucémica tras el trasplante<sup>8</sup>. Mediante la separación de subpoblaciones celulares, la sensibilidad de la PCR puede aumentar al focalizar el estudio en las líneas celulares de interés clínico, reduciendo de esta manera los resultados irrelevantes<sup>5,6,8</sup>. Dubovsky et al<sup>9</sup> comunicaron que la separación celular permite detectar pequeños cambios del patrón del quimerismo que pueden pasar inadvertidos cuando el quimerismo se analiza en muestras de sangre total.

Nosotros hemos estudiado en una serie de pacientes el quimerismo hematopoyético simultáneamente en muestras de sangre total y en subpoblaciones celulares, obteniendo un incremento considerable de sensibilidad de la PCR/STR con la separación celular. Así, mientras que en cuatro muestras de sangre total se detectaba un quimerismo completo (QC) del donante, el análisis en poblaciones separadas de linfocitos T y de neutrófilos identificó un pequeño porcentaje de componente linfoide T del receptor<sup>6</sup>. Además, cuando en dos muestras de sangre total se demostró un QM de pequeña cuantía, el estudio en subpoblaciones celulares objetivó un aumento del porcentaje del componente del receptor a expensas de la fracción linfoide T, mientras que el quimerismo en neutrófilos era completo. Estos resultados enfatizan la utilidad de realizar el estudio del quimerismo hematopoyético en subpoblaciones celulares. Además, el significado clínico del QM puede ser diferente según se detecte en linfocitos T o en neutrófilos, como veremos más adelante.

Los dos tipos de trasplante en los que tiene un mayor interés el análisis del quimerismo, por la mayor probabilidad de fallo de implante y de recidiva leucémica respecto a los trasplantes convencionales, son los que se efectúan con eliminación de linfocitos T del inóculo y con intensidad de acondicionamiento reducida. A estos dos tipos de trasplante nos dedicaremos en los párrafos siguientes.

### Quimerismo en el trasplante alogénico con eliminación de linfocitos T

La enfermedad de injerto contra huésped (EICH) es una de las principales causas de mortalidad tras el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH). La eliminación de linfocitos T (ELT) *ex vivo* del inóculo es la forma más efectiva de

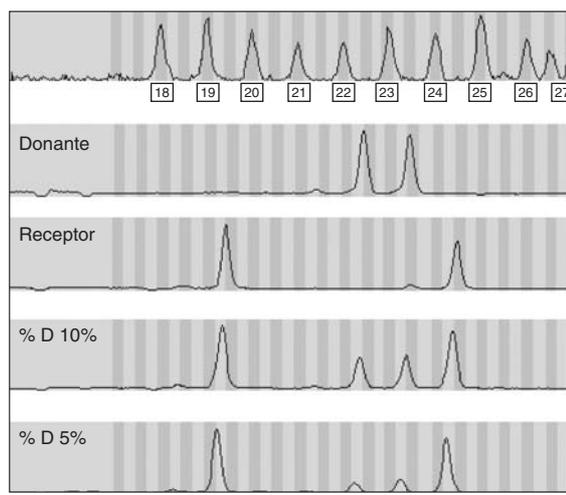


Figura 3. Sensibilidad de la técnica de la PCR/STR para el análisis del quimerismo hematopoyético. “% D” corresponde al porcentaje de ADN del donante en la muestra analizada.

