

SIMPOSIOS

AVANCES EN LA BIOLOGÍA Y EL TRATAMIENTO DEL LINFOMA FOLICULAR

COORDINADOR: E. MONTSERRAT. *Departamento de Hematología, Instituto de Hematología y Oncología, Hospital Clínic, Universidad de Barcelona, Barcelona*

Resumen del simposio

Los linfomas foliculares constituyen, después de los linfomas difusos de células grandes, la variedad más frecuente de linfoma. Durante años, han sido pocos los progresos operados en el conocimiento de la biología, historia natural y pronóstico de este tipo de tumores. Asimismo, la esperanza de vida de los pacientes con este tipo de linfomas apenas se ha modificado. Aunque lentamente, parece innegable que “algo se mueve” en el campo de los linfomas foliculares y que, de forma paulatina, vamos adquiriendo más conocimientos sobre la biología de estos linfomas, su pronóstico y estrategias terapéuticas.

En este simposio, M.A. Piris (Madrid) revisa la moderna clasificación de estos linfomas, desde su vertiente puramente morfológica hasta los aspectos moleculares y genéticos, y la repercusión que ello puede tener en el manejo de los enfermos.

S. Montoto y A. López-Guillermo (Londres y Barcelona) hacen un análisis de los factores pronósticos en los linfomas foliculares, incluyendo el denominado *Follicular Lymphoma International Prognostic Index* (FLIPI), así como diversos marcadores biológicos. La disponibilidad de un índice pronóstico específico para los linfomas foliculares debiera de permitir adaptar el tratamiento al riesgo de cada paciente, y diseñar estudios basados en series de enfermos comparables con respecto a su pronóstico.

R. Marcus (Cambridge, Reino Unido) revisa el tratamiento de los pacientes con linfoma folicular, incluyendo estrategias clásicas como la de “esperar y ver” hasta la inmunoterapia y la altamente prometedora quimioinmunoterapia. Aquí, al igual de lo ya observado en los linfomas difusos de células grandes, es probable que la combinación de quimioterapia con anticuerpos monoclonales depare mejores resultados que la quimioterapia sola.

Finalmente, E. Conde (Santander) hace un análisis crítico del papel del trasplante de progenitores hematopoyéticos, en sus distintas modalidades, en el tratamiento del linfoma folicular; qué enfermos son candidatos plausibles para recibir trasplantes, las ventajas e inconvenientes de las distintas modalidades, toxicidad y futuras perspectivas.

LINFOMA FOLICULAR

M.A. PIRIS

Patología Molecular. CNIO. Madrid.

Diagnóstico

Tumor de patrón folicular, derivado de linfocitos del centro germinal, caracterizado por sobreexpresión de la proteína bcl2 secundaria a t14;18.

Rasgos clínicos

La edad media es superior a los 30 años, si bien hay formas infantiles. Frecuentemente se trata de una enfermedad diseminada al diagnóstico, con afectación ganglionar y de médula ósea y/o bazo. Es un tumor indolente, considerado como no curable, aunque cuando es diagnosticado en estadios iniciales, puede haber remisiones completas muy prolongadas. La probabilidad de supervivencia depende del estadio clínico y grado histológico. Un porcentaje que varía entre el 20 y el 60 % de los casos llegan a mostrar transformación a linfoma de células grandes, que suele estar asociada a inactivación de los genes *p53* y *p16*.

Morfología

Prácticamente todos los casos muestran de forma más o menos patente un patrón folicular, que puede afectar a tan sólo una fracción del ganglio biopsiado. Ocasionalmente, la demostración del patrón folicular puede requerir inmunotinción para células dendríticas.

La citología muestra siempre una mezcla de centrocitos y centroblastos, si bien en proporción variable. Además hay abundantes células dendríticas foliculares y linfocitos T entremezclados con el tumor.

Los linfomas foliculares se gradúan histológicamente de acuerdo a la proporción relativa de centroblastos, como:

- Grado 1: predominio de centrocitos
- Grado 2: con proporción de centroblastos (< 15/campo)
- Grado 3: predominio de centroblastos (> 15 por campo de alto aumento).

Estudios de correlación clínica muestran que el grado 3 se correlaciona con una conducta clínica más agresiva, si bien su reconocimiento tiene una baja reproducibilidad. Específicamente se ha encontrado que el tiempo libre de fallo es más corto en estos linfomas foliculares grado 3, aunque la supervivencia global no parece diferir significativamente. Es digno de mención el que regímenes terapéuticos conteniendo adriamicina borran esta diferencia en el curso clínico.

Los grado 3 se subdividen en 3A y 3B, de acuerdo al porcentaje de centroblastos.

Inmunofenotipo y genotipo

Los linfomas foliculares comparten el fenotipo del centro germinal normal, CD10+, Bcl6+, CD23-,

CD43-, CD5-, IgD-. El 85 % de los casos muestra alta expresión de bcl2, en contraste con la imagen usual de los centros germinales reactivos. Esta expresión de bcl2 se ha convertido en un útil rasgo diagnóstico, que permite identificar fases precoces de linfoma folicular. La inmunotinción para marcadores de células dendríticas revela la presencia de una malla densa de células dendríticas foliculares entremezcladas con las células tumorales. La mayoría de los casos de linfoma folicular tiene una translocación 14;18 que conduce a una sobreexpresión de bcl2. Un pequeño porcentaje tiene amplificación de bcl2. Es característico de estos tumores la presencia de abundantes mutaciones somáticas y, en curso, del gen *IgH*.

El análisis de perfiles de expresión en linfoma folicular ha revelado parcialmente la patogenia de esta enfermedad.

Variantes clínicas

1. Linfoma folicular cutáneo. Desde un punto de vista de presentación clínica y evolución se trata de un tumor similar a linfomas cutáneos de la zona marginal, si bien la morfología y fenotipo de los mismos muestra que estos tumores derivan de células del centro germinal. Es importante excluir la presencia de t14;18, ya que suele estar asociada con enfermedad diseminada.

2. Linfoma folicular extraganglionar. De forma similar a los linfomas foliculares cutáneos, existen linfomas foliculares, carentes de t14;18, en otros órganos, tal y como tiroides, duodeno, bazo.

3. Linfoma folicular testicular infantil. Variante de buen pronóstico, no asociada a t14;18.

4. Linfoma folicular infantil. Usualmente diagnosticado en estadios iniciales, con respuesta favorable a tratamiento.

Variantes morfológicas

1. La presencia de células monocitoides no es rara en estos tumores, y no justifica por sí misma un diagnóstico de linfoma B de la zona marginal. También puede verse diferenciación plasmocitoide y células en anillo de sello.

2. Casos con un patrón difuso son excepcionales, y probablemente representan otro tipo de linfoma, a menos que muestren un fenotipo y genotipo característico, con expresión de bcl6, CD10 y bcl2.

Factores pronósticos

Estudios de Tissue Micro-Arrays y arrays de cDNA han identificado una serie de marcadores predictivos de supervivencia en estos tumores.

Bibliografía

Franco R, Fernández-Vázquez A, Rodríguez-Peralto JL, Bellas C, López-Ríos F, Sáez A, et al. Cutaneous follicular B-cell lymphoma: description of a series of 18 cases. *Am J Surg Pathol* 2001;25:875-83.

- Frizzera G, Murphy SB. Follicular (nodular) lymphoma in childhood: a rare clinical-pathological entity. Report of eight cases from four cancer centers. *Cancer* 1979;44:2218-35.
- Heller KN, Teruya-Feldstein J, La Quaglia MP, Wexler LH. Primary follicular lymphoma of the testis: excellent outcome following surgical resection without adjuvant chemotherapy. *J Pediatr Hematol Oncol* 2004;26:104-7.
- Pan Z, Shen Y, Du C, Zhou G, Rosenwald A, Staudt LM, et al. Two newly characterized germinal center B-cell-associated genes, GCET1 and GCET2, have differential expression in normal and neoplastic B cells. *Am J Pathol* 2003;163:135-44.
- Sánchez-Beato M, Sánchez-Aguilera A, Piris MA. Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. *Blood* 2003;101:1220-35.
- Sokal-Celigny P, Roy P, Colombat P, White J, Armitage JO, Arranz-Sáez R, et al. Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood* 2004.
- Wright DH, Isaacson P. Follicular center cell lymphoma of childhood: a report of three cases and a discussion of its relationship to Burkitt's lymphoma. *Cancer* 1981;47:915-25.

HISTORIA NATURAL Y PRONÓSTICO DEL LINFOMA FOLICULAR

S. MONTOTO¹ Y A. LÓPEZ-GUILLERMO²

¹Medical Oncology Department. St. Bartholomew's Hospital. Londres. UK. ²Servicio de Hematología. Hospital Clínic. Barcelona.

Introducción

El linfoma folicular (LF) constituye el segundo subtipo más frecuente de linfoma no hodgkiniano en nuestro medio, tras el linfoma difuso de células grandes (LDCG). Pese a que se considera un linfoma indolente por la supervivencia relativamente prolongada de sus pacientes, sigue siendo una enfermedad incurable cuando se diagnostica en estadio avanzado, esto es, en la mayoría de los casos. En los últimos 20 años se han llevado a cabo múltiples intentos para modificar la historia natural de los pacientes con LF sin que, por el momento, se haya observado una mejoría sustancial en el pronóstico de estos pacientes.

Historia natural

Los LF de grado I o II, que constituyen el 70-90 % de todos ellos, se consideran linfomas indolentes. Por el contrario, el LF de grado III tiene un comportamiento clínicamente más agresivo, semejando el de los linfomas de células grandes, por lo que habitualmente se incluye entre los linfomas agresivos. La mayoría de LF tiene, por tanto, unas características clínicas y una historia natural indolente. Desde el punto de vista clínico, el LF se caracteriza por aparecer en individuos de edad media o avanzada^{1,2}, con una distribución según el sexo bastante equilibrada. Es característica la existencia de enfermedad avanzada al diagnóstico, habitualmente por infiltración medular, hecho que se llega a observar hasta en un 80 % de los casos^{2,3}. Pese al estadio avanzado, los pacientes conservan el estado general. Del mismo modo, sólo se observa sintomatología B en un pequeño porcentaje de ellos³. En la mayoría de casos, los pacientes

consultan por la presencia de adenopatías periféricas sin otra sintomatología acompañante. Las adenopatías pueden ser fluctuantes, apareciendo y desapareciendo durante años antes del diagnóstico. Es característica de la historia natural de los linfomas indolentes la existencia de remisiones espontáneas. Efectivamente, en aproximadamente un tercio de pacientes no tratados al diagnóstico se puede observar una remisión espontánea que, aunque transitoria, en ocasiones puede ser de una duración considerable (mediana superior al año)¹.

La historia natural de los pacientes con LF se caracteriza por presentar un curso clínico indolente con una alta tasa de respuestas globales con cualquiera de los tratamientos y una supervivencia relativamente prolongada. En efecto, un elevado porcentaje de pacientes, hasta el 80-90 %, alcanza una respuesta con el tratamiento de primera línea; es más, con la introducción de nuevos agentes tales como los análogos de las purinas o los anticuerpos monoclonales esta respuesta es completa (RC) en el 80 % de pacientes. Así mismo, se ha descrito la existencia de RC moleculares en un alto porcentaje de pacientes tratados con estos fármacos, aunque el significado clínico de este hecho no está completamente aclarado. La mediana de supervivencia (SG) en la mayoría de las series se sitúa alrededor de los 10 años¹. Sin embargo, pese a la respuesta inicial y a la larga supervivencia, la mayoría de pacientes, especialmente aquellos diagnosticados en estadio avanzado, acaban cayendo. Tras la progresión, un elevado porcentaje de pacientes aún responde al tratamiento de rescate⁴. Sin embargo, la duración de la respuesta y la supervivencia desde la progresión se van acortando tras las sucesivas recaídas⁴, de manera que la mayoría de los pacientes acaba falleciendo por causas relacionadas con el linfoma tras experimentar varias recaídas.

Otro aspecto característico de la evolución de los linfomas indolentes es la transformación a un linfoma de grado alto, habitualmente a un LDCG. La progresión histológica se produce en un porcentaje variable de pacientes con LF, que alcanza el 70 % en estudios necroscópicos⁵. La progresión histológica implica un mal pronóstico y en muchas ocasiones representa el suceso final en la historia natural de los pacientes con LF (la SG tras la transformación no suele superar el año⁶).

Factores pronósticos

Son innumerables los estudios publicados analizando los factores pronósticos que influyen en el porvenir de los pacientes con LF. Algunos de estos factores tienen relación con particularidades del paciente, mientras que otros están relacionados con las características del tumor, ya sean histológicas o moleculares. Por otra parte, existen una serie de variables con valor pronóstico que tienen que ver con la respuesta del tumor al tratamiento. Ante la proliferación de múltiples factores pronósticos se han lle-

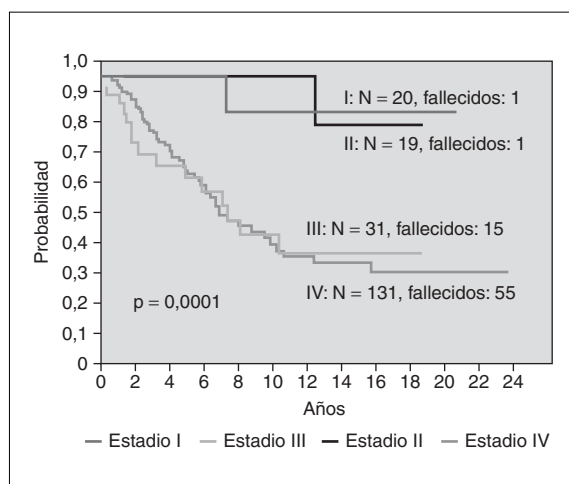


Figura 1. Supervivencia global según el estadio en 201 pacientes diagnosticados de linfoma folicular en el Hospital Clínic entre 1976 y 1998.

vado a cabo diversos intentos de diseñar un índice pronóstico equivalente al *International Prognostic Index* (IPI) para linfomas agresivos, con un éxito limitado hasta el momento.

Variables clínicas

Un primer grupo de factores con valor predictivo en los pacientes con LF está constituido por variables que dependen de características del paciente. Así, la edad aparece como uno de los factores que influye más notablemente en el pronóstico en la mayoría de las series^{3,7,8}. Por el contrario, el sexo masculino se asocia a una supervivencia acortada en algunas series^{3,7,9}, pero no en otras^{8,10}. Otra variable que influye en el pronóstico de estos pacientes es su estado general o *performance status*, de manera que los pacientes con mal estado general al diagnóstico, ya sea atribuible al linfoma o a otras enfermedades concomitantes, presentan un peor pronóstico que el resto^{7,8}. Así mismo, el pequeño porcentaje de pacientes que presentan síntomas B tienen un pronóstico peor que los pacientes asintomáticos^{3,8,10}. El estadio, evaluado según la clasificación de *Ann Arbor*, es la principal variable que cuantifica la extensión de la enfermedad y uno de los factores con mayor importancia pronóstica en los pacientes con LF, cuando en el análisis se incluyen pacientes diagnosticados tanto en estadio localizado (I o II) como en estadio avanzado (III o IV)^{7,8}. De hecho, la clasificación de los pacientes según se diagnostiquen en estadio I-II o III-IV discrimina 2 grupos con un curso clínico y unas posibilidades de curación absolutamente diferentes, lo que determina una actitud terapéutica que difiere sustancialmente en uno y otro grupo de individuos (fig. 1). Otras variables reflejan la extensión tumoral y se acompañan de valor predictivo en algunos estudios. La infiltración de la médula ósea está íntimamente li-

gada con el estadio por lo que habitualmente pierde su valor significativo en los análisis multivariados, sin embargo el grado de infiltración medular aparece como un importante factor pronóstico en el estudio de Romaguera et al⁹, que incluye únicamente pacientes en estadio IV. Por el contrario, la leucemización no ha mostrado valor predictivo en las escasas series en que se ha analizado⁹. Otros parámetros indicativos de la masa tumoral del LF tales como el número de áreas ganglionares o extraganglionares se han relacionado con el pronóstico de la enfermedad^{3,9}. Así mismo, la existencia de grandes adenopatías conlleva una evolución adversa en algunas series⁹, si bien la heterogeneidad en la definición de masa voluminosa en diferentes estudios, que oscila entre 5 y 10 cm, dificulta las comparaciones entre ellos. En este sentido el grupo GELF (*Group d'Etude des Lymphomes Folliculaires*) ha definido unos criterios de alta carga tumoral. La presencia de cualquiera de las siguientes circunstancias: síntomas B, signos o síntomas de compresión, una masa voluminosa de más de 7 cm, la existencia de un derrame seroso, 3 o más áreas ganglionares de más de 3 cm, esplenomegalia, y la presencia de células linfomatosas en sangre periférica, es considerado un indicador de carga tumoral elevada. Por otra parte, existen una serie de datos de laboratorio que también reflejan la extensión tumoral: así la disminución de la hemoglobina, secundaria a infiltración medular, se asocia a una supervivencia acortada en varios estudios^{7,10}; el nivel sérico de LDH constituye una medida indirecta de la masa tumoral de importante valor pronóstico³; por último la $\beta 2M$, un marcador de masa y proliferación celular, también ha mostrado importancia como factor predictivo para la supervivencia en pacientes con LF¹¹.

De forma análoga a lo sucedido con el IPI para linfomas agresivos, convertido en el principal factor pronóstico en estos linfomas, se ha intentado diseñar un índice pronóstico para los pacientes con LF. Así pues, se han publicado varias propuestas de índice pronóstico^{3,7-9}, en las que destacan unas pocas variables comunes a varios de los índices (tabla 1), sin que ninguna de estas propuestas haya sido ampliamente aceptada. Romaguera et al⁹ describieron en 1991 un índice para pacientes con LF en estadio IV que incluye el número de áreas extraganglionares afectadas, el tamaño ganglionar y el grado de infiltración medular. Estas variables permiten clasificar a los pacientes en 3 grupos de riesgo según la carga tumoral sea baja, intermedia o alta, que presentan una supervivencia "relacionada con el linfoma" (*cause-specific survival*) a los 10 años del 73, 40 y 24%, respectivamente. Pese a que mediante este índice se distinguen claramente 3 grupos de pacientes con un pronóstico muy diferente, la relativa complejidad en el cálculo del índice dificulta su aplicación⁹. Los índices propuestos por Leonard et al⁷ y Cameron et al⁸ para linfomas indolentes y LF⁷, respectivamente, se hallan con el mismo inconveniente pues-

Tabla 1. Variables incluidas en diferentes índices pronósticos aplicados al LF

	Leonard ^a (1991)	Romaguera (1991)	Cameron (1993)	IPI ^b (1994)	Federico (2000)	FLIPI (2004)
Edad	X		X	X	X	X
ECOG	X		X	X		
Estadio	X		X	X		X
Sexo ♂	X				X	
Hb	X					X
N.º áreas extraganglionares		X		X	X	
Tamaño ganglionar		X				
Infiltración de médula ósea		X				
Síntomas B					X	
Infiltración TGI			X			
LDH elevada				X	X	X
VSG elevada					X	
Número áreas ganglionares						X

^a Para linfomas indolentes; ^b para linfomas agresivos.

LF: linfoma folicular; IPI: International Prognostic Index; FLIPI: Follicular Lymphoma International Prognostic Index; ECOG: ?????; ♂: varón; TGI: tracto gastrointestinal; LDH: lactato deshidrogenasa; VSG: velocidad de sedimentación globular.

to que no se pueden deducir de forma inmediata sino que se han de calcular mediante fórmulas matemáticas. Más recientemente, el ILI (*Italian Lymphoma Intergroup*) ha publicado un modelo predictivo basado en el análisis de los factores pronósticos en 987 pacientes con LF³. Las seis variables incluidas en este modelo permiten clasificar a los pacientes en un grupo de bajo riesgo (0-1 factores adversos), de riesgo intermedio² o alto (> 3 factores), que presentan una SG a los 10 años del 65, 54 y 11 %, respectivamente. Los grupos de bajo, intermedio y alto riesgo engloban el 64, 23 y 13 % de los pacientes, respectivamente. Precisamente el hecho de que pocos pacientes con LF queden incluidos en los grupos de alto riesgo es el principal inconveniente que presenta el *International Index for Aggressive Lymphomas* (IPI). Este índice fue diseñado para pacientes con linfomas agresivos pero se ha demostrado su aplicabilidad en pacientes con linfomas indolentes en varios estudios¹², aunque su principal inconveniente en estos pacientes es que pocos de ellos quedan incluidos en los grupos de alto riesgo. La comparación entre el ILI y el IPI muestra que alrededor del 70 % de los pacientes se incluye en el mismo grupo de riesgo con ambos índices si se considera el número de factores adversos (0-1, 2 o ≥ 3)³ y que esta concordancia es mayor en el grupo de bajo riesgo. Por otra parte, al incluir en la comparación pacientes con LF de grado III, se demuestra que el ILI es mejor para discriminar pacientes con LF de grado I o II, mientras que el pronóstico de los pacientes con LF de grado III queda mejor definido según el IPI.

Recientemente se ha diseñado un nuevo índice dirigido específicamente a pacientes con LF¹³. Las variables incluidas en el *Follicular Lymphoma International Prognostic Index* (FLIPI) permiten clasificar a los pacientes en 3 grupos de pronóstico bueno, intermedio o malo, bien equilibrados en cuanto al porcentaje de

pacientes incluido en cada uno (36, 37 y 27 %, respectivamente) y con un pronóstico claramente diferenciado (SG a los 10 años del 71, 51 y 35 %, respectivamente) (tabla 2).

Contrariamente a lo que sucede con los factores pronósticos iniciales, son escasas las series que analizan las variables predictivas en la recaída o progresión. En estos estudios se incluyen variables evolutivas no disponibles en el momento del diagnóstico tales como el número de líneas de tratamiento previas, el tipo de respuesta alcanzado, la duración de la misma y, en algunos casos, el tratamiento administrado con anterioridad. La cantidad de quimioterapia recibida es un importante factor pronóstico. Así pues, el haber precisado más de una línea de tratamiento para alcanzar una primera respuesta se acompaña de una supervivencia desde la progresión acortada en la serie de Johnson et al⁴. De forma parecida, el número de fracasos, indicativo del número de líneas de tratamiento administradas, se muestra como un importante factor pronóstico en

Tabla 2. Índice pronóstico internacional para linfomas foliculares

Variables desfavorables		
Edad > 60 años		
Estadio de Ann Arbor avanzado (III-IV)		
Afección ganglionar > 4 territorios		
Hemoglobina < 12 g/dl		
LDH sérica aumentada		
N.º variables desfavorables	Grupo de riesgo	Supervivencia a 10 años
0 o 1	Bajo	71 %
2	Intermedio	51 %
≥ 3	Alto	36 %

LDH: lactato deshidrogenasa.

la recaída¹⁴. La respuesta al tratamiento inicial aparece como un importante factor predictivo en diferentes estudios, de manera que los pacientes que obtienen una buena respuesta presentan una supervivencia más prolongada que el resto¹⁰. Por otra parte, los pacientes que alcanzan una RC tienen una menor probabilidad de recaída que los que alcanzan una RP en la serie de Johnson et al⁴, aunque, una vez se ha producido la progresión, la RC previa no implica una supervivencia prolongada¹⁴. Finalmente, la duración de la respuesta aparece en varias series¹⁵ como uno de los factores fundamentales para predecir la supervivencia tras la progresión, aunque este dato no se confirma en otras⁴.

Factores biológicos

Diversas características referentes a la histología del tumor se han asociado a un pronóstico adverso en los pacientes con LF. El subtipo histológico, definido por el porcentaje de centroblastos, es la principal de ellas. El LF se muestra como una enfermedad con un espectro continuo de presentaciones desde el punto de vista citológico, desde un extremo en el que prácticamente sólo hay células pequeñas hasta el extremo contrario con una infiltración prácticamente absoluta por células grandes. El porcentaje de centroblastos influye en el pronóstico de los pacientes con LF, de manera que el comportamiento clínico del linfoma se asemeja más al de los linfomas agresivos de células grandes al aumentar la proporción de este tipo de células. Ello hace que se hayan descrito diferentes métodos para clasificar los LF en varios subtipos según el porcentaje de células grandes, lo que en ocasiones ha dificultado el estudio del valor pronóstico del subtipo histológico por la heterogeneidad en las definiciones utilizadas. En la última clasificación de la OMS se recomienda mantener 3 subtipos de LF utilizando los criterios de Mann-Berard, aunque se reconoce que es posible agrupar los pacientes con LF de grado I y II en un único grupo con un pronóstico diferente de los pacientes con LF de grado III. Así, se observan diferencias tanto en la SG como en la supervivencia libre de progresión (SLP) entre los pacientes con LF de grado I o II y

aquellos con LF de grado III¹⁶. Estas diferencias, además, se mantienen aún empleando varios de los métodos descritos para subclasificar los LF. Por el contrario no se detectan diferencias significativas en el pronóstico de los pacientes con LF de grado I o II⁹. Otra de las características histológicas de los LF a la que se ha asociado un valor pronóstico es la presencia de áreas difusas, con una supervivencia más prolongada entre los pacientes con LF y un patrón puramente nodular que entre los pacientes con una arquitectura nodular-difusa. No obstante, estos datos no se han confirmado en posteriores estudios.

La translocación t(14;18) es el marcador citogenético característico del LF presente en el 70-85% de los pacientes. El valor pronóstico de esta translocación y, especialmente, del reordenamiento BCL-2/JH resultante es controvertido, puesto que su detección varía ampliamente según la técnica utilizada. La existencia de la translocación t(14;18) detectada por citogenética convencional no se asocia a una evolución diferente de la observada en pacientes sin t(14;18)¹⁷. Por el contrario, se han descrito otras anomalías citogenéticas que implican un pronóstico peyorativo en los paciente con LF, tales como duplicaciones del cromosoma 2 (dup 2p), deleciones del 13 (del 13q), presencia de regiones de tinción homogénea o double minutes, alteraciones del cromosoma 17, alteraciones en 6q –estas dos últimas asociadas a progresión histológica– o la presencia de más de 20% de metafases normales¹⁷. Los resultados referentes al valor pronóstico del reordenamiento BCL-2/JH cuando se analiza mediante técnicas diferentes de la citogenética son sumamente variables. La detección del reordenamiento de BCL-2 por Southern blot (SB) o PCR se acompaña de una mayor tasa de RC¹⁸, mayor SLP¹⁸ y mayor SG¹⁹ en algunas series, mientras que Yunis et al²⁰ hallan una ventaja pronóstica en cuanto a la tasa de RC y a la SG en los pacientes en que no se detecta el reordenamiento. Por último, dicho reordenamiento no se acompaña de valor pronóstico para la RC, SLP o SG en diversas series^{19,21,22} (tabla 3). La heterogeneidad de estos resultados es debida, entre otros factores como aspectos técnicos, a la variabilidad de pa-

Tabla 3. Valor pronóstico del reordenamiento BCL-2/JH

Serie	N	Técnica	Reordenamiento (%)	RC	SLP	SG
Yunis, 1989 ²⁰	20	SB (MBR, mcr, 5')	65	↑ en BCL-2-	NA	↑ en BCL-2-
Pezella, 1992 ²¹	70	SB (MBR, mcr, 5')/ PCR (MBR, mcr)	69	NA	NA	=
Johnson, 1995 ¹⁹	102	PCR (MBR, mcr)/ CG	41	=	=	↑ en BCL-2 +
Bertoni, 1997 ²²	59	PCR (MBR)	59	NA	=	=
López-Guillermo, 1999 ¹⁸	247	PCR (MBR, mcr)	82	↑ en BCL-2 +	↑ en BCL-2 +	NA

RC: respuesta completa; SLP: supervivencia libre de progresión, SG: mediana de supervivencia; SB: southern blot; MBR: ???; NA: no analizado; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; CG: citogenética.

cientes incluidos, ya que mientras que en algunas series se incluyen básicamente pacientes con LF de bajo grado en otras hay un elevado porcentaje de LF de alto grado. Al analizar por separado estos dos grupos se demuestra que el valor pronóstico del reordenamiento de BCL-2 se produce a expensas de un alargamiento de la SG en los pacientes con LF de grado bajo y reordenamiento del oncogén, mientras que en los pacientes con LF de alto grado la existencia del reordenamiento no presenta valor pronóstico¹⁹. Menos estudiado ha sido el posible efecto del punto de rotura en el cromosoma 18 sobre el pronóstico de los pacientes con LF. López-Guillermo et al¹⁸ demostraron que los pacientes con el punto de rotura en *mcr* presentan unas características clínicas menos agresivas que los pacientes MBR+ o que aquellos sin reordenamiento que se traduce en una mayor tasa de RC y en una SLP más prolongada en los pacientes *mcr*+ que en el resto.

La sencillez del estudio inmunohistoquímico para detectar la consecuencia del reordenamiento BCL-2/JH, esto es, la sobreexpresión de BCL-2, ha llevado al análisis del valor pronóstico de la expresión proteica como sustituto del estudio del reordenamiento. Sin embargo, no existe una correlación directa entre reordenamiento y expresión de BCL-2. En realidad, los pacientes en que no se encuentra t(14;18) con frecuencia también sobreexpresan BCL-2. A diferencia de lo que ocurre con el LDCG en que la sobreexpresión de BCL-2 implica un mal pronóstico, en los pacientes con LF no se observan diferencias estadísticamente significativas en la SG según la expresión de BCL-2²¹. Cabe destacar que en los pacientes con LDCG la sobreexpresión de BCL-2 se asocia a características clínicas típicas de los pacientes con linfoma indolente, como una elevada proporción de pacientes en estadio avanzado o una mayor frecuencia de infiltración medular, y que el mal pronóstico viene dado básicamente por una mayor tendencia a recaer. Por otra parte, en el subgrupo de pacientes con LF de grado III la sobreexpresión de BCL-2 se acompaña de un pronóstico adverso en cuanto a la SLP.

La persistencia de enfermedad residual no detectable clínicamente mediante estudios rutinarios se considera responsable de las recaídas en pacientes con LF en respuesta clínica tras el tratamiento, de lo que se deriva la importancia del estudio de la enfermedad mínima residual (EMR) como factor predictivo de recaída. La demostración de que la persistencia de EMR se asocia a un mayor riesgo de recaída permitiría, por una parte, identificar pacientes de alto riesgo que pudieran ser candidatos a recibir tratamientos de intensificación de la respuesta y, por otra parte, podría servir para valorar la eficacia de nuevas modalidades terapéuticas, como equivalente de la recaída sin tener que esperar a la misma. La sensibilidad de la PCR, capaz de detectar una célula con el reordenamiento BCL-2/IgH entre 1×10^5 - 10^6

células sin el mismo, se ha mostrado como una herramienta fundamental para el estudio de la EMR en LF. Sin embargo, el papel pronóstico de la persistencia de EMR como predictor de recaída no está completamente aclarado, ya que los resultados publicados son, con frecuencia, contradictorios. Una de las principales causas de estas discrepancias es la variabilidad en la sensibilidad de las diferentes técnicas de PCR empleadas, como se demuestra en el estudio de Johnson et al²³ en el que 20 laboratorios internacionales analizan la misma muestra con diferentes concentraciones de células portadoras del reordenamiento BCL-2/IgH, obteniéndose resultados que varían considerablemente. Por otra parte, la existencia de individuos sanos portadores del reordenamiento BCL-2/JH²⁴ constituye otro inconveniente para la aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como técnica de estudio de la EMR y obliga a descartar la existencia de una clona no maligna adicional portadora de la translocación. Además de las dificultades relacionadas con aspectos técnicos, la interpretación del valor de la persistencia de EMR ofrece problemas añadidos. La demostración de que los pacientes que alcanzan una respuesta molecular tras el tratamiento presentan una menor tendencia a la recaída¹⁸, se ve contrarrestada por la evidencia de la existencia de pacientes con una RC prolongada pese a la persistencia del reordenamiento BCL-2/JH²⁵. Así mismo es posible detectar el reordenamiento en sangre periférica en un porcentaje considerable de pacientes diagnosticados en estadio I o II y que se mantienen en respuesta tras el tratamiento. Por otra parte, no existe una correlación absoluta entre la respuesta clínica y la molecular, de manera que no es inusual la ausencia de reordenamiento en pacientes con enfermedad clínicamente detectable¹⁸.

Conclusiones

Pese al avance alcanzado en los últimos años en el conocimiento de la biología del LF ello no se ha traducido en una prolongación de la supervivencia de los pacientes con LF, sino que, en la mayoría de los casos, ésta continúa siendo una enfermedad incurable. Los resultados obtenidos con el trasplante de progenitores hematopoyéticos son prometedores, sin embargo su potencial toxicidad a largo plazo limita su empleo en una enfermedad, por otra parte, indolente. Se han publicado numerosos estudios con el objetivo de analizar los factores clínicos o biológicos que se acompañan de un pronóstico adverso y que permiten identificar los pacientes que merecen el riesgo de ser sometidos a un procedimiento agresivo. Por lo que hace referencia a los estudios moleculares, si bien el alcanzar una respuesta molecular parece un objetivo deseable, la presencia del reordenamiento BCL-2/JH tras el tratamiento no permite, en el momento actual, la toma de decisiones terapéuticas, puesto que no se ha demostrado que se

asocie invariablemente a la recaída clínica. Es de esperar que la profundización en el conocimiento actual de la biología de esta enfermedad y la estandarización en las técnicas empleadas permitan en el futuro el empleo del estudio de la EMR como herramienta pronóstica en el tratamiento de los pacientes con LF. En cuanto al estudio de las variables clínicas, la reciente publicación de un índice pronóstico específicamente diseñado para pacientes con LF (FLIPI) es de gran interés, aunque, dada su aún corta historia, ha de demostrar su fácil aplicabilidad y su valor para detectar pacientes con LF con un pronóstico especialmente desfavorable que los haga merecedores de ser sometidos a procedimientos intensivos potencialmente tóxicos.

Bibliografía

- Horning SJ, Rosenberg SA. The natural history of initially untreated low-grade non-Hodgkin's lymphomas. *N Engl J Med* 1984;311:1471-5.
- Armitage JO, Weisenburger DD. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J Clin Oncol* 1998;16:2780-95.
- Federico M, Vitolo U, Zinzani PL, Chisesi T, Clo V, Bellesi G, et al. Prognosis of follicular lymphoma: a predictive model based on a retrospective analysis of 987 cases. Intergruppo Italiano Linfomi. *Blood* 2000;95:783-9.
- Johnson PW, Rohatiner AZ, Whelan JS, Price CG, Love S, Lim J, et al. Patterns of survival in patients with recurrent follicular lymphoma: a 20-year study from a single center. *J Clin Oncol* 1995;13:140-7.
- Garvin AJ, Simon RM, Osborne CK, Merrill J, Young RC, Berard CW. An autopsy study of histologic progression in non-Hodgkin's lymphomas. 192 cases from the National Cancer Institute. *Cancer* 1983;52:393-8.
- Bastion Y, Sebban C, Berger F, Felman P, Salles G, Dumontet C, et al. Incidence, predictive factors, and outcome of lymphoma transformation in follicular lymphoma patients. *J Clin Oncol* 1997;15:1587-94.
- Leonard RC, Hayward RL, Prescott RJ, Wang JX. The identification of discrete prognostic groups in low grade non-Hodgkin's lymphoma. The Scotland and Newcastle Lymphoma Group Therapy Working Party. *Ann Oncol* 1991;2:655-62.
- Cameron DA, Leonard RC, Mao JH, Prescott RJ. Identification of prognostic groups in follicular lymphoma. The Scotland and Newcastle Lymphoma Group Therapy Working Party. *Leuk Lymphoma* 1993;10:89-99.
- Romaguera JE, McLaughlin P, North L, Dixon D, Silvermintz KB, Garneisey LA, et al. Multivariate analysis of prognostic factors in stage IV follicular low-grade lymphoma: A risk model. *J Clin Oncol* 1991;9:762-9.
- Gallagher CJ, Gregory WM, Jones AE, Stansfeld AG, Richards MA, Dhaliwal HS, et al. Follicular lymphoma: prognostic factors for response and survival. *J Clin Oncol* 1986;4:1470-80.
- Litam P, Swan F, Cabanillas F, Tucker SL, McLaughlin P, Hagemester FB, et al. Prognostic value of serum beta-2 microglobulin in low-grade lymphoma. *Ann Intern Med* 1991;114:855-60.
- López-Guillermo A, Montserrat E, Bosch F, Terol MJ, Campo E, Rozman C. Applicability of the International Index for aggressive lymphomas to patients with low-grade lymphoma. *J Clin Oncol* 1994;12: 1343-8.
- Sokal-Céligny Ph, Roy P. Follicular lymphoma international prognostic project (FLIPP). *Blood* 2004; in press.
- Spinolo JA, Cabanillas F, Dixon DO, Khorana SM, McLaughlin P, Velasquez WS, et al. Therapy of relapsed or refractory low-grade follicular lymphomas: factors associated with complete remission, survival and time to treatment failure. *Ann Oncol* 1992;3:227-32.
- Montoto S, López-Guillermo A, Ferrer A, Camos M, Álvarez-Larran A, Bosch F, et al. Survival after progression in patients with follicular lymphoma: analysis of prognostic factors. *Ann Oncol* 2002;13:523-30.
- Martin AR, Weisenburger DD, Chan WC, Ruby EI, Anderson JR, Vose JM, et al. Prognostic value of cellular proliferation and histologic grade in follicular lymphoma. *Blood* 1995;85:3671-8.
- Levine EG, Arthur DC, Frizzera G, Peterson BA, Hurd DD, Bloomfield CD. Cytogenetic abnormalities predict clinical outcome in non-Hodgkin lymphoma. *Ann Intern Med* 1988;108:14-20.
- López-Guillermo A, Cabanillas F, McDonnell TI, McLaughlin P, Smith T, Pugh W, et al. Correlation of bcl-2 rearrangement with clinical characteristics and outcome in indolent follicular lymphoma. *Blood* 1999;93:3081-7.
- Johnson A, Brun A, Dictor M, Rambech E, Akerman M, Anderson H. Incidence and prognostic significance of t(14;18) translocation in follicle center cell lymphoma of low and high grade. A report from southern Sweden. *Ann Oncol* 1995;6:789-94.
- Yunis JJ, Mayer MG, Arnesen MA, Aeppli DP, Oken MM, Frizzera G. bcl-2 and other genomic alterations in the prognosis of large-cell lymphoma. *N Engl J Med* 1989;320:1047-54.
- Pezzella F, Jones M, Ralfkiaer E, Ersboll J, Gatter KC, Mason DY. Evaluation of bcl-2 protein expression and 14;18 translocation as prognostic markers in follicular lymphoma. *Br J Cancer* 1992;65:87-9.
- Bertoni F, Bosshard G, Roggero E, Ceresa E, Cavalli F, Zucca E. Clinical relevance of bcl-2(MBR)/J(H) rearrangement detected by polymerase chain reaction in the peripheral blood of patients with follicular lymphoma. *Br J Cancer* 1997;76:36-9.
- Johnson PW, Swinbank K, MacLennan S, Colomer D, Debuire B, Diss T, et al. Variability of polymerase chain reaction detection of the bcl-2-IgH translocation in an international multicentre study. *Ann Oncol* 1999;10:1349-54.
- Liu Y, Hernández AM, Shibata D, Cortopassi GA. BCL2 translocation frequency rises with age in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:8910-4.
- Price CG, Meerabux J, Murtagh S, Cotter FE, Rohatiner AZ, Young BD, et al. The significance of circulating cells carrying t(14;18) in long remission from follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 1991;9:1527-32.

FOLLICULAR LYMPHOMA

R.E. MARCUS

Addenbrookes Hospital. Cambridge UK.

Introduction

Follicular lymphoma (FL) is the commonest type of indolent Non Hodgkin's Lymphoma (NHL) FL is twice as common in whites as in blacks, but occurs almost equally between genders, and most patients are over the age of 50 at diagnosis.

FL is a malignancy of follicle centre B cells that have at least a partially follicular pattern. Over the past two decades a variety of classifications have been used, and as a consequence many of the reported series of indolent lymphomas are not strictly comparable FL is sub-classified into grades 1-3 depending on the number of centroblasts per high-power field. There is general consensus that FL grades 1-2 share similar clinical features. The WHO classification recommends that FL grade 3 be subdivided into 3A and 3B according to the presence of solid sheets of centroblasts. The standard approach is to consider FL grade 3B as an aggressive NHL, and to treat it in a similar manner.