profilaxis de la EICH. Sin embargo, la ELT se asocia a un incremento en los fallos del implante y en las recidivas. En un grupo de 22 pacientes sometidos a alotrasplante con ELT mediante selección positiva de células CD34+ analizamos de forma prospectiva el estado del quimerismo en linfocitos T y en neutrófilos mediante PCR/STR<sup>6</sup>. En el 77% (17/22) de los pacientes se detectó un QM a una mediana de 2 (1-16) meses postrasplante (fig. 4). En cambio, la frecuencia del QM en pacientes que recibieron un alotrasplante sin ELT (n = 18) fue sólo del 17% (3/18; p = 0,0003). Esta diferencia fue debida a una mayor frecuencia de QM en linfocitos T (QMLT) en el grupo de pacientes tratados con ELT (72,3 frente a 5,5%; p = 0,0001). Esta alta frecuencia de QMLT en el grupo de ELT se observó a pesar de que en este grupo de pacientes se administró una dosis mayor de irradiación corporal total (13 Gy frente a 12 Gy) y una cantidad mayor de células CD34+ (mediana de  $4,8 \times 10^6/\text{kg}$  frente a  $2,9 \times 10^6/\text{kg}$ ; p = 0,04). Estos resultados permiten destacar el papel fundamental que desempeñan los linfocitos T del donante para eliminar las células linfoides T residuales del receptor, las cuales pueden comprometer el implante hematopoyético, sobre todo en el alo-TSP/ELT. Sin embargo, la presencia de un QMLT no se asoció a un fallo del implante hematopoyético en la mayoría de los pacientes. Así, en 13 de los 17 pacientes (76,5%) con un QMLT, la presencia de linfocitos T del receptor fue transitoria o se mantuvo estable a lo largo de muchos meses tras el trasplante, y sólo en 4 casos (23,5%) progresó y se acompañó de pancitopenia o fallo del implante, de forma similar a como se ha publicado previamente<sup>10</sup>. En estos 4 pacientes el porcentaje de linfocitos T del receptor fue superior al 30% (fig. 5), mientras que sólo en uno de ellos se mantuvo a lo largo del tiempo, con un por-