The majority of patients with FL present with widespread disease. Although nodal and splenic involvement is common and is accompanied by bone marrow involvement in 40 %, patients are frequently asymptomatic at diagnosis. The median survival ranges from 8-12 years and since there is no plateau in the cause specific survival curve, FL is frequently designated as both an "indolent" and an "incurable" disease. FL is characterized by a relentless responding/relapsing course, with spontaneous regressions occurring in 15-20 % of cases. After the initial relapse, both the response rate and relapse-free survival after subsequent therapy steadily decrease, resulting in a median survival of 4-5 years after first relapse Transformation to an aggressive histological subtype results in a more aggressive clinical behaviour.

The international prognostic index (IPI), used for aggressive NHL, is also useful in separating FL patients into different prognostic categories and provides uniformity in clinical trials.

tes (GELA) group has proposed the FLIPI score, based on multivariate analysis on prognostic variables in over 4000 patients in the USA and Europe. The five factors shown to be the most informative are age ≥ 60 years, haemoglobin $< 12\text{g/dl}$, lactate dehydrogenase (LDH) above the normal range, stage III/IV disease and the presence of > 3 nodal sites, which allow sub-division into good (0-1), intermediate (2) and poor (≥ 3) groups. The t(14;18) translocation provides a relatively easily accessible marker for the molecular monitoring of response to treatment. A correlation between molecular response to therapy and clinical outcome has been observed.

Early stage disease

In the region of one third of patients present with early stage disease (Ann Arbor stage I/II E). Within this cohort, there is a subset of patients that have the possibility of cure, and for this reason expectant therapy is contraindicated for localized disease. The mainstay of treatment has been with involved field radiotherapy radiation of known diseased nodes, including a suitable margin with or without inclusion of nearby uninvolved nodal sites.

Deferred therapy

Prior to commencing either initial therapy or treatment for relapsed disease, the clinician must consider the long natural history of advanced FL, and be clear as to what the therapeutic goals are. Although not always addressed in trials, the use of chemotherapy will inevitably impair quality of life and also contains the potential for myelosuppression, chronic fatigue and a risk of secondary leukaemia. Cumulative courses of chemotherapy (particularly with purine analogues) may prevent the collection of adequate numbers of stem cells for subsequent autologous haematopoietic stem cell transplantation (autoSCT). Several authors have prospectively compared an initial no-treatment policy versus an interventional approach, without any observed benefit in overall survival. Recently, the BNLI reported a prospective randomized study of 309 patients with advanced stage low-grade NHL (including 65% with FL), with a median follow-up of 16 years, which showed no difference in either overall or cause-specific survival between initial therapy with single-agent chlorambucil versus expectant management.

Conventional therapy

The most commonly used regimens for advanced FL requiring therapy, have been alkylator based such as chlorambucil (as monotherapy or with prednisolone), single-agent cyclophosphamide and CVP (cyclophosphamide, vincristine and prednisolone). These re-

gimens are well tolerated and effective. Anthracycline containing regimens such as CHOP (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisolone) and ProMACE-CytaBOM (cyclophosphamide, doxorubicin, etoposide, cytarabine, bleomycin, vincristine, methotrexate with leucovorin, and prednisolone) have improved response rates but not time to progression (TTP) or survival.

The combination of purine analogues with anthracyclines or alkylator agents has intrinsic appeal, and been the subject of a number of investigations: A randomized study compared FND (fludarabine, mitoxantrone, dexamethasone) with alternating triple therapy (which contains a variety of agents including anthracyclines, alkylators and platinum compounds), followed by maintenance alpha-interferon (α -IFN) and dexamethasone in both treatment arms. Response rates were high (97% seen in both schedules), and 5 year survival rates almost identical (median follow-up of nearly 6 years). Thus, despite the higher overall response rates generated by a variety of intensive approaches, no clear survival advantage over alkylator based therapy has been observed. The exception to this is the GELA group's CHVP (cyclophosphamide, doxorubicin, teniposide, and prednisone, 12 cycles over 18 months) plus α -IFN maintenance regime.

Rituximab: Scientific background

CD20 is a transmembrane phosphoprotein involved in regulating calcium homeostasis. Rituximab (mabthera/rituxan) (Hoffmann-La Roche and Genentech) is a chimeric anti-CD20 antibody consisting of the human IgG₁ Kappa constant region, with a murine IgG₁ monoclonal heavy and light chain variable region. *In vivo* studies have shown that the mouse component of the humanized antibody binds to CD20 with similar affinity to the native mouse anti-CD20. The human portion is then responsible for invoking effector mechanisms including complement-mediated cytotoxicity, antibody mediated cytotoxicity (ADCC), and possibly induction of apoptosis and induction of cellular immunity via cross-priming.

Rituximab is generally well-tolerated, the principal toxicity being infusion-related features such as fevers, rigors, nausea, asthenia, headache and pruritis in about 85% of patients. Despite the rapid clearance of CD20 positive circulating B cells (lasting more than six months) and a degree of myelosuppression associated with the use of rituximab, infectious complications tend not to be severe and polyclonal immunoglobulin levels are not significantly diminished, which is unsurprising given that plasma cells do not express CD20.

Rituximab: Clinical Trial Data

Initial data for rituximab in FL patients was generated in the relapsed setting. In a pivotal multi-cen-

tre phase III study for the use of rituximab monotherapy for relapsed indolent NHL, 166 patients received the standard 4-weekly regimen schedule. Intention to treat analysis revealed a median TTP of 13 months. The patients had received a median of 2 prior regimens (range 1-7) and the response rate of 48% appeared independent of response to preceding therapy.

Arguments in favour of first-line use include rituximab's lack of stem cell toxicity, its sparing of fertility, likely low rate of secondary malignancy and excellent safety profile. Colombat *et al* administered 50 previously untreated FL patients with the "classical" 4 × one-weekly schedule. An initial overall response rate of 73% and 20% CR rate (40% CR at one year) were seen. 60% of evaluable patients had molecular responses in the peripheral blood, a proportion maintained at the 1 year analysis. Although impressive, these results should be interpreted in the light that it involved the treatment of asymptomatic low-tumour burden patients.

A recently reported phase III trial of front-line therapy in the setting of advanced FL compared the addition of rituximab to CVP chemotherapy to CVP alone for 8 cycles in the therapy of 322 previously untreated patients with stage III/IV CD20 positive follicular NHL. By the FLIPI index 49% of patients had poor and 41% intermediate prognosis disease. The overall response rate (ORR) and complete response rate (CR + CRu) were 81% and 40% in the R-CVP arm vs 57% and 10% in the CVP arm respectively ($p < 0.0001$). With a median follow-up of 18 months, R-CVP patients had a highly significantly median prolonged time to treatment failure (TTF: defined as relapse, progression, stable disease after cycle 4, new anti-lymphoma treatment or death), of 27 months versus 7 months for CVP ($p < 0.0001$). At present, the median TTP has not yet been reached in patients receiving R-CVP compared to 13 months in those receiving CVP ($p < 0.0001$). Confirmation of these data has been recently provided by the German Low grade Study Group (GLSG), by comparing R-CHOP to CHOP alone, followed by a second randomization to α -IFN maintenance or AUTOSCT in responding patients. Although this study showed that the addition of rituximab produced only a moderate improvement in response rates (which may reflect the stringent assessment of bone marrow response), it translated into a substantial increase in response duration (TTF 2.6 years for CHOP, and not yet reached for R-CHOP). These well-conducted, multi-centre prospective studies represent a major advance and suggest that R-chemotherapy combinations may become a new standard of care for the first-line therapy of advanced stage FL. Prolonged follow-up will determine the effect of rituximab on survival.

Issues regarding dose, scheduling and duration of rituximab therapy have still to be resolved. A phase II

study by the Minnie Pearl Cancer Research Network of first-line rituximab monotherapy with scheduled maintenance (in chemo-responders) at 6-month intervals (total of 4 courses) produced high overall and complete response rates and suggested a longer progression-free survival (34 months) than has been reported with the "classical" 4-week treatment. The benefit of maintenance therapy has since been demonstrated in a randomized study by the SAKK group in which 185 evaluable FL patients with rituximab responsive disease were randomized to receive no further therapy or prolonged rituximab administration (375 mg/m^2) every 2 months for 4 times. At a median follow-up of 35 months, the median EFS was 12 months in the no further treatment arm versus 23 months in the prolonged treatment arm ($p = 0.02$). The optimal maintenance schedule (6 monthly × 4 weekly versus once every 8 weeks) remains to be determined.

Radioimmunotherapy

FL is by nature exquisitely radio-sensitive, but is frequently too widespread at diagnosis for external beam radiotherapy to be of value in its management. Targeted radioimmunotherapy (RIT), administered via radiolabelled anti-CD20 antibodies has the cytotoxic actions of antibody therapy combined with the additional benefits of delivering radiotherapy to CD20 positive tumour cells. Advantages of such an approach include efficacy even in cases where host-defence mechanisms are defective, of delivering localized radiotherapy by cross-fire to neighbouring tumour cells that are CD20 negative, and of penetrating bulky or poorly vascularized tumours.

The two most studied radiolabelled anti-CD20 antibodies (both U.S. Food and Drug Administration approved) are Bexxar (iodine 131 tositumomab, Corixa Corp, Seattle, WA) and Zevalin (yttrium 90 ibritumomab tiuxetan, Biogen Idec Inc, Cambridge, MA). Tositumomab and ibritumomab are murine anti-CD20 antibodies; the latter is covalently bound to tiuxetan which securely chelates the radionuclide. Myelosuppression, occurring between 1 and 2 months and lasting 2-4 weeks after RIT is the dose-limiting toxicity for both agents. In the order of 30% of patients treated with zevalin will develop neutropenia below $0.5 \times 10^9/\text{L}$ and 50% thrombocytopenia below $50 \times 10^9/\text{L}$, compared to 17% and 35% respectively for bexxar. It is generally recommended that patients with neutrophil counts less than $1.5 \times 10^9/\text{L}$, platelets below $100 \times 10^9/\text{L}$ or more than 25% lymphoma marrow involvement should not receive these agents. Concerns also remain over longer-term toxicities such as myelodysplasia and secondary malignancies.

The theoretical advantages of RIT have translated into favourable outcomes in clinical trials. A multi-centre trial of bexxar in 60 patients with relapsed or transformed low grade NHL produced response

rates of 65%, compared to 28% to the preceding chemotherapy regime ($p < 0.001$). Response durations were also significantly longer. A phase II study by SWOG of six cycles of CHOP followed by bexxar in previously untreated advanced FL patients produced promising results compared to historical experience with CHOP alone. A phase III randomized study in 143 patients comparing a single-dose of zevalin (pre-treated with two doses of rituximab) to $4 \times$ one-weekly rituximab, in follicular, other indolent NHL or transformed lymphoma, found response rates of 80% (CR 30%) and 56% (CR 16%) to zevalin and rituximab respectively ($p = 0.002$). However, there was no significant difference in duration of response or time to progression.

Press and co-workers in Seattle have conducted a series of investigations to determine the role of RIT as a replacement for total body irradiation in the preparative regimen for autoSCT for relapsed lymphoma. As compared to results with conventional high dose chemoradiotherapy, survival and PFS rates appear superior to historical controls. The Nebraska group is currently conducting a phase II study of Bexxar at 75cGy followed by BEAM (BCNU, etoposide, cytarabine, melphalan) conditioning.

Stem cell transplantation

The clinical impact of autoSCT remains to be fully established. Two recent prospective clinical trials have tested the efficacy of autoSCT in the initial therapy of high-tumour burden FL. A GELA study randomized 401 evaluable patients (median age 49 years) to CHVP and maintenance α -IFN, or to 4 cycles of CHOP and an autograft. When patients with a persistent response of 6 months or more were analyzed, both EFS and overall survival were significantly longer in autoSCT recipients. The incidence of secondary malignancies was not higher in the transplant arm. The Groupe Ouest Est d'Etude des Leucemies Aigues et Maladies du Sang (GOELAMS) group report a similarly designed study of 169 evaluable patients, with a median age of 50 years. After a median follow-up of 56 months, the 5 year EFS was significantly improved in the transplant arm, but the overall survival remained the same.

To address the value of autoSCT in the relapsed setting, the European Bone Marrow Transplant (EBMT) CUP trial randomized 89 chemo-responders to a further 3 cycles of chemotherapy, or to receive an in vitro purged or unpurged autograft. With a median 5 year follow-up, autoSCT significantly improved PFS and overall survival relative to conventional chemotherapy. This was a landmark study, which showed for the first-time in a prospective randomized fashion, that high dose therapy appears to alter the clinical course of patients at time of first relapse.

AlloSCT offers the twin advantages of a graft versus lymphoma (GvL) effect and a stem cell graft free of occult disease. Recurrence rates are low and tend

to occur within the first year following alloSCT (in marked contrast to the pattern seen following autoSCT), suggesting a curative potential. Whether cure results from eradication of disease from the myeloablative preparative regimen, or due to a GvL effect (or both) remains unclear. Non-myeloablative alloSCT involves reduced TRM and morbidity due to the use of a less intense preparative regimen to achieve engraftment. The primary therapy to eradicate malignancy is immune mediated via a GvL effect. Results to date, which have been in small series of selected patients or from Registry data, suggest a role for this type of therapy within a subset of FL patient, some of whom may be successfully salvaged by donor lymphocyte infusions.

Conclusion

Except in the subset of patients with localized disease, FL should still be regarded as an incurable malignancy. However, the provocative new data covered by this review, provides much cause for excitement and guarded optimism. Rituximab represents a novel treatment approach for a variety of disease settings, with a proven excellent efficacy and toxicity profile. Long-term data is required to establish whether its use translates into survival benefit. As the clinical activity of rituximab and other new therapeutic approaches becomes established, it will be important to determine how best to integrate these results into the standard care of patients with follicular lymphoma.

References

- Ardeshtna KM, Smith P, Norton A, Hancock BW, Hoskin PJ, MacLennan KA, et al. Long-term effect of a watch and wait policy versus immediate systemic treatment for asymptomatic advanced-stage non-Hodgkin lymphoma: a randomised controlled trial. *Lancet* 2003;362:516-22.
- Aviles A, Duque G, Talavera A, Guzmán R. Interferon alpha 2b as maintenance therapy in low grade malignant lymphoma improves duration of remission and survival. *Leuk Lymphoma* 1996;20:495-9.
- Bremer K. Semi-extended, six weekly rituximab infusions in pre-treated advanced low-grade B cell non-Hodgkin's lymphoma: a phase II study. *Anticancer Drugs* 2003;14:809-15.
- Brice P, Bastion Y, Lepage E, Brousse N, Haioun C, Moreau P, et al. Comparison in low-tumor-burden follicular lymphomas between an initial no-treatment policy, prednimustine, or interferon alfa: a randomized study from the Groupe d'Etude des Lymphomes Folliculaires. *Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. J Clin Oncol* 1997; 15:1110-7.
- Colombat P, Salles G, Brousse N, Eftekhari P, Soubeyran P, Delwail V, et al. Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) as single first-line therapy for patients with follicular lymphoma with a low tumor burden: clinical and molecular evaluation. *Blood* 2001;97:101-6.
- Czuczman M, Grillo-López AJ, LoBuglio AI, Gordon L, Starostik P, Dowden S, et al. Patients with Low-Grade NHL Treated with Rituximab + CHOP Experience Prolonged Clinical and Molecular Remission. *Blood* 2003; 102:abstract 1493.
- Davis TA, Grillo-López AJ, White CA, McLaughlin P, Czuczman MS, Link BK, et al. Rituximab anti-CD20 monoclonal antibody therapy in non-Hodgkin's lymphoma: safety and efficacy of re-treatment. *J Clin Oncol* 2000;18:3135-43.
- Dreyling MH, Forstpointner R, Repp R, Hermann S, Haenel A, Metzner B, et al. Combined Immuno-Chemotherapy (R-FCM) Results in Superior Remission and Survival Rates in Recurrent Follicular and Mantle Cell Lymphoma Final Results of a Prospective Randomized Trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *Blood* 2003; 102:abstract 351.
- Ghielmini M, Hsu Schmitz SF, Cogliatti SB, Pichert G, Hummerjohann J, Waltzer U, et al. Prolonged treatment with rituximab in patients with follicular lymphoma significantly increases event-free survival and response duration compared with the standard weekly $\times 4$ schedule. *Blood* 2004.

- Gopal AK, Gooley TA, Maloney DG, Petersdorf SH, Eary JF, Rajendran JG, et al. High-dose radioimmunotherapy versus conventional high-dose therapy and autologous hematopoietic stem cell transplantation for relapsed follicular non-Hodgkin lymphoma: A multivariable cohort analysis. *Blood* 2003;102:2351-7.
- Hainsworth JD, Litchy S, Burris HA 3rd, Scullin DC Jr, Corso SW, Yardley DA, et al. Rituximab as first-line and maintenance therapy for patients with indolent non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2002;20:4261-7.
- Hainsworth JD, Litchy S, Morrissey L, Yardley D, Greco FA. Rituximab as First-Line and Maintenance Therapy for Indolent Non-Hodgkin's Lymphoma (NHL): Long-Term Follow-Up of a Minnie Pearl Cancer Research Network Phase II Trial. *Blood* 2003;102:abstract 1496.
- Halaas JL, Teruya-Feldstein J, Zelenetz AD. Follicular Lymphoma Grade 3 Is Not Equivalent to Follicular Large Cell Lymphoma: Comparison of the WHO and IWF Classification System. *Blood* 2003;102:abstract 1431.
- Hiddeemann W, Dreyling MH, Forstpointner R, Kneba M, Woermann B, Lengfelder E, et al. Combined Immuno-Chemotherapy (R-CHOP) Significantly Improves Time To Treatment Failure in First Line Therapy of Follicular Lymphoma Results of a Prospective Randomized Trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *Blood* 2003;102: abstract 353.
- Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. En: Kleihues P, Sobin LH, editors. World Health Organization Classification of Tumours. World Health Organization Classification of Tumours: International Agency for Research on Cancer Press, 2001.
- Kaminski MS, Zelenetz AD, Press OW, Saleh M, Leonard J, Fehrenbacher L, et al. Pivotal study of iodine ¹³¹I tositumomab for chemotherapy-refractory low-grade or transformed low-grade B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Oncol* 2001;19:3918-28.
- Khoury IF, Saliba RM, Giral SA, Lee MS, Okoroji CJ, Hagemeister FB, et al. Nonablative allogeneic hematopoietic transplantation as adoptive immunotherapy for indolent lymphoma: low incidence of toxicity, acute graft-versus-host disease, and treatment-related mortality. *Blood* 2001;98:3595-9.
- Klasa RJ, Meyer RM, Shustik C, Sawka CA, Smith A, Guevin R, et al. Randomized phase III study of fludarabine phosphate versus cyclophosphamide, vincristine, and prednisone in patients with recurrent low-grade non-Hodgkin's lymphoma previously treated with an alkylating agent or alkylator-containing regimen. *J Clin Oncol* 2002;20: 4649-54.
- Mac Manus MP, Hoppe RT. Is radiotherapy curative for stage I and II low-grade follicular lymphoma? Results of a long-term follow-up study of patients treated at Stanford University. *J Clin Oncol* 1996;14: 1282-90.
- Marcus R, Imrie K, Belch A, Cunningham D, Flores E, Catalano J, et al. An International Multi-Centre, Randomized, Open-Label, Phase III Trial Comparing Rituximab Added to CVP Chemotherapy to CVP Chemotherapy Alone in Untreated Stage III/IV Follicular Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood* 2003;102: abstract 87.
- McLaughlin P, Grillo-López AJ, Link BK, Levy R, Czuczman MS, Williams ME, et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol* 1998;16:2825-33.
- Pan D, Qin J, Farber C, O'Brien J, Filippa D, Portlock CS. CHOP with high dose cyclophosphamide consolidation versus CHOP alone as initial therapy for advanced stage, indolent non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2003;44:967-71.
- Peterson BA, Petroni GR, Oken MM, Johnson JL, Barcos M, Cooper MR. Cyclophosphamide versus Cyclophosphamide plus interferon alfa2b in follicular lymphoma: an intergroup phase III trial (CALGB 8691 and EST 7486). *Proc Am Soc Clin Oncol* 1997;16:abstract 48.
- Piro LD, White CA, Grillo-López AJ, Janakiraman N, Saven A, Beck TM, et al. Extended Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) therapy for relapsed or refractory low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 1999;10:655-61.
- Press OW, Eary JF, Gooley T, Gopal AK, Liu S, Rajendran JG, et al. A phase I/II trial of iodine-131-tositumomab (anti-CD20), etoposide, cyclophosphamide, and autologous stem cell transplantation for relapsed B-cell lymphomas. *Blood* 2000;96:2934-42.
- Press OW, Unger JM, Brazier RM, Maloney DG, Miller TP, LeBlanc M, et al. A phase 2 trial of CHOP chemotherapy followed by tositumomab/iodine ¹³¹I tositumomab for previously untreated follicular non-Hodgkin lymphoma: Southwest Oncology Group Protocol S9911. *Blood* 2003; 102:1606-12.
- Rambaldi A, Carloti E, Baccarani M, Barbui T, Lauria F, Lazzarino M, et al. Long Term Improvement of Clinical Outcome of Follicular Lymphoma Patients Achieving a Molecular Response after Sequential CHOP and Rituximab Treatment: Predictive Value of Real Time Quantitative PCR To Identify Responding Patients. *Blood* 2003;102: abstract 1487.
- Schouten HC, Qian W, Kvaloy S, Porcellini A, Hagberg H, Johnson HE, et al. High-dose therapy improves progression-free survival and survival in relapsed follicular non-Hodgkin's lymphoma: results from the randomized European CUP trial. *J Clin Oncol* 2003;21:3918-27.
- Solal-Celigny P, Lepage E, Brousse N, Tendler CL, Brice P, Haioun C, et al. Doxorubicin-containing regimen with or without interferon alfa-2b for advanced follicular lymphomas: final analysis of survival and toxicity in the Groupe d'Etude des Lymphomes Folliculaires 86 Trial. *J Clin Oncol* 1998;16:2332-8.
- Tsimberidou AM, McLaughlin P, Younes A, Rodríguez MA, Hagemeister FB, Sarris A, et al. Fludarabine, mitoxantrone, dexamethasone (FND) compared with an alternating triple therapy (ATT) regimen in patients with stage IV indolent lymphoma. *Blood* 2002;100:4351-7.

- Vaughan Hudson B, Vaughan Hudson G, MacLennan KA, Anderson L, Linch DC. Clinical stage 1 non-Hodgkin's lymphoma: long-term follow-up of patients treated by the British National Lymphoma Investigation with radiotherapy alone as initial therapy. *Br J Cancer* 1994;69: 1088-93.
- Velásquez WS, Lew D, Grogan TM, Spiridonidis CH, Balcerzak SP, Dakhlil SR, et al. Combination of fludarabine and mitoxantrone in untreated stages III and IV low-grade lymphoma: S9501. *J Clin Oncol* 2003;21: 1996-2003.
- Witzig TE, Gordon LJ, Cabanillas F, Czuczman MS, Emmanouilides C, Joyce R, et al. Randomized controlled trial of yttrium-90-labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2002;20: 2453-63.
- Witzig TE, White CA, Gordon LI, Wiseman GA, Emmanouilides C, Murray JL, et al. Safety of yttrium-90 ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy for relapsed low-grade, follicular, or transformed non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2003;21:1263-70.

PAPEL DEL TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS EN LA ESTRATEGIA TERAPÉUTICA DEL LINFOMA FOLICULAR

E. CONDE GARCÍA

Profesor Titular de Hematología. Servicio de Hematología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander.

Introducción

El linfoma folicular (LF) es una neoplasia que se caracteriza porque el curso clínico de los pacientes es muy prolongado y la supervivencia sin tratamiento que se mide en años. En la clasificación REAL/OMS se reconocen tres subtipos de LF, el de linfocitos pequeños con núcleo hendido (tipo I), el mixto (tipo II) y el de linfocitos grandes (tipo III)¹. En el 80% de los pacientes con LF la enfermedad está diseminada en el momento del diagnóstico y muy frecuentemente está afectada la médula ósea². Por otro lado, el 85-90% de los pacientes presentan una alteración molecular, la t(14;18), que permite hacer un seguimiento de la enfermedad residual para evaluar la respuesta terapéutica.

La mediana de edad de los pacientes al diagnóstico es superior a los 55 años y tienen una mediana de supervivencia (SG) de 8-10 años por lo que los tratamientos agresivos no se justifican en primera línea³. Sin embargo, son neoplasias incurables con el tratamiento convencional como se demuestra porque los pacientes tienen una tasa anual constante de muertes del 5-8% y una ausencia de meseta en las curvas de supervivencia⁴. Además, se sabe que después de cada recaída disminuye la tasa de respuesta y se acorta significativamente la supervivencia libre de progresión⁴, lo que explica que se hayan realizado tratamientos intensivos en pacientes con enfermedad diseminada que, o no han respondido, o han recaído después del tratamiento de primera línea.

La justificación para el empleo de dosis altas de quimioterapia sola o asociada a radioterapia y rescate con células progenitoras hematopoyéticas (CPH) se basa en el patrón de respuesta al tratamiento, que es escalonado y está directamente relacionado con la dosis, de tal manera que un aumento de la dosis va seguido de una mayor respuesta, pero, también, de una mayor toxicidad^{3,4}. En la actualidad, los cuidados de soporte del trasplante han mejorado notablemente y desde que se utilizan CPH obtenidas de sangre periférica para el rescate, la mediana de recuperación de las cifras periféricas es de 12 días y la mortalidad relacionada con el trasplante es inferior al 5%⁵. El trasplante autólogo de CPH (TACPH) es el tratamiento estándar en los pacientes con linfoma de células grandes en recaída con enfermedad quimiosensible. Por el contrario, la experiencia del TACPH en los pacientes con LF es mucho menor. Estudios retrospectivos o en fase-II han mostrado mejores tasas de remisión completa (RC) en los pacientes trasplantados, pero no se acompaña de un aumento de la supervivencia y en las curvas de supervivencia sigue sin observarse meseta⁴.

Además de la quimioterapia y radioterapia tradicionales utilizadas en el tratamiento de los LF, en la última década se han incorporado nuevas opciones terapéuticas muy eficaces como son los análogos de las purinas, los anticuerpos monoclonales no conjugados o conjugados con un isótopo radiactivo, el interferón alfa y las vacunas antiidiotipo⁵. En este contexto, la indicación del autotrasplante de CPH es más controvertida. Sin embargo, cada vez hay más evidencia de la importancia que tiene el efecto "injerto contra linfoma" en el control del linfoma⁶ y, por esta razón, los alotrasplantes de CPH tienen ahora su lugar en el tratamiento de los LF, especialmente aquellos en los que se utiliza un tratamiento de acondicionamiento no mieloablativo⁷.

Cuestiones que se plantean en el autotrasplante en los linfomas indolentes

Uno de los principales obstáculos para realizar un autotrasplante de médula ósea o de sangre periférica en pacientes con un linfoma indolente es la afectación de la médula ósea, que puede llegar a ser del 80% en el momento del diagnóstico³. En los LF los estudios fenotípicos y moleculares han demostrado que con frecuencia hay enfermedad oculta, en presencia de una médula ósea histológicamente normal, que puede favorecer la recidiva del linfoma. Con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se puede detectar una célula tumoral entre 10⁶ células normales. Gribben et al⁸ han demostrado que todos los pacientes con LF que recayeron tenían una médula ósea positiva en el momento de la recolección de las CPH. Debido a esto, el ideal es reinfundir injertos libre de tumor o alternativamente, si es posible, injertos alogénicos aunque, en este caso, el be-

neficio terapéutico puede estar contrarrestado por la mayor mortalidad relacionada con el trasplante³.

La mayoría de las recaídas después del trasplante ocurren en lugares previos de enfermedad, lo que sugiere que el trasplante no es capaz de erradicar la enfermedad residual en el paciente. Sin embargo, estudios usando células del inóculo marcadas indican que las células del tumor reinfundidas también contribuyen a la recaída. Una hipótesis alternativa podría ser que las células reinfundidas tienden a anidar y proliferar en lugares previamente afectados debido a un microambiente óptimo.

Debido a la larga historia natural de estos linfomas y a las múltiples opciones terapéuticas disponibles en la actualidad, la indicación de un TACPH es controvertida y son numerosas las cuestiones que deben analizarse antes de realizar el trasplante.

Pacientes candidatos al trasplante

Los objetivos que debemos perseguir con el trasplante en los pacientes con LF son mejorar la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global con una toxicidad aceptable. La valoración de los factores pronósticos y la consecución de una respuesta molecular pueden ayudarnos a identificar grupos de pacientes que pueden beneficiarse del trasplante^{9,10}.

Factores pronósticos. El modelo pronóstico internacional para pacientes con LF (Follicular Lymphoma International Prognostic Index, FLIPI)¹¹ valora cinco variables que influyen negativamente en la supervivencia global (edad \geq 60 años, estadios III-IV, lactato deshidrogenasa [LDH] sérica elevada, hemoglobina $<$ 12 g/dl y afectación de más de cuatro áreas ganglionares). Con estas cinco variables se establecen 3 grupos de riesgo con bueno, intermedio y mal pronóstico. La supervivencia global a los 10 años para cada grupo es del 70,7, 51 y 35,5%, respectivamente¹⁰. De acuerdo con estos datos, los pacientes jóvenes de los grupos intermedio y malo podrían ser unos candidatos adecuados para el trasplante.

Remisión molecular. El grupo del Dana Farber Cancer Institute ha demostrado que la supervivencia libre de progresión es significativamente mayor en los pacientes que se trasplantan con un inóculo en RC molecular, después de realizar un "purging" con anticuerpos monoclonales, comparados con el grupo de pacientes en los que se detectaba enfermedad residual por PCR⁸. Los resultados actualizados de este estudio¹² y los datos conocidos del tratamiento quimioterápico intensivo convencional sin trasplante sugieren que la negativización mantenida de la PCR durante el seguimiento es un factor fuertemente predictivo de prolongación de la RC^{10,13}. Según esto, la detección de la enfermedad residual por PCR puede ser un objetivo útil para evaluar el impacto del trasplante en estos pacientes. Por tanto, los mejores resultados del trasplante se conseguirán

Tabla 1. Supervivencia estimada en pacientes autotrasplantados por LF en recaída/progresión

Referencia	N	Fuente	Purging	ICT	SLP(a) (%)	SG (a) (%)
Freedman	153	MO	+	+	42 (8)	66 (8)
Apostolidis	99	MO	+	+	63 (5,5)	69 (5,5)
Schouten	89	MO	+/-	+/-	52 (5)	50 (5)
Brice	83	MO/SP	-	+/-	42 (5)	58 (5)
Bierman	100	MO/SP	-	+/-	44 (4)	65 (4)
Rohatiner	121	MO	+	+	55 (4)	70 (4)
Weaver	59	SP	-	-	32 (3,5)	57 (3,5)
Bastion	60	SP	-	+/-	53 (2)	66 (2)
Van Besien	131	MO/SP	+	+/-	39 (5)	62 (5)
Van Besien	579	MO/SP	-	+/-	31 (5)	55 (5)
Gopal	98	MO/SP	+	+/-	29 (5)	53 (5)
GELTAMO	243	MO/SP	-	+/-	29 (13)	35 (13)

LF: linfoma folicular; ICT: irradiación corporal total; SLP: supervivencia libre de progresión; SG: mediana de supervivencia; MO: médula ósea; SP: sangre periférica.

cuando el injerto está libre de enfermedad o cuando la PCR se hace negativa después del trasplante^{8,12}. Sin embargo, hasta ahora nunca se han considerado los hallazgos moleculares a la hora de planificar un trasplante. La incorporación del anticuerpo monoclonal anti-CD20 al tratamiento *in vivo* puede ayudar a conseguir la eliminación de la enfermedad mínima residual y un inóculo sin enfermedad¹⁴. El European Bone Marrow Transplant (EBMT) está realizando un estudio para conocer el impacto del rituximab antes y después del trasplante en los pacientes con LF.

Cuando debe realizarse el trasplante

Independientemente de otras variables, la respuesta al tratamiento de primera línea es uno de los indicadores pronósticos más importantes. Cuando un paciente no responde al tratamiento inicial se considera que tiene un linfoma resistente primario y la supervivencia en estos casos es muy corta. Igualmente, los pacientes que no alcanzan RC o en los que sólo se logra una remisión parcial después del tratamiento inicial también tienen una supervivencia muy corta⁵. Estos pacientes podrían beneficiarse con las nuevas estrategias de tratamiento y son unos buenos candidatos para el trasplante. Después del tratamiento de primera línea, los pacientes pueden presentar episodios sucesivos de recidiva o progresión tumoral y aquí también se puede probar el beneficio potencial del trasplante para prevenir nuevas recidivas y la muerte. Por otro lado los pacientes con LF tienen una alta frecuencia de transformación histológica a linfomas más agresivos, que puede llegar al 70% con el paso de los años, por lo que deben considerarse candidatos para el trasplante, por el mal pronóstico que conlleva¹⁵. Actualmente no se dispone de datos que apoyen esperar a que tenga lugar la transformación histológica

para considerar el trasplante o realizarlo en primera o segunda línea. Sin embargo, sabemos que cuando el paciente tiene un mal ECOG y alterada de la función de algún órgano, el trasplante puede resultar excesivamente tóxico.

Primera o posterior recaídas

Después de la recaída, los LF continúan siendo sensibles a la quimioterapia, pero la SG libre de progresión disminuye con cada recaída posterior³. Esta situación sugiere que la curación de los pacientes con un LF avanzado se conseguiría probablemente mejor si se instaurara el tratamiento de rescate en el curso precoz de la enfermedad³. Sin embargo, un obstáculo mayor es la dificultad para identificar la progresión de la enfermedad asintomática. En ausencia de manifestaciones clínicas, los nuevos métodos biológicos y de imagen pueden guiarnos en la toma de decisión pero su uso no está todavía estandarizado.

No hay pruebas aleatorizadas disponibles que comparen los regímenes intensivos con los estándar en pacientes con LF en recaída. Esto significa que la contribución del trasplante ha sido sólo investigada en ensayos fase II y estudios retrospectivos que incluyen a más de 500 pacientes. La SG y la supervivencia libre de enfermedad (SLE) estimadas en los pacientes trasplantados en recaída se muestran en la tabla 1. Las características de los pacientes incluidos y la duración del seguimiento son heterogéneas, pero las curvas de supervivencia a largo plazo no muestran meseta.

En resumen, los datos publicados hasta la fecha están a favor del trasplante en pacientes con LF en recaída. Sin embargo, estos estudios se realizaron en pacientes con enfermedad quimiosensible y su utilidad puede ser puesta en duda por la selección de pacientes y por la heterogeneidad de los criterios de evaluación utilizados.

Transformación histológica

La transformación histológica a un linfoma no hodgkiniano (LNH) más agresivo es un acontecimiento frecuente que puede llagar hasta el 70% con el paso de los años. La transformación histológica está asociada con una peor evolución (SG de 7 meses)¹⁶. Los factores predictivos de mala respuesta fueron la no obtención de una RC, los niveles bajos de albúmina sérica (< 35 g/l) y una beta-2 microglobulina elevada (> 3 mg/l)¹⁵. El riesgo de transformación histológica aumenta con el número de recaídas, de 24% en la primera recaída al 48% en las siguientes.

El resumen, los datos recogidos en la literatura especializada indican que el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) en pacientes con LF transformado, con enfermedad quimiosensible, puede proporcionar largas supervivencias. En ausencia de otras opciones terapéuticas, el trasplante debe ser ofrecido como consolidación en estos pacientes.

Trasplante como tratamiento inicial

En la última década se han conseguido avances importantes en los cuidados de soporte y en el tratamiento de la aplasia lo que ha supuesto una reducción de la mortalidad relacionada con el tratamiento al 3,5%¹⁷. Debido a esta baja mortalidad, algunos autores han incluido al trasplante en los tratamientos de primera línea. Después de la recaída, los pacientes con menos de 60 años con una RC inicial tienen una tasa de supervivencia mejor que aquellos que sólo alcanzaron una remisión parcial con el tratamiento de primera línea. Esta observación incita a la investigación del trasplante como tratamiento inicial para los buenos respondedores con el objetivo de obtener porcentajes de RC más elevados y así mejorar la supervivencia. La información disponible se basa en estudios retrospectivos o en estudios fase II^{18,19} (tabla 2).

Freedman et al²⁰ publicaron los resultados de un estudio en 83 pacientes previamente no tratados con LF en estadio avanzado que fueron tratados con una quimioterapia de inducción uniforme con CHOP (ciclofosfamida, adriamicina, vincristina, prednisona) seguido por un trasplante autólogo con una médula ósea purgada con anticuerpos monoclonales anti-B. Después de la inducción con CHOP, aunque sólo el 36% alcanzaron RC, 77 de los que respondieron fueron sometidos al trasplante. Con una mediana de seguimiento de 45 meses, la SLE y la SG a los 3 años después del trasplante, fueron del 63 y 89%, respectivamente.

En resumen, los estudios no controlados sugieren que el trasplante en primera línea prolonga la supervivencia libre de progresión pero no tiene ningún beneficio documentado hasta la fecha en la supervivencia. El grupo GELA está realizando una prueba aleatorizada como consolidación para comparar el trasplante frente a quimioterapia estándar.

Como debe realizarse el autotrasplante

Acondicionamiento

Los regímenes de preparación intentan obtener la máxima respuesta tumoral con una mínima toxicidad no hematológica. Los LF son muy sensibles a la radioterapia, por lo que se ha preconizado la ICT a la dosis de 12 Gy con CF o CF + etopósido para el acondicionamiento. Alternativamente, se ha demostrado que la mayoría de regímenes de quimioterapia son eficaces. Los regímenes quimioterápicos actualmente más utilizados son el BEAM (BCNU, etopósido, ara-C y melfalán), BEAC (BCNU, etopósido, ara-C y CF) CBV (BCNU, etopósido y CF) y el ICE (ifosfamida, carboplatino y etopósido). En general se considera que todos proporcionan unos resultados similares con una morbilidad relacionada con el trasplante baja; sin embargo, debido a que las comparaciones se han realizado sobre datos de registro o estudios retrospectivos de varias instituciones y

Tabla 2. Supervivencia estimada en pacientes autotrasplantados en primera línea por LF

Referencia	N	Fuente	Purging	ICT	SLP(a) (%)	SG (a) (%)
Voso	70	SP	+	+	78 (3,6)	86 (3,6)
Seyfarth	33	SP	-	+/-	76 (4)	92 (4)
Tarella	29	SP	+/-	-	59 (9)	79 (9)
Morel	18	MO	-	-	79 (3)	86 (3)
Horning	37	SP	+	+	60 (10)	86 (10)
Freedman	77	MO	+	+	63 (3)	89 (3)
Colombat	27	SP	+	+	55 (6)	64 (6)
González-Barca	15	SP	+	+	83 (4,7)	NP
Ladetto	98	SP	-	-	58 (2,5)	92 (2,5)
GELTAMO	143	MO/SP	-	+/-	65 (15)	81 (15)

LF: linfoma folicular; ICT: irradiación corporal total; SLP: supervivencia libre de progresión; SG: mediana de supervivencia; SP: sangre periférica; MO: médula ósea; NP: ????

que no existen estudios aleatorizados, no hay datos definitivos para afirmar que todos los regímenes de acondicionamiento son similares.

Fuentes de células progenitoras hematopoyéticas

Se sabe que la mayoría de los pacientes sin evidencia morfológica de afectación en la médula ósea o sangre periférica tienen una contaminación de células linfomatosas cuando estas muestras son estudiadas con métodos más sensibles. Se ha demostrado que el TCPH realizado con CPH obtenidas de sangre periférica acorta significativamente los días de neutropenia, los días de fiebre y el tiempo de hospitalización de los pacientes, por lo que en la actualidad se ha cambiado la fuente de progenitores de la médula ósea a la sangre periférica.

Evaluación del purging

El *purging ex vivo* se ha realizado con el objetivo de eliminar las células malignas que contaminan el injerto. Varios investigadores han evaluado el impacto del *purging ex vivo* en la evolución clínica²¹. El procedimiento no deteriora el injerto, pero su eficacia es muy controvertida. Hasta la fecha no hay ningún estudio aleatorizado disponible que confirme su eficacia debido, principalmente, al gran número de pacientes requeridos para demostrar pequeñas diferencias en la supervivencia.