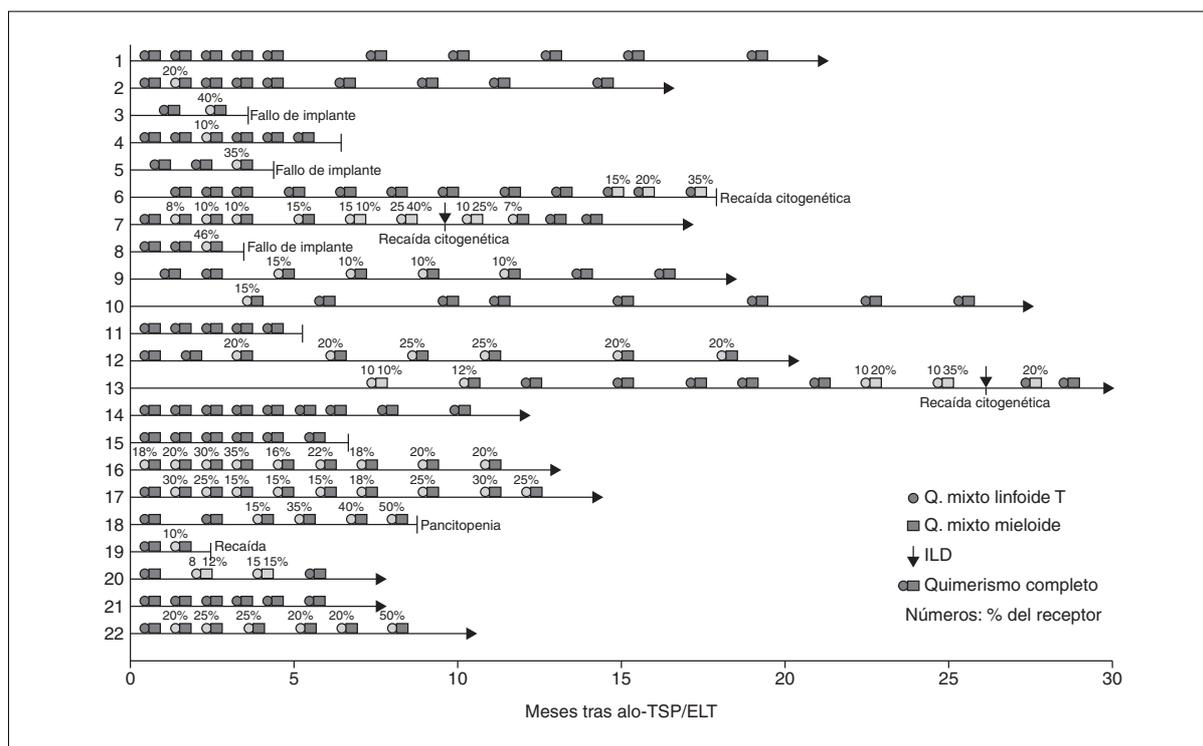


Figura 4. Análisis del quimerismo en el alo-TSP/ELT.

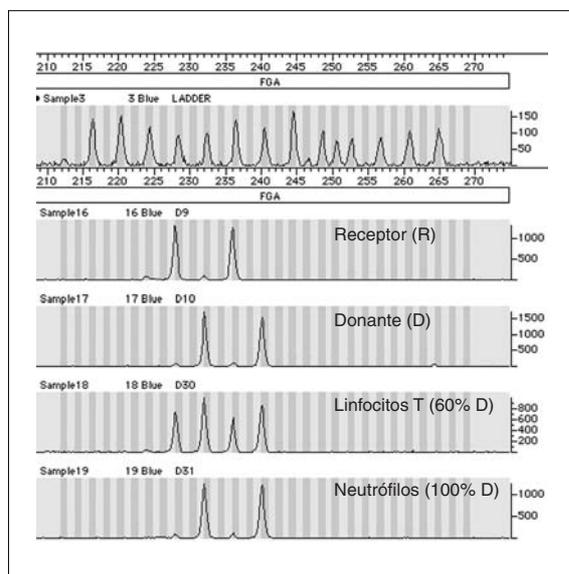


Figura 5. Quimerismo mixto en linfocitos T asociado a fallo de implante (% componente del receptor > 30%).

centaje entre 15-65% en los 3 años de seguimiento, habiendo presentando únicamente una pancitopenia transitoria. En los tres pacientes en los que el QMLT evolucionó a fallo de implante se había infundido una dosis de linfocitos T de  $0,1 \times 10^6/\text{kg}$ , mientras que se infundieron  $0,3 \times 10^6/\text{kg}$  células

CD3+ en el paciente que, aún alcanzando un porcentaje de linfocitos T del receptor superior al 30%, sólo presentó una pancitopenia transitoria<sup>6</sup>. Esta persistencia de QMLT estable tras un trasplante con ELT y sin repercusión clínica en el implante hematopoyético ha sido comunicada por otros autores<sup>11,12</sup>.

La relación del QMLT con la recidiva leucémica es controvertida. Mientras que algunos autores han comunicado la existencia de una incidencia mayor de recidiva en los pacientes con QMLT respecto a aquellos con QC en linfocitos T (QCLT)<sup>10</sup>, en nuestro estudio<sup>6</sup>, y en otros<sup>13,14</sup>, no se ha observado dicha asociación. Por el contrario, estudios recientes sugieren que la presencia de un cierto grado de componente linfohematopoyético del receptor podría favorecer el efecto antileucémico tras la infusión de linfocitos del donante<sup>15</sup>. En cuanto a la EICH, algunos autores han observado una tendencia a una incidencia menor de EICH aguda grados II-IV en pacientes con QMLT<sup>16,17</sup>, apoyando el concepto de que las células linfoides T del receptor pueden inducir tolerancia de las células hematopoyéticas del donante. Así pues, en nuestro estudio, ninguno de los 17 pacientes con QMLT desarrolló una EICH aguda grados II-IV, mientras que sí lo hicieron 5 de los 23 pacientes con el 100% de linfocitos T del donante ( $p = 0,06$ ).