La filosofía del *purging* ha cambiado como consecuencia de la inclusión de los anticuerpos monoclonales (AcMo) anti-CD20 en el tratamiento de los pacientes. Varios grupos han propuesto el *purging in vivo* pretrasplante con rituximab con resultados esperanzadores y otros han usado el rituximab como consolidación postrasplante¹⁴. Las conclusiones que se pueden sacar son: a) la eficacia del *purging* con Rituximab parece que es superior a la que se consigue con los procedimientos de depleción *ex vivo*, probado por PCR; b) la administración de rituximab pre-

trasplante no compromete la colecta de CPH, aunque el paciente haya sido muy tratado, y c) las CPH recolectadas después del tratamiento con rituximab funcionan normalmente y no hay retrasos en el prendimiento del injerto. La eficacia del tratamiento con rituximab antes y después del trasplante está siendo evaluada por el EBMT.

Estado actual del trasplante alogénico en los linfomas foliculares

En general, ha habido poco interés para realizar un tratamiento potencialmente letal en una enfermedad con una historia natural larga y que es más frecuente en personas mayores. Sin embargo, cada vez es más evidente que, en los pacientes jóvenes con un LF de mal pronóstico, los nuevos tratamientos (análogos de las purinas y AcMo) se utilizan con más frecuencia. En este grupo de pacientes, el autotrasplante ha sido considerado el tratamiento de elección. Como consecuencia, el alotrasplante sólo se ha realizado en pacientes muy tratados, incluso después de un autotrasplante, en malas condiciones clínicas y con factores pronósticos adversos²². La razón para dejar al alotrasplante como un tratamiento de "último recurso" es debido a la elevada morbimortalidad relacionada con el tratamiento. Sin embargo, una ventaja potencial mayor del alo sobre el auto es el reconocimiento inmunológico de las células del linfoma por las células alogénicas del donante que origina el efecto injerto contra linfoma (ICL).

Los primeros estudios publicados de que el alo es un tratamiento eficaz en pacientes con LNH indolente refractario, se basaron en un número limitado de pacientes. En un estudio del IBMTR realizado entre los años 1984 y 1995, se incluyeron a 113 pacientes de 50 centros²³. Los pacientes alotrasplantados eran jóvenes (mediana de edad 38 años, extremos 15-61) y tenían una enfermedad avanzada. La mediana de tratamientos previos recibidos fue de 2 (extremos 0-5). Treinta y ocho pacientes tenían una enfermedad refractaria y un tercio de los mismos tenía una situación clínica mala (Karnofsky < 80%) al trasplante. En todos los casos, el donante era un hermano HLA (antígeno de histocompatibilidad) idéntico. El acondicionamiento se realizó con ICT en el 82% de los pacientes y se utilizó la ciclosporina como profilaxis de la enfermedad injerto contra huésped (EICH) en el 74% de los pacientes. La SG y la SLE a los 3 años llegó casi al 50%. La tasa de recaída era baja (16%), pero la mortalidad relacionada con el trasplante era bastante alta (40%). La tasa de supervivencia era más alta en los pacientes con un estado clínico mejor (Karnofsky pretrasplante \geq 90%) y en los más jóvenes (< 40 años). Unos resultados similares han sido publicados por el EBMT²⁴. La mortalidad relacionada con el trasplante está directamente relacionada con la EICH y con la inmunodeficiencia que favorece las infecciones. Para reducir estas complicaciones se han realizado alotrasplantes

con depleción de células T, pero parece ser, como sucede en el caso de las leucemias, que se aumenta el riesgo de recaída.

Se han hecho intentos para comparar la evolución del auto y el alo con resultados conflictivos. Verdonck et al²⁵ compararon la evolución de 18 pacientes que recibieron un autólogo no purgado con 10 pacientes alotrasplantados; la supervivencia libre de progresión a los 2 años para los alotrasplante fue del 68 y del 22% para los autotrasplantes ($p = 0,049$). En un reciente estudio del IBMTR se compararon 176 pacientes alotrasplantados con 131 que recibieron un autotrasplante purgado y con 579 pacientes que fueron autotrasplantados con un injerto no manipulado²⁶. La SG a los 5 años para el trasplante alogénico, el autotrasplante purgado y el auto no purgado fue del 51, 62 y 55%, respectivamente. Las variables que influyeron negativamente en la supervivencia fueron la edad avanzada, el tiempo prolongado entre el diagnóstico y el trasplante, la LDH sérica elevada, la enfermedad quimiorresistente, la infiltración de la médula ósea, la mala situación clínica y el haber realizado el trasplante entre los años 1990 y 1993. La ICT estaba relacionada con una mortalidad tóxica mayor y con una menor recaída. La probabilidad de recaída para los 3 grupos de trasplante fue del 21, 43 y 58% ($p < 0,001$) y la mortalidad relacionada con el trasplante, para los mismos tres grupos, fue del 30, 14 y 8%, respectivamente ($p < 0,001$)²⁶.

En resumen, el alotrasplante convencional puede proporcionar una tasa de supervivencia a largo plazo en torno al 50% en pacientes con LNH indolente avanzado. El bajo riesgo de recaída en los supervivientes a largo plazo es debido, probablemente, al efecto ICL asociado con el alotrasplante. Sin embargo, la mortalidad relacionada con el trasplante es más alta en los alotrasplantes convencionales, lo que contrarresta la ventaja del beneficio mediado inmunológicamente. Este aumento de la mortalidad relacionada con el trasplante es especialmente alto en los pacientes mayores, por lo que se necesitan nuevos protocolos de trasplante alogénico, ya que la mediana de edad de estos pacientes es de unos 60 años.

Trasplante con acondicionamiento no mieloablativo

Basados en los estudios preclínicos en un modelo canino y en los estudios clínicos previos de Slavin et al²⁷ y Giralt et al²⁸, un nuevo procedimiento de alotrasplante está emergiendo. Consiste en reducir la elevada toxicidad del acondicionamiento utilizando un tratamiento de preparación inmunosupresor y no mieloablativo y en aprovechar el efecto ICL propio de los alotrasplantes⁶. El objetivo es lograr el prendimiento del injerto y conseguir un estado transitorio de quimerismo mixto que vaya seguido por la inducción de una hematopoyesis completa del donante facilitada por la inmunosupresión del pa-

Tabla 3. Minialotrasplante en pacientes con neoplasias linfoides

Referencia	N	SLP (LF)	Acondicionamiento-profilaxis EICH	EICHA (%) (grado)	EICHC (%)	MRT (%)	SLE (%) (a)	SG (%)
Nagler	23	LNH-EH (-)	Fluda-BU-ATG-CSA	34 (2-4)	17	30	40 (3)	40
Dreger	7	LNH (1)	Fluda-CY-CSA-MTX	28 (3-4)	3/5	28	71 (1)	71
Khoury	9	LLC (6)	Fluda-CY-CSA-Tacro	26 (2-4)	13	40	33 (1)	50
Khoury	20	LNH (18)	Fluda-BU ± R-CSA	20 (2-4)	64	10	84 (2)	84
Mohty	11	LNH (3)	Fluda-BU ± ATG-CSA	54 (2-4)	-	36	9 (1)	27
Hou	14	LNH (4)	Fluda-CY-CSA	71 (2-4)	-	7	69 (100 d.)	76
Carella	15	LNH (5)	Fluda-CY-CSA-MTX	46 (2-4)	15	6	33	66
Van Besien	113	L bajo grado	Varios	27	66	40	49 (3)	49 (3)
Branson	38	SLP	Fluda-MF-CSA-MTX	21 (1-2)	15	16	50 (1)	53 (1)
Van Besien	176	LF	Varios			24	45 (5)	51 (5)
Caballero	38	LNH	Fluda-MF-CSA-MTX	42 (2-4)	75	36	44 (164 d)	50

SLP: supervivencia libre de progresión; LF: linfoma folicular; EICH: enfermedad injerto contra huésped; EICHA: enfermedad injerto contra huésped aguda; EICHC: enfermedad injerto contra huésped crónica; MRT: mortalidad relacionada con el trasplante; SLE: supervivencia libre de enfermedad; SG: mediana de supervivencia; LNH: linfoma no hodgkiniano; LLC: leucemia linfocítica crónica; SLP: supervivencia libre de progresión.

ciente o por la infusión posterior de linfocitos del donante (ILD)²⁹.

Los datos de los alotrasplantes con acondicionamientos no mieloablativos se muestran en la tabla 3. La primera prueba publicada por Khoury et al³⁰ incluían a pacientes con neoplasias linfoides diferentes en distintos estadios, pero claramente mostraron que la toxicidad precoz era menor que en los alotrasplantes convencionales y que se podía obtener una respuesta con una mortalidad tóxica del 10%. El grupo español ha tratado a 38 pacientes con LNH de mal pronóstico con un régimen de preparación basado en la fludarabina y el melfalán. La incidencia de EICH aguda grados II-IV fue del 42% y la de EICH crónica fue del 75%, la mayoría de las veces era extensa. Con una mediana de seguimiento muy corta (164 días) la SG y SLE fueron del 50 y 44%, con una mortalidad tóxica del 35%³¹.

En una revisión de unas 40 publicaciones se consiguió reunir a 368 pacientes con diferentes subtipos de neoplasias linfoides, la mayoría eran LNH, alotrasplantados con un régimen de preparación no mieloablativo, muchos de los cuales tenían un linfoma refractario y se incluían a pacientes que habían recaído después de un autotrasplante. Se consiguió una respuesta en el 66,3% de los casos, que en la mayoría de las ocasiones fue completa. En muchos de los estudios no se pudo valorar la respuesta porque los períodos de seguimiento eran cortos; sin embargo, se han descrito remisiones prolongadas, incluso moleculares, lo que hace pensar que el efecto ICL podría ser necesario para la curación de algunos linfomas. La mortalidad tóxica fue del 15,5% y la EICH fue la complicación mayor observada⁷.

Los criterios más aceptados para realizar un minialotrasplante en pacientes con un LF son: disponer de un donante hermano, tener una edad inferior a 65 años y tener una enfermedad refractaria primaria o una primera recaída después de una respuesta inicial inferior al año, o una primera recaída con fa-

llo del tratamiento de rescate, o una recaída después de un autotrasplante, o una segunda o posteriores recaídas. Pero debemos tener presente que el minialotrasplante es también un alotrasplante y que, consecuentemente, existe EICH (o primariamente o como consecuencia del ILD) en hasta el 40% de los pacientes.

Efectos secundarios de las altas dosis de quimioterapia

La toxicidad más importante a largo plazo de los autotrasplantes son las segundas neoplasias y los síndromes mielodisplásicos/leucemia mieloblástica aguda (SMD/LMA)³². La incidencia de SMD fue inicialmente estimada en un 5% y no parece ser más alta de la esperada después de un QT convencional en un estudio caso-control³². Sin embargo, en un estudio posterior de 552 pacientes autotrasplantados por un LNH, la tasa actuarial era del 15% a los 5 años utilizando un régimen mieloablativo de CF + ICT y un injerto medular purgado con AcMo³³. La incidencia de SMD fue del 7,4% y la tasa actuarial a los 10 años fue del 19,8%. Los pacientes que desarrollaron SMD habían recibido un número de CPH más bajo ($p = 0,0003$). La SG de los pacientes diagnosticados de SMD fue de 9,4 meses³³. El pronóstico de estos pacientes es muy malo.

Sin embargo, para estimar la probabilidad de un hecho particular en presencia de otros acontecimientos competitivos, la metodología actuarial falla, ya que la incidencia de las curvas resultantes puede ser interpretada como probabilidad, en la situación hipotética de que los riesgos competitivos pudieran ser eliminados³. Si el evento es SMD/LMA, el método de Kaplan-Meier produciría una probabilidad sobreestimada de SMD/LMA en la situación hipotética de que el riesgo de muerte hubiera sido completamente eliminado. La tasa cruda es también estadísticamente errónea desde que no hay acontecimientos para los censurados dentro de los años

de seguimiento y así lleva a una subestimación. Para permitir que existan los censurados, la tasa de SMD/LMA tiene que ser evaluada con la SG que lleva a una mejor estimación de la tasa de incidencia acumuladas. Además, para evaluar los factores pronósticos de los LF al diagnóstico, los investigadores deben también concentrarse en los factores que ocasionan toxicidad a largo plazo. La probabilidad de desarrollar un SMD aumenta con las dosis QT y RT acumuladas³⁴. Se sabe que los regímenes de acondicionamiento que incluyen ICT aumenta el riesgo del SMD, por lo que los investigadores necesitarán desarrollar regímenes menos tóxicos, pero la cuestión que permanece es si los SMD resultan como consecuencia del daño previo ocasionado en las células reinfundidas o es debido directamente al régimen de acondicionamiento.

Conclusiones

El tratamiento de los LF es una de las cuestiones más controvertidas en el tratamiento de las neoplasias hematológicas. El uso racional de las altas dosis de quimioterapia (ADQ) en el tratamiento de los linfomas se basa en el hecho de que los pacientes que recaen continúan respondiendo a otros tratamientos de rescate. Las ADQ seguidas de un autotrasplante han sido eficaces para el tratamiento de los LNH agresivos en recaída. Cuando el mismo enfoque terapéutico se aplica a los LF, la respuesta no es concluyente y se requerirán controles del seguimiento muy largos y estudios aleatorizados para conocer el impacto del trasplante en estos pacientes.

Otras cuestiones que se deben tener presentes y que puede ayudarnos a sentar la indicación de un trasplante son, por un lado el hecho bien conocido de que cuanto mayor sea el número de recaídas, menor será la respuesta y más corta su duración y, por otro, que con el paso del tiempo aumenta el riesgo de transformación histológica. Los resultados del trasplante en estas diferentes categorías en estudios no aleatorizados proporcionan alguna evidencia de mejoría de la supervivencia. En los pacientes quimiosensibles que tienen una médula ósea o sangre periférica normal en el momento de la colecta de CPH, se pueden conseguir remisiones clínicas y moleculares. La respuesta molecular representa la mejor forma de valorar la eficacia de un tratamiento, por lo que la monitorización molecular de la enfermedad debe formar parte de los controles estándar.

A pesar de los progresos logrados, las recaídas tardías muestran claramente que el autotrasplante no es una opción curativa en estos pacientes. Por esta razón y apoyándose en el efecto ICL, se ha incrementado el número de los alotrasplantes en estos pacientes. Para reducir la mortalidad y poder realizar estos trasplantes en pacientes por encima de los 50 años se utilizan, cada vez más, los acondicionamientos no mieloablativos como forma de prepa-

ración para el alotrasplante. Los minitrasplantes constituyen una forma de tratamiento experimental sobre el que hay depositadas muchas esperanzas.

Por último, un problema mayor descrito después de los autotrasplantes es el desarrollo de segundas neoplasias, principalmente en los pacientes con una larga supervivencia. No se conoce con certeza el papel que desempeñan los tratamientos recibidos por el paciente antes del trasplante pero se sabe que la ICT es un factor predisponente para el desarrollo de los síndromes mielodisplásicos.

Bibliografía

- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting — Airlie House, Virginia, November 1977. *J Clin Oncol* 1999;17:3835-49.
- Armitage JO, Weisenburger DD. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. *J Clin Oncol* 1998;16:2780-95.
- Mounier N, Socié G, Gisselbrecht C. High-dose therapy for indolent lymphoma. *Cri Rev Oncol/Hematol* 2002;41:225-39.
- Hunault-Berger M, Ifrah N, Solal-Celigny P. Intensive therapies in follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 2002;100:1141-52.
- Horning SJ. Treatment approaches to the low-grade lymphomas. *Blood* 1994;83:881-4.
- Bishop MR. The graft-versus-lymphoma effect: fact, fiction or opportunity? *J Clin Oncol* 2003;20:3713-5.
- Kogel KE, McSweeney PA. Reduced-intensity allogeneic transplantation for lymphoma. *Curr Opin Oncol* 2002;14:475-83.
- Gribben JG, Neuberg D, Freedman AS, et al. Detection by polymerase chain reaction of residual cells with the bcl-2 translocation is associated with increased risk of relapse after autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. *Blood* 1993;81:3449-57.
- Federico M, Vitolo U, Zinzani PL, et al. Prognosis of follicular lymphoma: A predictive model based on a retrospective analysis of 987 cases. *Blood* 2000;95:783-9.
- López-Guillermo A, Cabanillas F, McLaughlin P, et al. The clinical significance of molecular response in indolent follicular lymphomas. *Blood* 1998;91:2955-60.
- Solal-Celigny P, et al. Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood* 2004 (In press).
- Freedman AS, Neuberg D, Mauch P, et al. Long-term follow-up of autologous bone marrow transplantation in patients with relapsed follicular lymphoma. *Blood* 1999;94:3325-33.
- López-Guillermo A, Cabanillas F, McDonnell TI, et al. Correlation of Bcl-2 rearrangement with clinical characteristics and outcome in indolent follicular lymphoma. *Blood* 1999;93:3081-7.
- Kosmas C, Stamatopoulos K, Stavroyianni N, et al. Anti-CD20-based therapy of B cell lymphoma: State of the art. *Leukemia* 2002;16:2004-15.
- Johnson PWM, Rohatiner AZS, Whelan JS. Patterns of survival in patients with recurrent follicular lymphoma: A 20 year study from a single center. *J Clin Oncol* 1995;13:140-7.
- Bastian Y, Sebban C, Berger F, et al. Incidence, predictive factors, and outcome of lymphoma transformation in follicular lymphoma patients. *J Clin Oncol* 1997;15:1587-94.
- Majolino I, Pearce R, Taghipour G, Goldstone AH. Peripheral blood stem-cell transplantation versus autologous bone marrow transplantation in Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas: A new matched-pair analysis of the European Group for Blood and Marrow Transplantation Registry Data. *Lymphoma Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. J Clin Oncol* 1997;15:509-17.
- Bierman PJ, Vose JM, Anderson JR, Bishop MR, Kessinger A, Armitage JO. High-dose therapy with autologous hematopoietic rescue for follicular low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 1997;15:445-50.
- Horning S, Negrin R, Hoppe R, et al. High-dose therapy and autologous bone marrow transplantation for follicular lymphoma in first complete or partial remission: Results of a phase II clinical trial. *Blood* 2001;97:404-9.
- Freedman AS, Gribben JG, Neuberg D, et al. High-dose therapy and autologous bone marrow transplantation in patients with follicular lymphoma during first remission. *Blood* 1996;88:2780-6.
- Gribben JG, Freedman AS, Neuberg D, et al. Immunologic purging of marrow assessed by PCR before autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 1991;325:1525-33.
- Robinson SP, Goldstone AH, Mackinnon S, et al. Chemoresistant or aggressive lymphoma predicts for a poor outcome following reduced-intensity allogeneic progenitor cell transplantation: an analysis from the Lymphoma Working Party of the European Group for Blood and Bone Marrow Transplantation. *Blood* 2002;100:4310-6.

23. Van Besien KW, Mehra RC, Giral SA, et al. Allogeneic bone marrow transplantation for poor-prognosis lymphoma: Response, toxicity, and survival depend on disease histology. *Am J Med* 1996;100:299-307.
24. Peniker AJ, Ruiz de Elvira MC, Taghipour G, et al. An EBMT registry matched study of allogeneic stem cell transplants for lymphoma: allogeneic transplantation is associated with a lower relapse rate but a higher procedure-related mortality rate than autologous transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2003;31:667-78.
25. Verdonck LF, Dekker AW, Lokhorst HM, et al. Allogeneic versus autologous bone marrow transplantation for refractory and recurrent low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997;90:4201-5.
26. Van Besien K, Loberiza FR, Bajorunaite R, et al. Comparison of autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for follicular lymphoma. *Blood* 2003;102:3521-9.
27. Slavin S, Nagler A, Naparstek E, et al. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood* 1998;91:756-63.
28. Giral S, Estey E, Albitar M, et al. Engraftment of allogeneic hematopoietic progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy: Harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy. *Blood* 1997;89:4531-6.
29. Conde E. Trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas con acondicionamiento de intensidad reducida. Un paso más hacia la curación por métodos inmunológicos. *Med Clin (Barc)* 2001;116:577-9.
30. Khouri IF, Keating M, Korbling M, et al. Transplant-lite: Induction of graft-versus-malignancy using fludarabine-based nonablative chemotherapy and allogeneic blood progenitor cell transplantation as treatment for lymphoid malignancies. *J Clin Oncol* 1998;16:2817-24.
31. Caballero MD, Martino R, León A, et al. Non myeloablative allogeneic related transplant in patients with bad prognosis non-Hodgkin's lymphoma: A multicenter cooperative study. *Blood* 2003;102:707a (abstr. 2615).
32. André M, Henry-Amar M, Blaise D, et al. Treatment-related deaths and second cancer risk after autologous stem-cell transplantation for Hodgkin's disease. *Blood* 1998;92:1933-40.
33. Friedberg JW, Neuberger D, Stone RM, et al. Outcome in patients with myelodysplastic syndrome after autologous bone marrow transplantation for non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 1999;17:3128-35.
34. Mounier N, Gisselbrecht C, Friedberg JW, Neuberger D, Freedman AS. Myelodysplasia after autotransplantation. *J Clin Oncol* 2000;18:3446-7.

APOSTOSIS: MECANISMOS CELULARES E IMPLICACIONES CLÍNICAS

COORDINADORA: N. VILLAMOR. *Unidad de Hematopatología, Hospital Clínic, Barcelona*

Resumen del simposio

La muerte celular programada es un proceso biológico imprescindible para el correcto desarrollo y funcionamiento del organismo. Apoptosis es el término que describe la forma más frecuente de muerte celular programada y deriva de las características morfológicas de este tipo de muerte por suicidio celular. La apoptosis está altamente controlada para mantener la homeostasis en el organismo, ya que los desajustes, tanto por incremento de la apoptosis como por su defecto, conllevan diferentes tipos de enfermedades. En los últimos años se ha avanzado en el conocimiento de las rutas que inician, transmiten, regulan y ejecutan la apoptosis. El primer ponente, el Dr. Javier Naval, revisará el conocimiento actual de las rutas celulares y mecanismos que desencadenan la apoptosis, las vías de transmisión intracelulares y los componentes celulares que regulan la acción de los principales elementos proapoptóticos y antiapoptóticos, cuyo balance final determinará el devenir de la célula. En el sistema hematopoyético, especialmente en la linfopoyesis, la apoptosis tiene un papel muy importante. Los linfocitos T y B son seleccionados en momentos clave de su diferenciación y maduración para evitar fenómenos de autorreactividad inmunológica. El Dr. Óscar de la Calle analizará los mecanismos de apoptosis durante la linfopoyesis. Además, expondrá las características clinicobiológicas de los denominados síndromes linfoproliferativos autoinmunes, que son el resultado de mutaciones en genes claves de la apoptosis.

En la segunda parte del simposio se pretende revisar el conocimiento actual de las anomalías en las rutas de apoptosis en los síndromes linfoproliferativos crónicos y en las leucemias agudas. Los avances producidos en los últimos años han puesto de manifiesto que dichas enfermedades presentan alteraciones en la regulación de las rutas de apoptosis. Este hecho adquiere mayor relevancia si se tiene en cuenta que la mayoría de estrategias terapéuticas actualmente en uso se basan en la inducción de apoptosis. Por todo ello, el conocimiento de cuál es el estado funcional de las rutas de apoptosis en estas enfermedades y cómo influyen tales rutas en la respuesta terapéutica es un campo de enorme interés. Quizás es en los síndromes linfoproliferativos crónicos donde se ha implicado más directamente las alteraciones en la apoptosis con el desarrollo de las mismas. La Dra. Colomer revisará las vías de inducción de apoptosis y las características celulares que modifican la respuesta a los fármacos en los síndromes linfoproliferativos crónicos, especialmente en la leucemia linfática crónica y en el linfoma de células del manto. También hablará de los análisis de citotoxicidad *in vitro* a los agentes terapéuticos, un tipo de estudio que abre perspectivas para la búsqueda de nuevos fármacos activos en dichas enfermedades que permitan un tratamiento ajustado a cada paciente. Finalmente, el Dr. Ludwig expondrá las anomalías en la apoptosis observadas en enfermos con leucemias agudas, así como el valor pronóstico de los diferentes componentes que regulan la apoptosis en el momento del diagnóstico. Así mismo, comentará el valor de los estudios funcionales para predecir la resistencia al tratamiento y el empleo de nuevos fármacos antileucémicos dirigidos contra elementos reguladores de la apoptosis.

MECANISMOS CELULARES DE MUERTE CELULAR PROGRAMADA

J. NAVAL, I. MARZO Y A. ANEL

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Universidad de Zaragoza. Zaragoza.

Muerte celular programada o apoptosis

La muerte celular programada es un proceso biológico fundamental por el que las células que han finalizado su función o no son necesarias para el organismo, se suicidan. Esta muerte en el lugar y tiempo adecuado es esencial para mantener constante el número de células de un tejido, actuando como contrapunto imprescindible a los procesos proliferativos. La muerte celular programada es un proceso universalmente conservado en todos los eucariotas multicelulares y tiene lugar tanto durante el desarrollo como a lo largo de la vida adulta, controlando en todo momento la correcta homeostasis tisular. El desajuste de este proceso al alza está asociado con patologías graves, como las enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer), cardiovasculares (muerte celular tras isquemia) o inmunodeficiencias (sida). Por otro lado, un déficit de apoptosis supone la supervivencia anómala de células con diferenciación incompleta o defectuosas. Este es el caso de las enfermedades autoinmunes y diversos tipos de leucemias. La muerte celular programada tiene lugar en la inmensa mayoría de los casos por apoptosis. Este término fue acuñado¹ para describir las peculiares características de las células que morían espontáneamente durante el desarrollo tales como la generación de burbujas celulares (*blebbing*), la condensación de la cromatina y la translocación de fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmática. Esto último convierte a las células apoptóticas en apetitosas para los macrófagos que las ingieren rápidamente. Por ello, el número de células apoptóticas detectables en un tejido en un momento dado es muy reducido, aunque hayan muerto en gran cantidad. Además, al no producirse liberación al exterior del contenido celular, no se produce respuesta inflamatoria y todo ello ha contribuido a que la apoptosis pasara desapercibida hasta hace pocos años. A principios de la década de 1990 se identificaron los genes que controlaban la ejecución (*ced-3*, *ced-4*) y la inducción (*ced-9*, *egl-1*) de la apoptosis en el gusano *Caenorhabditis elegans*². En 1993 se descubrió que el oncogén *bcl-2*, activado por la translocación cromosómica t(14;18) en el linfoma folicular³, era el homólogo de *ced-9*, el inhibidor de la apoptosis en *C. elegans*. En 1995 se clonó el homólogo humano del *ced-3*, conocido actualmente como caspasa 3⁴ y a partir de entonces se ha producido un avance vertiginoso en el estudio de la apoptosis. Recientemente los estudios básicos sobre la apoptosis han merecido la concesión del Premio Nobel.

Rutas y mecanismos de apoptosis

En los mamíferos existen dos vías principales de inducción de apoptosis:

1. La ruta apoptótica mitocondrial, también denominada *vía intrínseca*.
2. La apoptosis inducida por receptores mortales, también denominada *vía extrínseca*.

Ruta intrínseca o mitocondrial

En esta vía, la más conservada evolutivamente, desempeña un papel clave la mitocondria. Distintos agentes físicos o químicos que causan daño celular como fármacos quimioterápicos, radiaciones ionizantes, neurotoxinas, estrés térmico u oxidativo, etc., tras alterar vías de señalización particulares producen la activación de proteínas de la superfamilia Bcl-2 que inducen la apoptosis actuando sobre las mitocondrias. En última instancia, dos de estas proteínas, Bax y/o Bak provocan la pérdida del potencial mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), y la ejecución de la apoptosis, que conlleva la salida de varias proteínas (citocromo c, Smac/Diablo, AIF, Endo G) de las mitocondrias y la activación citosólica de proteasas (caspasas) (fig. 1).

Proteínas de la superfamilia Bcl-2

El primer miembro identificado fue la proteína antiapoptótica Bcl-2. Se conocen actualmente unas 20 proteínas de esta superfamilia, unas con función antiapoptótica y otras proapoptótica. Todas ellas poseen al menos uno de los cuatro dominios que aparecen en Bcl-2, denominados BH1-BH4 (Bcl-2

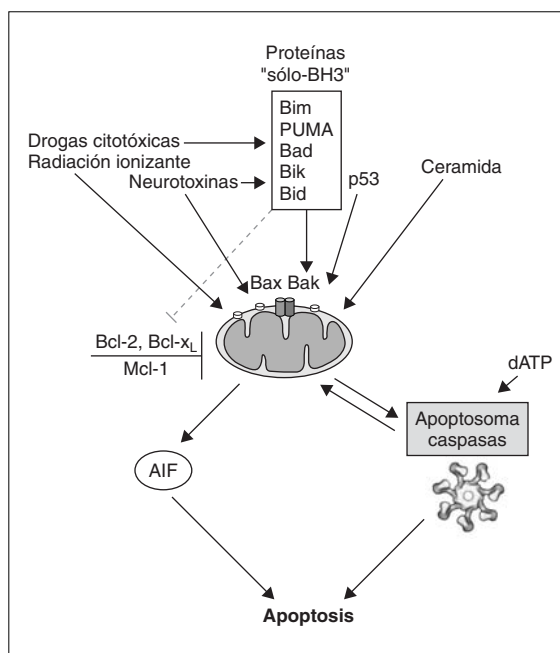


Figura 1. Ruta de apoptosis intrínseca o mitocondrial.

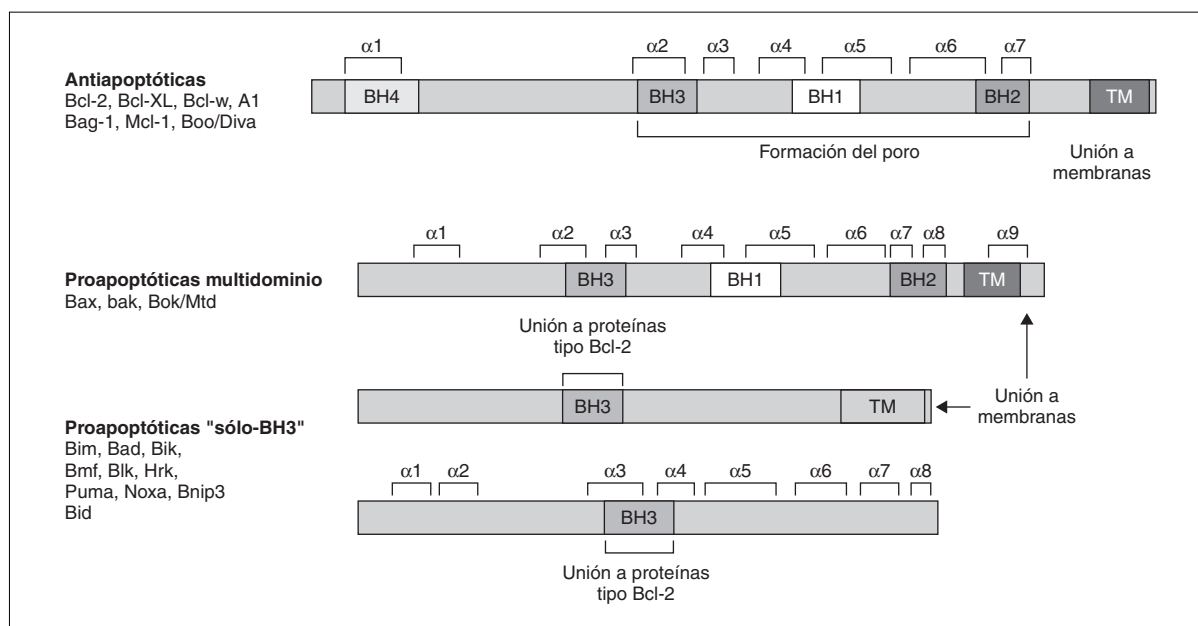


Figura 2. Estructura y tipos de la superfamilia de proteínas Bcl-2.

Homology) (fig. 2). Los miembros de esta familia se pueden subdividir en tres grupos de acuerdo con su estructura y función: *a*) proteínas antiapoptóticas: Bcl-2 y sus homólogos, Bcl-x_L, y Mcl-1 inhiben la apoptosis inducida por muchos estímulos citotóxicos y esta capacidad parece residir en el dominio BH4. Su dominio hidrofóbico C-terminal facilita su inserción en la membrana externa mitocondrial⁵. La cavidad hidrofóbica formada por residuos de los dominios BH1, BH2 y BH3 puede interactuar con la hélice α del dominio BH3 de una proteína "sólo-BH3"⁶. Las células hematopoyéticas y tejidos linfoides suelen expresar niveles elevados de Mcl-1, que se considera un factor importante de supervivencia en células de leucemia⁷ y mieloma⁸. *b*) Proteínas proapoptóticas multidominio: los miembros de esta subfamilia (Bax, Bak, Mtd) poseen los dominios BH1, BH2 y BH3, pero no el BH4. Bax y Bak están presentes en la mayoría de tejidos y durante la apoptosis forman un canal por el que sale de la mitocondria el citocromo c. La inactivación simultánea de los genes de Bax y Bak, pero no la de uno de ellos, bloquea la apoptosis⁶. En células viables, Bax es un monómero localizado preferentemente en el citosol, mientras que Bak es una proteína de la membrana externa mitocondrial⁶. *c*) Proteínas "sólo-BH3": se han identificado unas 10 proteínas de esta subfamilia (Bim, Bad, Bid, Bik, Hrk, PUMA, Noxa, etc.) (fig. 3) que se caracterizan por poseer sólo el dominio BH3, de 9 aminoácidos, que es necesario y suficiente para inducir apoptosis. Las proteínas "sólo-BH3" no pueden ejercer su acción apoptótica en ausencia de Bax y Bak⁶, lo que sugiere que su diana principal son estas proteínas. Recientemente⁹ se

ha propuesto un mecanismo para explicar la actuación de las proteínas "sólo-BH3" en la apoptosis. Estas proteínas funcionarían como sensores del daño celular y su activación constituiría la primera etapa de la apoptosis mitocondrial. Dependiendo de características moleculares peculiares de sus respectivos dominios BH3, éstas proteínas se pueden clasificar en dos subgrupos. Uno de ellos, las llamadas de "tipo Bad" (Bad, Bik) no se unirían a Bax y/o Bak sino que interactuarían e inactivarían a las proteínas antiapoptóticas Mcl-1, Bcl-2, Bcl-x_L. El otro grupo, denominado "tipo Bid" (tBid, Bim), podría interactuar tanto con Mcl-1, Bcl-2 o Bcl-x_L, con lo que inactivarían su acción protectora, como con Bax y Bak, induciendo en este último caso su oligomerización y la formación de poros en la membrana externa mitocondrial. Según este modelo, la unión de proteínas "tipo Bad" a Bcl-2/Bcl-x_L/Mcl-1 liberaría a las proteínas "tipo Bid" que quedarían disponibles para unirse a Bax/Bak, lo que causaría su oligomerización y la subsiguiente caída del potencial mitocondrial y la liberación de citocromo c y otras proteínas apoptogénicas del espacio intermembrana mitocondrial. Cada una de las proteínas "sólo-BH3" estaría implicada en la transducción de señales mortales específicas y/o en el control de la homeostasis en determinados tejidos. Por ejemplo, Bim participa en la apoptosis inducida en linfocitos por la privación de citoquinas⁶. La actividad de Puma y Noxa⁶ es inducida por p53 por lo que parecen estar implicadas en la respuesta al daño al ADN. Bid participa en la apoptosis inducida por receptores mortales, como se describe más adelante. Bad y Hrk están implicados en la apoptosis inducida por privación de factores

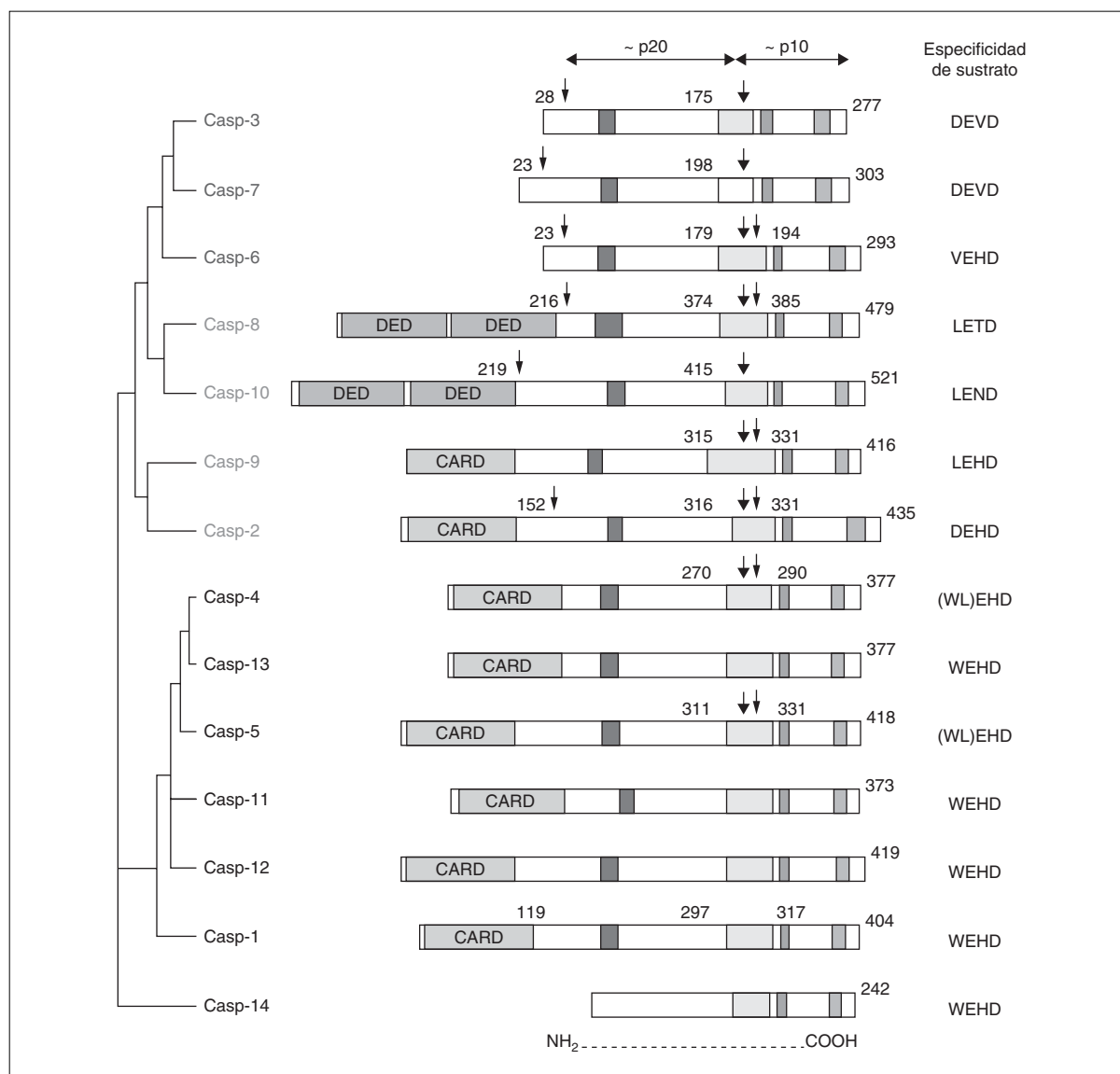


Figura 3. Estructura de los miembros de la familia de las caspasas en mamíferos.

de crecimiento⁶ y Bik participa en la apoptosis inducida por ligación de IgM en células B¹⁰.