La incidencia de QM mieloide (QMMi) fue baja y similar en ambos grupos de pacientes. A diferencia de lo observado en los pacientes con QMLT, en los que esta situación permanecía estable en el tiempo

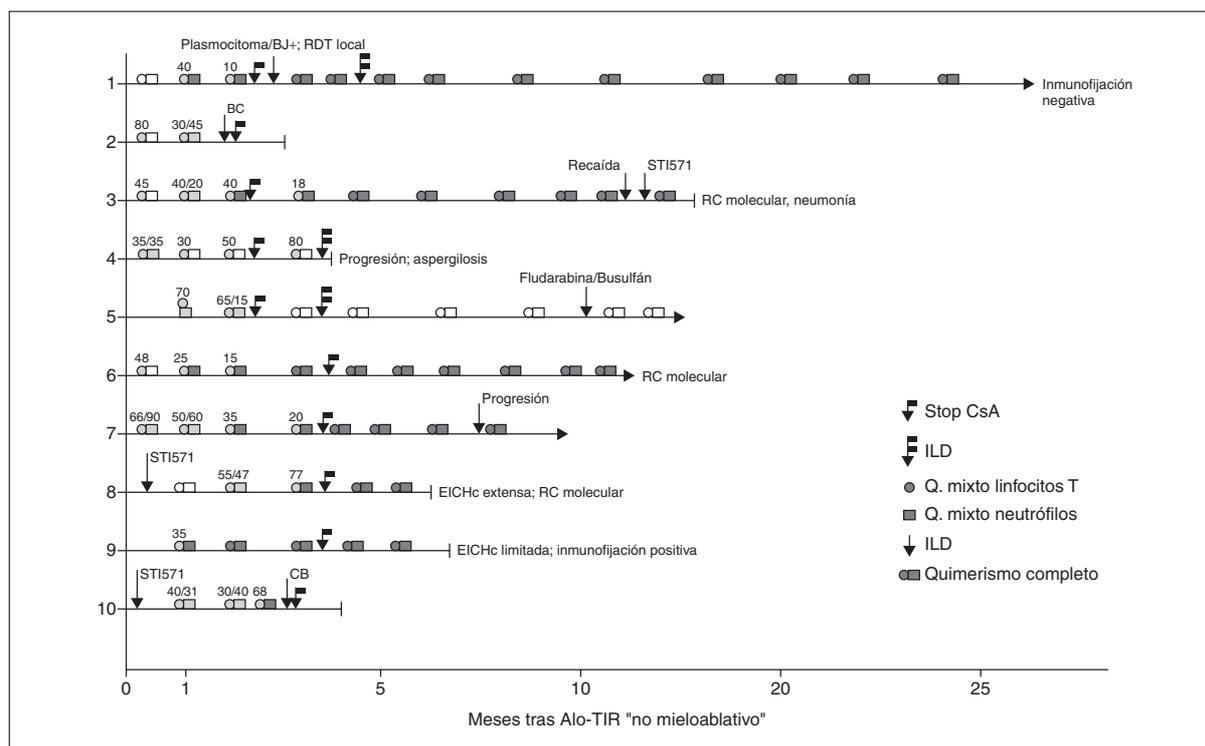


Figura 6. Análisis del quimerismo en linfocitos T y en neutrófilos tras alo-TIR “no-mieloablatoivo”.

sin consecuencias clínicas, la presencia de células mieloides del receptor tras el trasplante se acompañó de una recidiva leucémica en 5 de los 7 (71 %) pacientes con QMMi, todos ellos afectados de leucemia mieloide crónica. Roman et al<sup>18,19</sup> demostraron que la existencia de un QMMi con incremento progresivo del componente del receptor tiene un valor adicional como factor predictivo de la evolución clínica en los pacientes con el reordenamiento BCR-ABL positivo tras un alotrasplante. De forma similar, estudios recientes han demostrado que en pacientes que presentaban una recidiva tardía de leucemia aguda o de síndrome mielodisplásico tras un alotrasplante, las únicas células originarias del receptor eran las leucémicas<sup>8</sup>. Estos hallazgos permiten enfatizar la utilidad del análisis secuencial del estado del quimerismo hematopoyético en subpoblaciones celulares separadas que incluyan la línea celular leucémica, con la intención de detectar precozmente la recidiva y así poder interrumpir la administración de fármacos inmunodepresores o de ILD en pacientes con un porcentaje creciente de células receptor, especialmente en aquellos con enfermedades sensibles al efecto del injerto contra la leucemia (ICL).

**Quimerismo en el trasplante alogénico con acondicionamiento de intensidad reducida tipo “no-mieloablatoivo”**

El tipo de trasplante alogénico con acondicionamiento de intensidad reducida (alo-TIR) que hemos

empleado en nuestra institución es el denominado “no-mieloablatoivo”, en el que se emplea un régimen de acondicionamiento con la intensidad mínima necesaria para lograr un implante hematopoyético completo y un efecto ICL con el cual erradicar la hemopatía maligna<sup>20</sup>.

En nuestra institución se han incluido en este protocolo de microtrasplante a 10 pacientes adultos consecutivos, con enfermedades hematológicas malignas, que disponían de un hermano HLA idéntico<sup>21</sup>. En cinco de estos pacientes la enfermedad se encontraba en progresión en el momento del trasplante. Todos los pacientes recibieron fludarabina 30 mg/m<sup>2</sup> IV los días -4 a -2, seguida de irradiación corporal total 2 Gy el día 0. Como profilaxis de la EICH se administró CsA desde el día -1 y MMF PO desde el día 0. El MMF se interrumpía a los 60 días y la CsA a los 60-120 días si los pacientes no desarrollaban EICH aguda grado superior a I. La mediana (extremos) de células CD34+ infundidas fue de 5 × 10<sup>6</sup>/kg (2,3-8,7). Todos los pacientes fueron tratados en régimen ambulatorio y la mortalidad relacionada con el trasplante fue de 10%.

En cuanto a los estudios de quimerismo, en todos los pacientes se observó algún grado de implante del donante tras el trasplante (fig. 6). Un paciente afectado de mielofibrosis idiopática, tras un QMLT y en neutrófilos transitorio, presentó un rechazo del implante recuperando el 100 % de la hematopoyesis autóloga (fig. 7). El momento en el que se alcanzó

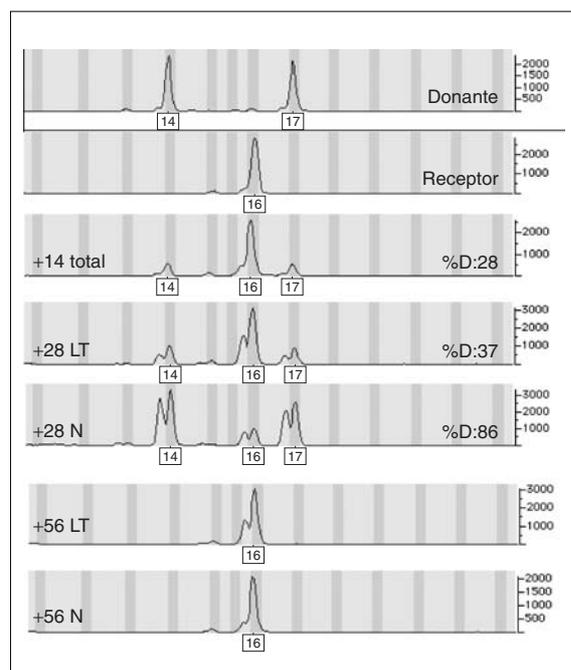


Figura 7. Reconstitución autóloga tras alo-TIR "no mieloablativo".

un QC fue diferente en el compartimiento linfóide T y en el mielóide, de tal manera que, tras un implante parcial precoz de linfocitos T, el QCMi precedió al QCLT (fig. 8). Así, la mediana de días para un QCMi fue de 42 (28-90), mientras que fue de 110 (56-150) en el compartimiento de linfocitos T ( $p = 0,002$ ) (tabla 1). Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios de alo-TIR "no mieloablativo"<sup>14,22</sup>, y contrastan con los observados en series de pacientes tratados con regímenes de acondicionamiento más intensivos, en los cuales el implante linfóide T completo precede al mielóide<sup>23</sup>. En este mismo sentido, el establecimiento de un QCLT precoz y mantenido tras un alo-TIR se ha considerado un factor fundamental para alcanzar una plena reacción ICL<sup>23,24</sup>.