Ejecución de la apoptosis: caspasas

Como consecuencia de la acción secuencial de las proteínas sólo-BH3 y de Bax/Bak se produce la liberación al citosol de citocromo c desde el espacio intermembranas mitocondrial. El citocromo c se une entonces a la proteína adaptadora Apaf-1 que oligomeriza formando un gran complejo heptamérico (1,4 MDa) llamado apoptosoma¹¹ que recluta, a través de sus dominios CARD, a una cisteín-proteasa llamada caspasa 9. Su unión al apoptosoma causa un cambio conformacional en la caspasa 9 lo que provoca su activación y el inicio una serie de reacciones proteolíticas conocidas como la “cascada de las cas-

pasas” (fig. 3). Las caspasas activas ocasionan la rotura controlada de proteínas y estructuras celulares, desmontando ordenadamente la célula y dando lugar al fenotipo apoptótico. Las caspasas (cisteín-proteasa con especificidad de corte en aspártico) son por tanto, las principales ejecutoras de la apoptosis. Se han identificado once caspasas en la especie humana (Casp1-10, 14) (fig. 3), de las cuales al menos ocho se han implicado en la apoptosis¹¹. Todas las caspasas comparten similitudes en su secuencia de aminoácidos, estructura y especificidad por el sustrato. Las caspasas reconocen secuencias de al menos cuatro aminoácidos y cortan siempre en el extremo carboxilo de un residuo de Asp. Las caspasas son sintetizadas como zimógenos inactivos que contienen tres dominios: el prodominio N-terminal y las subunidades en-

Tabla 1. Principales ligandos y receptores mortales

Ligando	Receptores
TNF	TNFR1(55kDa), TNFR2(75kDa)
FasL/Apo-1L/CD95L	Fas/APO-1/CD95 DcR3
Apo2L/TRAIL	DR4, DR5 DcR1/DcR2
TL1A	DR3/Apo3 DcR3
?	DR6

TNF: factor de necrosis tumoral; DR: Death Receptor (receptor mortal con "dominio mortal" DD); DcR: Decoy Receptor, receptor no funcional (receptor señuelo o de despiste).

zimáticas grande y pequeña. Con excepción de la caspasa 9, que parece activarse por cambio conformacional, las caspasas se activan por proteólisis en dos fases: la primera divide la cadena en las subunidades grande (≈ 20 kDa) y pequeña (≈ 10 kDa), y en el segundo corte se elimina el prodominio N-terminal (fig. 3). La caspasa activa consiste en un heterotetramero formado por dos subunidades grandes y dos pequeñas, conteniendo por tanto dos sitios activos de catálisis¹¹. Las caspasas apoptóticas que poseen un prodominio grande se denominan iniciadoras (caspasas 2, 4, 8, 9 y 10). Las caspasas iniciadoras poseen prodominios CARD (Caspase Activation Recruitment Domain), como las caspasas 2 y 9, o prodominios DED (Death Efector Domain) como las caspasas 8 y 10. Este prodominio les permite interactuar con proteínas adaptadoras con dominios homólogos lo cual causa generalmente su activación por autoproteólisis. Los principales sustratos de las caspasas iniciadoras suelen ser las caspasas con prodominio pequeño, conocidas como caspasas ejecutoras (caspasas 3, 6 y 7). Estas últimas son las que desmontan las estructuras celulares, hacen apetitosa a la célula para los macrófagos y dan lugar al fenotipo apoptótico. Por ejemplo, la caspasa 3 rompe a la proteína inhibidora de CAD (DNasa Activada por Caspasas) con lo que CAD realiza la degradación oligonucleosomal del ADN (patrón en "escalera") típica de la apoptosis. La mayoría de las caspasas se localizan en el citoplasma, excepto la caspasa 2¹² que se encuentra en el núcleo y la caspasa 4 que se localiza en el retículo endoplásmico¹³.

Además de citocromo c, las mitocondrias de las células en apoptosis liberan la proteína Smac/Diablo. Smac/Diablo se une a unas proteínas citosólicas llamadas IAP (Inhibitors of Apoptosis) que son inhibidores endógenos de las caspasas. Smac/Diablo anula así la posible acción inhibidora de los IAP sobre las caspasas, permitiendo su activación y actividad¹¹. Por otro lado, la despolarización de la mitocondria produce también la liberación del Factor Inductor de Apoptosis (AIF) y de la endonucleasa Endo G. La proteína AIF se transloca al núcleo don-

de induce la condensación periférica de la cromatina y la hidrólisis del ADN en fragmentos de alto peso molecular (~ 50 Kpb)¹⁴. El mecanismo de acción de AIF es aún desconocido, aunque se sabe que su acción es independiente de caspasas y que podría colaborar con Endo G¹⁵. Aunque AIF actúa en la mayor parte de los procesos apoptóticos regulados por la mitocondria, lo hace al mismo tiempo que las caspasas y en la mayoría de los casos su acción sólo se pone de manifiesto cuando éstas están inhibidas¹⁴.

Apoptosis mediada por receptores (vía extrínseca)

En esta vía la apoptosis se induce tras la unión de una proteína extracelular (mensajero mortal) a su receptor (receptor mortal). Los receptores mortales poseen en su región intracelular el denominado dominio mortal (DD), necesario para la transmisión de la señal de muerte. Los receptores mortales pertenecen a la superfamilia del receptor del TNF (tabla 1). La ruta mejor conocida es la iniciada por el ligando de Fas (FasL), una proteína de membrana de unos 40 kDa que induce apoptosis tras su unión a su receptor, Fas. En los linfocitos citotóxicos de ratón, FasL se expresa de forma transitoria en la membrana plasmática¹⁶. Sin embargo, en los linfocitos y otras células humanas, FasL es acumulado en el citoplasma en cuerpos multivesiculares y secretado al exterior celular insertado en microvesículas¹⁷. Tras su ligación y oligomerización, Fas se une a la proteína adaptadora FADD a través de su dominio mortal. FADD a su vez, a través de su dominio DED, se une a la caspasa 8 (fig. 4). La unión de varias moléculas de caspasa 8 a éste complejo de proteínas asociado a Fas ocasiona su autoactivación proteolítica. Una vez activa, la caspasa 8 activa a la caspasa 3, que ejecuta la apoptosis cortando diversas proteínas celulares. En ciertos tipos celulares, y debido posiblemente a deficiencias funcionales en la activación de la caspasa 8, tiene lugar una ruta indirecta a través de la proteólisis de la proteína "sólo-BH3" Bid por la caspasa 8. La forma trunca de Bid (tBid) conecta entonces con la vía mitocondrial que produce la liberación de citocromo c y la activación de caspasas ejecutoras (fig. 4).

Apoptosis inducida por los linfocitos citotóxicos

Los linfocitos citotóxicos (CTL y NK) constituyen la defensa primordial del organismo contra las infecciones virales y el desarrollo tumoral. Estos linfocitos, a través de receptores de superficie, reconocen a las células infectadas o transformadas, lo cual inicia su proceso de activación, que culmina con la eliminación de la célula "diana", normalmente por apoptosis¹⁸. La citotoxicidad depende de dos mecanismos que conectan con las dos principales vías de apoptosis celular. Un mecanismo se basa en la exocitosis de gránulos preformados que contienen proteínas tóxicas (perforina, granzimas A y B, granulinsina) y el otro depende de la expresión de FasL en el

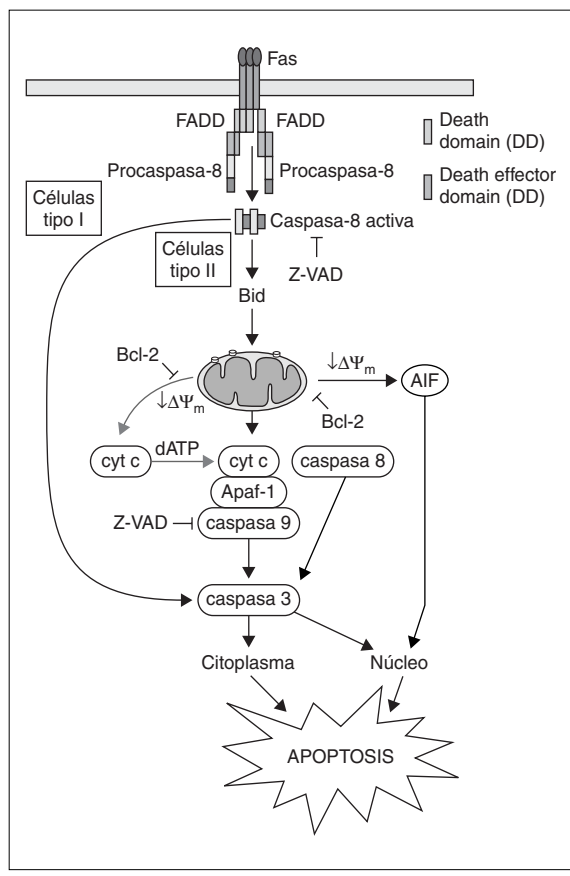


Figura 4. Ruta de apoptosis intrínseca o de los mensajeros mortales.

linfocito y de Fas en la célula diana. Este último mecanismo se ha descrito en la sección anterior. En el caso de la vía dependiente de exocitosis granular, la proteína formadora de poros perforina (Perf) permite el acceso al citosol de la célula diana de las granzimas, proteasas que inducen apoptosis. La granzima B (GzmB) es capaz de procesar y activar a la caspasa 3¹⁹. Además, se ha descrito recientemente que la GzmB puede inducir apoptosis a través de la vía mitocondrial. No obstante, existe una controversia acerca de si esta vía se inicia mediante el procesamiento por la GzmB de cantidades limitadas de caspasa 3²⁰ o de la proteína Bid²¹. También se discute si la contribución de la vía mitocondrial consiste en la amplificación de la cascada de caspasas a través de la activación de la caspasa 9²⁰ o la reversión de la inhibición de la caspasa 3 por parte de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) a través de la liberación de Smac/DIABLO de la mitocondria²². Datos muy recientes de nuestro laboratorio indican que la apoptosis inducida por el sistema Perf/GzmB se inicia mediante el procesamiento de cantidades limitadas de caspasa 3, la cual produce una caída transitoria del potencial mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), salida de citocromo c y activación de la caspasa 9. La caspasa 9 corta y activa a su vez a más caspasa 3, lo que provoca la fragmentación del ADN, la pérdida irreversible del $\Delta\Psi_m$ y amplifica la señal apoptótica. La apoptosis inducida por la GzmA es independiente de caspasas²³. Esta granzima procesa a diversas proteínas de un complejo localizado en el retículo endoplásmico (comple-

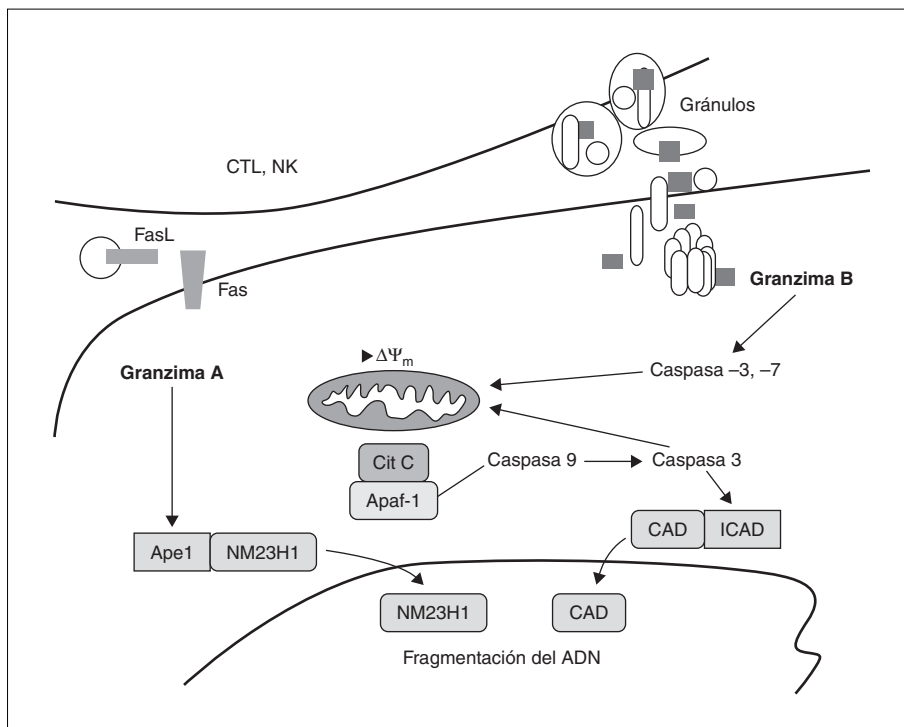


Figura 5. Apoptosis inducida por el sistema perforina/granzimas en células CTL y NK.

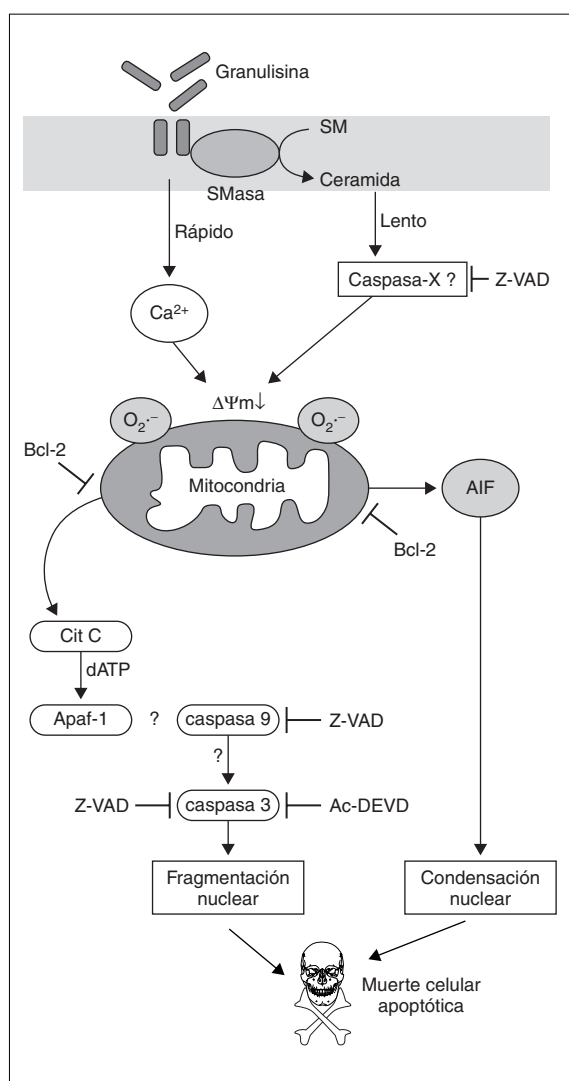


Figura 6. Apoptosis inducida por la granulicina.

jo SET). Este complejo incluye una DNasa, llamada NM23-H1, la cual se transloca al núcleo tras la acción de la GzmA, induciendo roturas de cadena sencilla en el ADN²⁴. Uno de los sustratos de la GzmA en el complejo SET es la enzima Ape1, la cual tiene actividad de reparación del ADN, contrarrestando la acción de NM23-H1²⁵ (fig. 5).

Otra proteína contenida en los gránulos de los CTL y NK humanos es la granulicina que causa citólisis en células tumorales, aunque su función más relevante parece ser la lisis directa de bacterias intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis*²⁶. La granulicina interacciona con los fosfolípidos de la membrana plasmática y forma un oligómero²⁷. Esta interacción activa a una esfingomielinasa que genera el mediador apoptótico ceramida. Sin embargo, ésta no es la principal vía activada por la granulicina, ya que ésta sigue siendo tóxica en células carentes de

esfingomielina²⁸. La granulicina también induce la producción de radicales superóxido en la mitocondria y el compuesto MnTBAP, que posee actividad superóxido dismutasa, inhibe la apoptosis inducida por la granulicina. Esta apoptosis se inhibe también por la sobreexpresión de Bcl-2 y esta asociada con una pérdida rápida del $\Delta\Psi_m$, independiente de caspasas. Tras la caída del $\Delta\Psi_m$, AIF se transloca de las mitocondrias al núcleo y éste parece ser el principal mecanismo ejecutor de la apoptosis inducida por la granulicina²⁹ (fig. 6).

Consideraciones finales

Las mitocondrias parecen ser en la mayoría de los casos el orgánulo clave en la inducción de apoptosis y controlan el llamado "punto de no retorno" en la muerte celular. En esta inducción desempeñan un papel determinante las proteínas proapoptóticas de la superfamilia Bcl-2 conocidas como "sólo-BH3". La elucidación precisa de su mecanismo de activación y actuación y la identificación de las proteínas "sólo-BH3" implicadas en la inducción de apoptosis, en cada uno de los tipos de particulares de neoplasias hematológicas, permitirá: a) refinar los criterios de pronóstico, y b) sentar las bases para el diseño racional de un tratamiento quimioterápico basado en datos moleculares precisos de cada tumor en particular. Asimismo, la identificación de las proteínas clave implicadas en las rutas de apoptosis de tipos celulares concretos, permitirá formular estrategias para diseñar tratamientos alternativos en células que muestren resistencia a un cierto tipo de fármacos, mediante agentes que activen las rutas aún operativas.

Bibliografía

- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 1972;26:239-57.
- Ellis RE, Horvitz HR. Two *C. elegans* genes control the programmed deaths of specific cells in the pharynx. *Development* 1991;112:591-603.
- Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 1984;226:1097-9.
- Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 1995;376:37-43.
- Krajewski S, Gascoyne RD, Zapata JM, Krajewska M, Kitada S, Chhanabhai M, et al. Immunolocalization of the ICE/Ced-3-family protease, CPP32 (Caspase-3), in Non-Hodgkin's lymphomas, chronic lymphocytic leukemias, and reactive lymph nodes. *Blood* 1997;89:3817-25.
- Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002;2:647-56.
- Iglesias-Serret D, Pique M, Gil J, Pons G, López JM. Transcriptional and translational control of Mcl-1 during apoptosis. *Arch Biochem Biophys* 2003;417:141-52.
- Derenne S, Monia B, Dean NM, Taylor JK, Rapp MJ, Harousseau JL, et al. Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells. *Blood* 2002;100:194-9.
- Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2002;2:183-92.
- Jiang A, Clark EA. Involvement of Bik, a proapoptotic member of the Bcl-2 family, in surface IgM-mediated B cell apoptosis. *J Immunol* 2001;166:6025-33.
- Shi Y. Apoptosome: The cellular engine for the activation of caspase-9. *Structure (Camb)* 2002;10:285-8.

12. Shikama Y, U M, Miyashita T, Yamada M. Comprehensive studies on subcellular localizations and cell death-inducing activities of eight GFP-tagged apoptosis-related caspases. *Exp Cell Res* 2001;264: 315-25.
13. Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y, Kudo T, Taniguchi M, Koyama Y, et al. Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and A β -induced cell death. *J Cell Biol* 2004;165: 347-356.
14. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999;397:441-6.
15. Wang X, Yang C, Chai J, Shi Y, Xue D. Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2002; 298:1588-92.
16. Anel A, Naval J, Desportes P, González B, Uriel J, Piñero A. Increased cytotoxicity of polyunsaturated fatty acids on human tumoral B and T-cell lines compared with normal lymphocytes. *Leukemia* 1992;6: 680-8.
17. Monleón I, Martínez-Lorenzo MJ, Monteagudo L, Lasiera P, Taulés M, Iturralde M, et al. Differential secretion of Fas Ligand- or APO2 Ligand/TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand-carrying microvesicles during activation-induced death of human T cells. *J Immunol* 2001; 167:6736-44.
18. Barry M, Bleackley RC. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* 2002;2:401-9.
19. Darmon AJ, Nicholson DW, Bleackley RC. Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature* 1995; 377:446-8.
20. Metkar SS, Wang B, Ebbs ML, Kim JH, Lee YJ, Raja SM, et al. Granzyme B activates procaspase-3 which signals a mitochondrial amplification loop for maximal apoptosis. *J Cell Biol* 2003;160:875-85.
21. Pinkoski MJ, Waterhouse NJ, Heibein JA, Wolf BB, Kuwana T, Goldstein JC, et al. Granzyme B-mediated apoptosis proceeds predominantly through a Bcl-2-inhibitable mitochondrial pathway. *J Biol Chem* 2001; 276:12060-7.
22. Goping IS, Barry M, Liston P, Sawchuk T, Constantinescu G, Michalak KM, et al. Granzyme B-induced apoptosis requires both direct caspase activation and relief of caspase inhibition. *Immunity* 2003;18:355-65.
23. Anel A, Gamen S, Álava MA, Schmitt VA, Pineiro A, Naval J. Inhibition of CPP32-like proteases prevents granzyme B- and Fas-, but not granzyme A-based cytotoxicity exerted by CTL clones. *J Immunol* 1997; 158:1999-2006.
24. Fan Z, Beresford PJ, Oh DY, Zhang D, Lieberman J. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell* 2003;112:659-72.
25. Fan Z, Beresford PJ, Zhang D, Xu Z, Novina CD, Yoshida A, et al. Cleaving the oxidative repair protein Ape1 enhances cell death mediated by granzyme A. *Nat Immunol* 2003;4:145-53.
26. Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, et al. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 1998;282:121-5.
27. Anderson DH, Sawaya MR, Cascio D, Ernst W, Modlin R, Krensky A, et al. Granulysin crystal structure and a structure-derived lytic mechanism. *J Mol Biol* 2003;325:355-65.
28. Gamen S, Anel A, Pineiro A, Naval J. Caspases are the main executioners of Fas-mediated apoptosis, irrespective of the ceramide signalling pathway. *Cell Death and Differentiation* 1998;5:241-9.
29. Pardo J, Pérez-Galán P, Gamen S, Marzo I, Monleón I, Kaspar AA, et al. A role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in granulysin-induced apoptosis. *J Immunol* 2001;167:1222-9.