En este estudio hemos observado una progresión o recidiva precoz de la enfermedad de base en el 80% de los pacientes, porcentaje que resulta muy

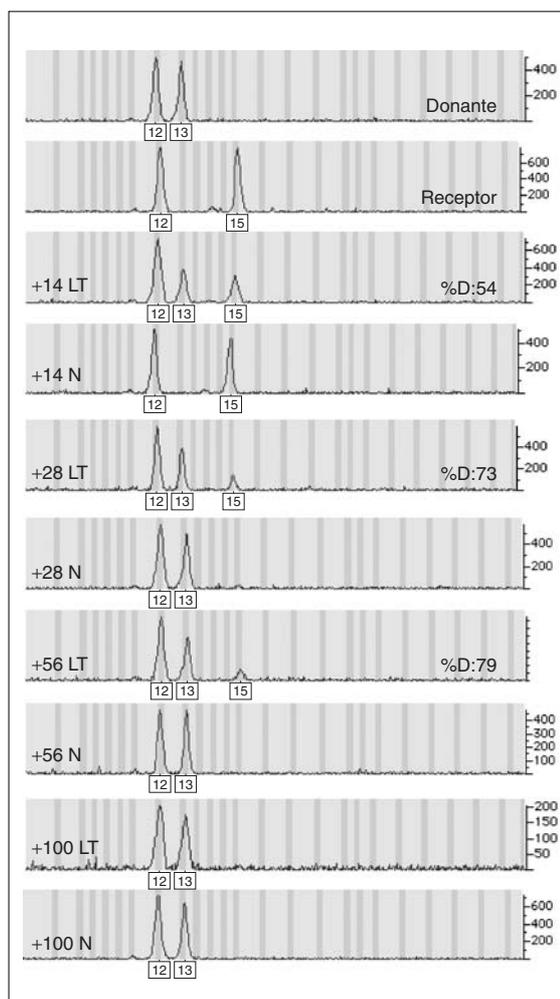


Figura 8. Cinética del implante tras alo-TIR "no mieloablativo".

elevado, teniendo en cuenta los resultados tras el alo-TPH convencional. Este hecho ha podido producirse como consecuencia, por un lado, de la administración de un régimen de acondicionamiento con escaso poder antitumoral y, por otro, del retraso en conseguir un QCLT tras el trasplante. Este hecho es especialmente importante, teniendo en cuenta que la mediana de días para la recidiva o la progresión fue de 68 días (15-335). Este es uno de

Tabla 1. Análisis del quimerismo en linfocitos T y en neutrófilos tras un alo-TIR "no-mieloablativo"

Líneas celulares	Día + 14 (% D) (n = 7)	Día + 28 (% D) (n = 10)	Día + 56 (% D) (n = 10)	Día + 90 (% D) (n = 9)	Días para QC (mediana)
Linfocitos T	53 (0-65)	60 (0-85)	65 (35-100)	81 (0-100)	110 (56-150) (n = 6)
Neutrófilos	0 (0-65)	80 (0-100)	100 (53-100)	100 (0-100)	42 (28-90) (n = 9)

% D: porcentaje de células del donante; QC: quimerismo completo.

los inconvenientes del alo-TIR “no mieloablato”, dado que la capacidad del alo-TPH convencional para erradicar la hemopatía maligna depende tanto del efecto ICL como de la intensidad del régimen de acondicionamiento. Nuestros resultados apoyan que la respuesta antitumoral en este tipo de trasplante ocurre exclusivamente en aquellos pacientes en los que se produce un implante hematopoyético del donante prolongado<sup>24</sup>. Así, sólo 1 de los 9 pacientes (11 %) analizados habían alcanzado un QCLT en el momento de la recidiva o progresión. Tras analizar los factores que podían influir para conseguir un implante linfocitario T completo tras el alo-TIR “no mieloablato”, el estado de la enfermedad hematológica en el momento del trasplante fue el más estrechamente asociado con alcanzar un QCLT. Así, los 5 pacientes (100 %) con enfermedad en remisión o estable antes del trasplante alcanzaron un QCLT, mientras que esto ocurrió únicamente en 1 de los 5 (20 %) que recibieron el trasplante con enfermedad en progresión ( $p = 0,05$ )<sup>21</sup>. Por tanto, en los pacientes con la enfermedad en progresión podría ser necesario aumentar la intensidad del régimen de acondicionamiento. Otra alternativa sería administrar quimioterapia sistémica o anticuerpos monoclonales conjugados tras el trasplante, con la finalidad de controlar la actividad de la enfermedad, evitando una progresión precoz, y así permitir el desarrollo del efecto ICL. En este sentido, dos pacientes afectados de leucemia mieloide crónica en fase acelerada recibieron tratamiento con imatinib desde los días 0 y +15 del trasplante, respectivamente. Con este tratamiento pretrasplante asociado al régimen de acondicionamiento se consiguió una reducción significativa de la cifra de leucocitos y permitió alcanzar un implante mieloide completo en ambos casos.

## Bibliografía

- Briones J, Urbano-Ispizúa A, Rozman C, Marín P, Carreras E, Rovira M, et al. Study of haemopoietic chimerism following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation using PCR-STR amplification of short tandem repeats. *Ann Hematol* 1996;72:265-8.
- Briones J, Urbano-Ispizúa A, Orfao A, Marín P, Sierra J, Rovira M, et al. Demonstration of donor origin of CD34+ HLA-DR- bone marrow cells after allogeneic peripheral blood transplantation with a long follow-up. *Bone Marrow Transplant* 1998;21:189-94.
- Briones J, Urbano-Ispizúa A, Lawler M, et al. High frequency of donor chimerism after allogeneic transplantation of CD34+ selected peripheral blood cells. *Exp Hematology* 1998;26:415-20.
- Thiede C, Florek M, Bornhäuser M, et al. Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. *Bone Marrow Transplantation* 1999; 23:1055-60.
- Thiede C, Bornhäuser M, Oelschlägel U, et al. Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic blood stem cell transplantation (BSCT) using multiplex amplification of short tandem repeat-markers. *Leukemia* 2001;15:293-302.
- Fernández-Avilés F, Urbano-Ispizúa A, Aymerich M, et al. Serial quantification of lymphoid and myeloid mixed chimerism using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers predicts graft rejection and relapse, respectively, after allogeneic transplantation of CD34+ selected cells from peripheral blood. *Leukemia* 2003;17:613-20.
- Socie G, Lawler M, Gluckman E, McCann SR, Brison O. Studies on hemopoietic chimerism following allogeneic bone marrow transplantation in the molecular biology era. *Leukemia Research* 1995;19: 497-504.
- Mattsson J, Uzunel M, Remberger M, et al. Poor immune reconstitution after four or five major HLA antigens mismatched T cell-depleted allogeneic and autologous stem cell transplantation. *Clinical Experimental Immunology* 2001;123:162-9.
- Dubovsky J, Daxberger H, Fritsch G, et al. Kinetics of chimerism during the early post-transplant period in pediatric patients with malignant hematologic disorders: implications for timely detection of engraftment, graft failure and rejection. *Leukemia* 1999;13:2060-9.
- Mackinnon S, Barnett L, Bourhis JH, Black P, Heller G, O'Reilly RJ. Myeloid and lymphoid chimerism after T-cell depleted bone marrow transplantation: evaluation of conditioning regimens using the polymerase chain reaction to amplify human minisatellite regions of genomic DNA. *Blood* 1992;80:3235-41.
- Roux E, Helg C, Dumont-Girard F, Chapuis B, Jeannot M, Roosnek E. Analysis of T-cell repopulation after allogeneic bone marrow transplantation: Significant differences between recipients of T-cell depleted and unmanipulated grafts. *Blood* 1996;87:3984-92.
- Schaap N, Schattenberg A, Mensink E, et al. Long-term follow-up of persisting mixed chimerism after partially T cell-depleted allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 2002;16:13-21.
- Van Leeuwen JE, Van Tol MJ, Joosten AM, et al. Persistence of host-type hematopoiesis after allogeneic bone marrow transplantation for leukemia is significantly related to the recipient's age and/or the conditioning regimen, but is not associated with an increased risk of relapse. *Blood* 1994;83:3059-67.
- Mattsson J, Uzunel M, Brune M, et al. Mixed chimerism is common at the time of acute graft-versus-host disease and disease response in patients receiving non-meloablative conditioning and allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2001;115:935-44.
- Mapara MY, Kim YM, Wang SP, Bronson R, Sachs DH, Sykes M. Donor lymphocyte infusions mediate superior graft-versus-leukemia effects in mixed compared to fully allogeneic chimeras: a critical role for host antigen-presenting cells. *Blood* 2002;100:1903-9.
- Roy DC, Tantravahi R, Murray C, Dear K, Gorgone B, Anderson KC, et al. Natural history of mixed chimerism after bone marrow transplantation with CD6-depleted allogeneic marrow: A stable equilibrium. *Blood* 1990;75:296-304.
- Mattsson J, Uzunel M, Remberger M, Ringden O. T cell mixed chimerism is significantly correlated to a decreased risk of acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Transplantation* 2001;71:433-9.
- Román J, Martín C, Torres A, et al. Importance of mixed chimerism to predict relapse in persistently BCR/ABL positive long survivors after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia. *Leukemia Lymphoma* 1998;28:541-50.
- Román J, Serrano J, Jiménez A, Castillejo JA, Reina ML, González MG, et al. Myeloid mixed chimerism is associated with relapse in bcr-abl positive patients after unmanipulated allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Haematologica* 2000; 85:173-80.
- McSweeney PA, Niederwieser D, Shizuru JA, Sandmaier BM, Molina AJ, Maloney DG, et al. Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects. *Blood* 2001;97:3390-400.
- Fernández-Avilés F, Urbano-Ispizúa A, Aymerich M, Rovira M, Martínez C, Talarn C, et al. Low-dose total-body irradiation and fludarabine followed by hematopoietic cell transplantation from HLA-identical sibling donors do not induce complete T-cell donor engraftment in most patients with progressive hematologic diseases. *Exp Hematol* 2003;31: 934-40.
- Niederwieser D, Maris M, Shizuru JA, Petersdorf E, Hegenbart U, Sandmaier BM, et al. Low-dose total body irradiation (TBI) and fludarabine followed by hematopoietic cell transplantation (HCT) from HLA-matched or mismatched unrelated donors and postgrafting immunosuppression with cyclosporine and mycophenolate mofetil (MMF) can induce durable complete chimerism and sustained remissions in patients with hematological diseases. *Blood* 2003;101:1620-9.
- Pérez-Simón JA, Caballero D, Díez-Campelo M, López-Pérez R, Mateos G, Cañizo C, et al. Chimerism and minimal residual disease monitoring after reduced intensity conditioning (RIC) allogeneic transplantation. *Leukemia* 2002;16:1423-31.
- Childs R, Clave E, Contentin N, Jayasekera D, Hensel N, Leitman S, et al. Engraftment kinetics after non-meloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: full donor T-cell chimerism precedes alloimmune responses. *Blood* 1999;94:3234-41.