APOPTOSIS DURANTE LA LINFOPOYESIS B Y T Y SUS ANOMALÍAS

O. DE LA CALLE MARTÍN

Servicio de Inmunología. Hospital de Sant Pau. Barcelona.

Introducción

La muerte de la célula es una parte vital en la vida de los organismos multicelulares, desempeñando importantes papeles en el desarrollo, la defensa y la homeostasis. En los animales, la mayoría de los fenómenos de muerte celular se llevan a cabo a través del proceso denominado apoptosis, especialmente cuando la muerte de la célula obedece a la fisiología normal.

Apoptosis se define por las características morfológicas de la célula que muere¹; en detalle, por la condensación de la cromatina, acompañada a menudo por la fragmentación del núcleo. La membrana del plasma queda deformada con la frecuente aparición de invaginaciones y extravasaciones (*blebs*), y la célula termina rompiéndose en pequeños fragmentos (*cuerpos apoptóticos*). La célula apoptótica y los cuerpos apoptóticos son rápidamente engullidos por las células fagocitarias, y el proceso de la muerte celular por apoptosis no desencadena una respuesta inflamatoria. Por lo tanto, la apoptosis existe como un mecanismo para hacer desaparecer células. Dichas células son eliminadas porque están dañadas o infectadas, porque se encuentran en exceso, porque no han pasado un test en su programa de desarrollo o incluso, porque su presencia ya no es necesaria para un determinado proceso fisiológico. En el sistema inmune, la apoptosis aparece en múltiples situaciones: en células sometidas a estrés o a las que se priva de factores del crecimiento, en linfocitos en desarrollo que no reordenan adecuadamente su receptor antigénico (receptor de la célula T [TCR] o inmunoglobulina, según el caso) o en aquellos linfocitos que expresan un receptor que no pasa los mecanismos de selección positiva o negativa, y también, en las células que se habían expandido en respuesta a un estímulo antigénico y que se encuentran en exceso, por nombrar solamente algunos ejemplos².

La importancia de la apoptosis en el sistema inmune fue presagiada por el concepto de *selección clonal*, el proceso mediante el cual los linfocitos, con los receptores antigénicos generados aleatoriamente, son eliminados del sistema si reconocen su antígeno específico en una fase temprana de su desarrollo. Este proceso, ahora llamado *selección negativa*, asegura que las células específicas no maduren si su antígeno está presente en el organismo, lo que permite la eliminación de las células autorreactivas e impide que se generalicen las reacciones autoinmunes.

La apoptosis es orquestada por la acción de un sistema de proteasas en la célula, las caspasas (cisteín-proteasas con especificidad para los residuos de aspártico). Cuando se activan las caspasas, éstas catabolizan sus sustratos específicos, ya sea activándolos o haciéndolos inactivos. Éstos originan los cambios morfológicos y fagocitarios asociados con la apoptosis, y también proporcionan directa o indirectamente los marcadores que indican que ha ocurrido la apoptosis. Las células que contienen caspasas activadas se pueden detectar mediante el uso del análisis de caspasas o con anticuerpos que detectan la forma activada de las caspasas. Además, las caspasas activan enzimas que causan cambios celulares que se detectan fácilmente, incluyendo la fragmentación del ADN (detectado por TUNEL) y la externalización de la fosfatidilserina (*phosphatidylserine*) en la membrana plasmática (detectada por la unión de la annexina V).

Apoptosis de los linfocitos en desarrollo

Las células T no maduras (timocitos) que no pueden generar un receptor antigénico funcional (TCR) o que no reciben las señales adecuadas a través de su receptor (TCR) mueren por un proceso referido comúnmente como muerte por negligencia (*death by neglect*). El mecanismo exacto de la muerte por negligencia sigue sin resolver; sin embargo, varios estudios recientes se han centrado en definir los mecanismos que sensibilizan los timocitos doble-positivos CD4+ CD8+ (DP) para su ulterior apoptosis. Apparentemente la sensibilidad a los glucocorticoides desempeña un papel importante. El destino último de una célula T no madura es determinado por las señales que recibe a través del TCR. Si la interacción entre el TCR y su ligando es débil, el timocito recibe una señal de supervivencia (selección positiva). Una señal fuerte acciona inmediatamente la apoptosis (selección negativa)^{4,5}. La base molecular de cómo las señales que generan supervivencia o muerte son distinguidas por el TCR sigue siendo un tema fundamental aún pendiente. Las moléculas de la familia del receptor de factor de necrosis tumoral (TNF) (FAS, CD30, TRAIL, TNFR) parecen tener un papel de menor importancia en la regulación de la apoptosis en células T en desarrollo. Por el contrario, los miembros de la familia Bcl-2 sí que tienen un papel fundamental en el proceso de la muerte de los timocitos por negligencia. La sobreexpresión de Bcl-2 o Bcl-xL protege a los timocitos de morir y aumenta la celularidad tímica (los timocitos DP CD4+ CD8+ presentan niveles disminuidos de Bcl-2). Un efecto similar tiene la anulación de los miembros pro-apoptóticos de la cascada (Bim, Bax o Bad). Sorprendentemente, la implicación del citocromo c mitocondrial no parece esencial en la muerte de los timocitos.

La muerte de los timocitos por mecanismos de selección negativa implica vías muy diferentes. La intensidad de la señal transmitida a través del TCR es el evento determinante en la decisión entre supervivencia y muerte (selección negativa), y la cascada de las MAP-quinasas, probablemente modulada por la molécula adaptadora Grb2, es el elemento determinante a nivel intracelular de esta decisión⁶. Estas señales de apoptosis podrían ser en buena parte independientes de la función de las caspasas.

En contraste con lo que ocurre en los timocitos, las respuestas apoptóticas de las células B en desarrollo tras la estimulación del receptor de la célula B (BCR) (inmunoglobulina de superficie) se parece notablemente a la muerte por negligencia. La señal a través del BCR produce la apoptosis de las células B maduras e inmaduras, salvo que se produzca una coestimulación a través de IL-4, CD40 ligando (CD40L) o BAFF (*B-cell activating factor*), de modo que la apoptosis de las células B refleja más bien la ausencia de una coestimulación adecuada. Bioquímicamente, la inhibición de la apoptosis se ha vinculado a la activación de NF-κB y a la vía de

PI3K⁶. Como es bien conocido, la vía mitocondrial de apoptosis desempeña un papel fundamental en la muerte y supervivencia de las células B, pero aún se desconoce cuáles son los elementos bioquímicos precisos que enlazan la señal del BCR y la respuesta mitocondrial.

Apoptosis de los linfocitos en periferia

La apoptosis de los linfocitos en periferia es muy diferente de la que ocurre en los órganos linfoides primarios (timo y médula ósea). En general, la mayoría de los linfocitos circulantes se encuentran en un estado quiescente (G0) y su supervivencia obedece a contactos transitorios con las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (en linfocitos T), la presencia de ciertas citoquinas (en particular, interleucina 7 [IL-7]) y la expresión de Bcl-2². Sin embargo, tras el contacto con el antígeno se produce una extraordinaria activación y expansión de algunas de esas células. El sistema inmune ha desarrollado diversas estrategias para frenar a dichas células una vez que ha logrado combatir la infección. A esto se denomina "regulación propiociada" y esencialmente obedece a dos mecanismos distintos: *a*) la muerte linfocitaria activa o estimulada por el antígeno (AICD), y *b*) La muerte linfocitaria pasiva por carencia de linfoquinas.

La regulación propiociada, además de autolimitar las respuestas inmunes, se encuentra en la base de los mecanismos de tolerancia periféricos, que impiden que células autorreactivas que han escapado a los mecanismos de selección negativa centrales puedan originar respuestas autoinmunes. En este tipo de muerte celular programada, que es la apoptosis linfocitaria a nivel periférico, el papel de las moléculas o receptores con dominios muerte que pertenecen a la superfamilia del receptor del TNF son fundamentales, y especialmente en el mecanismo denominado AICD.

El AICD se produce en los linfocitos maduros en respuesta a la estimulación antigénica, y requiere que las células T se encuentren activadas y dentro del ciclo celular cuando vuelven a ser reestimuladas con el antígeno. La muerte es indirecta en el sentido en que la AICD requiere la producción y secreción de ligandos que se unen a receptores apoptóticos. Los elementos clave que median este proceso en las células T CD4+ y CD8+ maduras son el Fas ligando (FasL) y el TNF, y suponen un mecanismo de *feedback* negativo. Asimismo, el FasL ligando expresado en los linfocitos T puede inducir apoptosis en las células B, que carecen de FasL (los mecanismos específicos de apoptosis son descritos en otra revisión).

Tan importante como controlar un posible exceso en la reacción del sistema inmune ante una agresión antigénica (autolimitación a través del AICD) es la vuelta a la normalidad una vez que se ha eliminado el patógeno. Este mecanismo es desempeñado por la carencia de linfoquinas, que no es más que una for-

Tabla 1. FALTA TÍTULO

ALPS	Genotipo	Fenotipo aparición/severidad	Defectos en receptores de apoptosis	Modelo murino
0	Mutaciones homocigotas en FAS	Prenatal/muy severo	Ausencia completa de FAS	<i>lpr/lpr</i> , FAS ko
Ia	Mutaciones heterocigotas en FAS	Infancia/moderada-severa	Defecto parcial en la función de FAS	<i>lpr^g/lpr^g</i>
Ib	Mutaciones heterocigotas en FAS ligando	Adultos/LES	Ninguno	<i>gld/gld</i>
II	Mutaciones en caspasa-10	Infancia/moderada Autoinmunidad	Defectos parciales FAS, TNFRI, DR3, TRAIL R1,2	Desconocido
III	¿?	Infancia/moderada Autoinmunidad	Desconocido	Desconocido

ALPS: *síndrome linfoproliferativo autoinmune.*

ma pasiva de apoptosis y que ocurre al final de una respuesta inmune. En este tipo de apoptosis, el Fas y los receptores de la familia del TNF no participan en absoluto, mientras que el papel fundamental pertenece a la vía mitocondrial. En los linfocitos T, la IL-2 y su ausencia desempeña el papel clave en esta forma pasiva de apoptosis, mientras que en las células B, la IL-7 y la IL-15 tienen un papel equivalente. El papel de Bcl-2 es esencial en la homeostasis de las células B maduras, como se demuestra dramáticamente en el caso de las translocaciones que implican a Bcl-2 en diversas neoplasias de células B.

Síndromes linfoproliferativos autoinmunes

Hace más de 30 años, Canale y Smith⁷ publicaron un síndrome caracterizado por linfadenopatías no malignas asociadas a características autoinmunes. Sin embargo, la base genética de este proceso linfoproliferativo con autoinmunidad fue identificada en primer lugar en ratones MRL/*lpr*. Esta raza murina era considerada como un modelo de lupus humano, puesto que estos ratones desarrollan glomerulonefritis, hipergammaglobulinemia y anticuerpos antinucleares, además de una importante linfadenopatía. Con la edad, estos ratones acumulan en periferia células T CD4-CD8-TCR $\alpha\beta$ +. Las características autoinmunes varían según las razas de ratones que lleven la mutación *lpr*^g. Otros mutantes naturales con características similares fueron descritos posteriormente; los ratones *lpr*^{CG} y los ratones *gld*. Mientras que los animales con la mutación *lpr* se caracterizan por una ausencia casi completa de Fas, los que tienen la mutación *lpr*^{CG} expresan una proteína Fas no funcional. En el ratón *gld*, una mutación sin sentido (missense) en el dominio extracelular (ECD) de FasL abroga su función. El fenotipo de estos ratones es muy similar, con un curso variable en el tiempo de inicio de los síntomas, siendo el más corto el observado en el modelo del Fas^{-/-} (Knock-out de Fas), que representa un modelo único de la deficiencia completa de Fas.

Por analogía con los modelos animales anteriormente descritos, se identificaron diversos defectos genéticos en la vía del Fas. A partir de entonces, el

síndrome también se denominó síndrome linfoproliferativo autoinmune (*lymphoproliferative syndrome with autoimmunity*, ALPS).

En seres humanos, los ALPS son definidos por el análisis funcional de la sensibilidad de los linfocitos del paciente a la apoptosis inducida por un anticuerpo dirigido contra Fas *in vitro*. Las células T de pacientes de ALPS pueden exhibir una completa ausencia de apoptosis inducida por Fas (ALPS 0), como consecuencia de una deficiencia completa de la expresión de Fas; el defecto parcial de apoptosis inducida por Fas asociado a una expresión normal o levemente reducida de Fas (ALPS I y II), y finalmente una apoptosis esencialmente normal (ALPS III). El fenotipo y la base genética de estos grupos funcionales son diversos (tabla 1). Sin embargo, hay cuatro criterios que caracterizan la condición de los ALPS: síndrome tumoral no maligno (esplenomegalia y/o linfadenopatías), manifestaciones autoinmunes, hipergammaglobulinemia y detección en sangre de células de T CD4-CD8- con un TCR $\alpha\beta$ + (de aquí en adelante llamadas doble negativas o DN). Con pocas excepciones, los pacientes de ALPS presentan por lo menos tres de estas características.

Deficiencia completa de Fas (ALPS 0)

El primer defecto completo de la expresión de Fas fue identificado en un paciente descendiente de padres consanguíneos^{9,12}. El niño presentaba una linfoproliferación masiva, evidente en el momento del nacimiento, lo que indicaba un proceso que había comenzado durante el período prenatal. La linfoproliferación implicaba tanto a células T como a células B y se asociaba a una ligera autoinmunidad que causaba trombocitopenia. Los linfocitos de este paciente eran insensibles al tratamiento por un anticuerpo contra Fas. Más del 70% de las células T periféricas tenían un fenotipo de DN (TCR $\alpha\beta$ + CD4-CD8-). Se observaban numerosas células en mitosis en secciones del bazo y de ganglios linfáticos, lo que sugería más bien una división activa de los linfocitos que la acumulación pasiva de los mismos. Finalmente, esta entidad pudo ser

completamente curada con un trasplante alogénico de médula ósea, lo que indica que las consecuencias de la deficiencia de Fas están restringidas a los linfocitos o por lo menos a las células de origen hematopoyético. Se han descrito otros 2 casos de deficiencia completa de Fas, y el fenotipo resultante es llamativamente similar, con inicio prenatal y linfoproliferación muy severa, acompañada de infiltración del pulmón y conduciendo a la muerte en uno de los casos.

Los ALPS 0 aparecen como consecuencia de mutaciones de homocigotas nulas (nonsense). En un caso, la aparición de un codón STOP en el dominio extracelular de Fas (ECD) conducía a un defecto completo de la expresión. En contraste, en los dos otros casos descritos las mutaciones se localizan en el dominio intracitoplásmico (ICD), afectando al exón 9 que codifica el dominio muerte (Death Domain, DD). Puesto que todas estas mutaciones eran heredadas de padres sanos (que llevan la mutación en heterocigosis), se ha propuesto que estas mutaciones son recesivas.

Deficiencia parcial de Fas (ALPS Ia y II)

Dos tipos de defectos pueden potencialmente ser la base de esta deficiencia: un defecto intrínseco en Fas como ocurre en el ALPS Ia o un defecto en la vía de señalización de apoptosis (*Signalling Pathway*) como en el ALPS II. Mientras que el primero es la principal causa de ALPS, el último se ha descrito solamente en dos pedigríes. El hallazgo común en todos estos pacientes es una apoptosis mediada por Fas alterada, tanto en células T como en linfocitos B⁹⁻¹¹. El fenotipo es similar en ambas variantes, sin embargo, se pueden observar algunas diferencias. Dado que hay muy pocos casos de ALPS II, es difícil de concluir si el fenotipo observado se relaciona con la base molecular de la enfermedad o si es una particularidad de las familias afectadas. Las características más sobresalientes de los ALPS II se discuten junto con la base genética de este defecto.

En los ALPS Ia, la magnitud del defecto varía de un paciente a otro, así como el grado de afectación en la apoptosis inducida por Fas. Es preciso resaltar, que la magnitud del defecto no se correlaciona con el inicio ni con la gravedad de las manifestaciones clínicas, de modo que individuos que tienen la misma mutación en Fas, y exhiben el mismo defecto funcional de la apoptosis, pueden presentar síntomas o no (penetrancia variable). El inicio de síntomas suele ocurrir en la niñez temprana (0-5 años). La linfoproliferación es generalmente el dato más sobresaliente, de modo que las linfadenopatías y la hepatosplenomegalia se observan en más del 80% de los pacientes. La linfoproliferación consiste en la acumulación no neoplásica de linfocitos T policlonales, una fracción variable de los cuales (2-61% de las células T $\alpha\beta+$) exhiben un fenotipo típico de DN. Hay también una acumulación excesiva de lin-

focitos B en algunos pacientes. Las células T, así como las células B, se acumulan en las áreas paracorticales, pero la arquitectura total de órganos linfoides se encuentra preservada. Muchas de esas células expresan el antígeno Ki-67, indicativo de una activa proliferación. El seguimiento a largo plazo de un número de pacientes, ha permitido establecer que hay una contracción significativa de la linfoproliferación (que a menudo termina con la regresión de la esplenomegalia y las adenopatías). Por el contrario, la hipergammaglobulinemia y las células T DN permanecen relativamente constantes y tienden a persistir toda la vida. Las manifestaciones autoinmunes son las siguientes más frecuentes. En una serie estudiada de 56 pacientes de ALPS Ia, 42 desarrollaron síntomas clínicos asociados con la presencia de autoanticuerpos. La edad de inicio varía considerablemente, al contrario de lo que ocurre con la linfoproliferación. Una observación interesante es que la autoinmunidad siempre se asocia a los autoanticuerpos, aunque no se puede excluir un papel directo de células T autorreactivas. En ninguno de los pacientes se encontró una presentación típica de lupus (no se han detectado autoanticuerpos anti-ADN de doble cadena). En algunos pacientes la autoinmunidad es muy severa requiriéndose terapias inmunosupresoras intensas. Con frecuencia es preciso realizar una esplenectomía. En estos casos, se puede deber a una esplenomegalia masiva, a fenómenos de hiperesplenismo, o a discrasias sanguíneas autoinmunes de difícil control con el tratamiento inmunosupresor.

Se ha descrito la aparición de diversas neoplasias como linfomas, carcinomas hepáticos (asociados a virus de la hepatitis C), adenomas tiroideos y de mama. Estas neoplasias suelen aparecer después de los 15 años de edad, y sugieren que las mutaciones en Fas representan un riesgo aumentado de malignización, especialmente por lo que se refiere a linfomas, sobre todo de Hodgkin.

La presencia en sangre de células T inusuales, es decir, TCR $\alpha\beta+$ CD4-CD8-, CD45RA0+, CD57+, es un dato constante en la mayoría de los pacientes con ALPS Ia, y una subida de esta población se observa con frecuencia tras la esplenectomía. Este subset de células representa el 2-60% del total de las células T de la sangre, en lugar del más de 0-2% que se encuentra en los individuos normales. Sin embargo, no está claro todavía si estas células desempeñan un papel en la fisiopatología de la enfermedad. Experimentos realizados con las células T de los ratones *lpr* han determinado que las células T DN (CD4-CD8-) derivan principalmente de las células T CD8+ y se encuentran en un estado anérgico, incapaz de ser activadas por los antígenos y escasamente por los mitógenos.

Una característica llamativa de los ALPS Ia consiste en la superproducción de IL-10 por los linfocitos T, así como la producción reducida de IL-12 por los monocitos y un nivel elevado de la IL-10 plasmá-

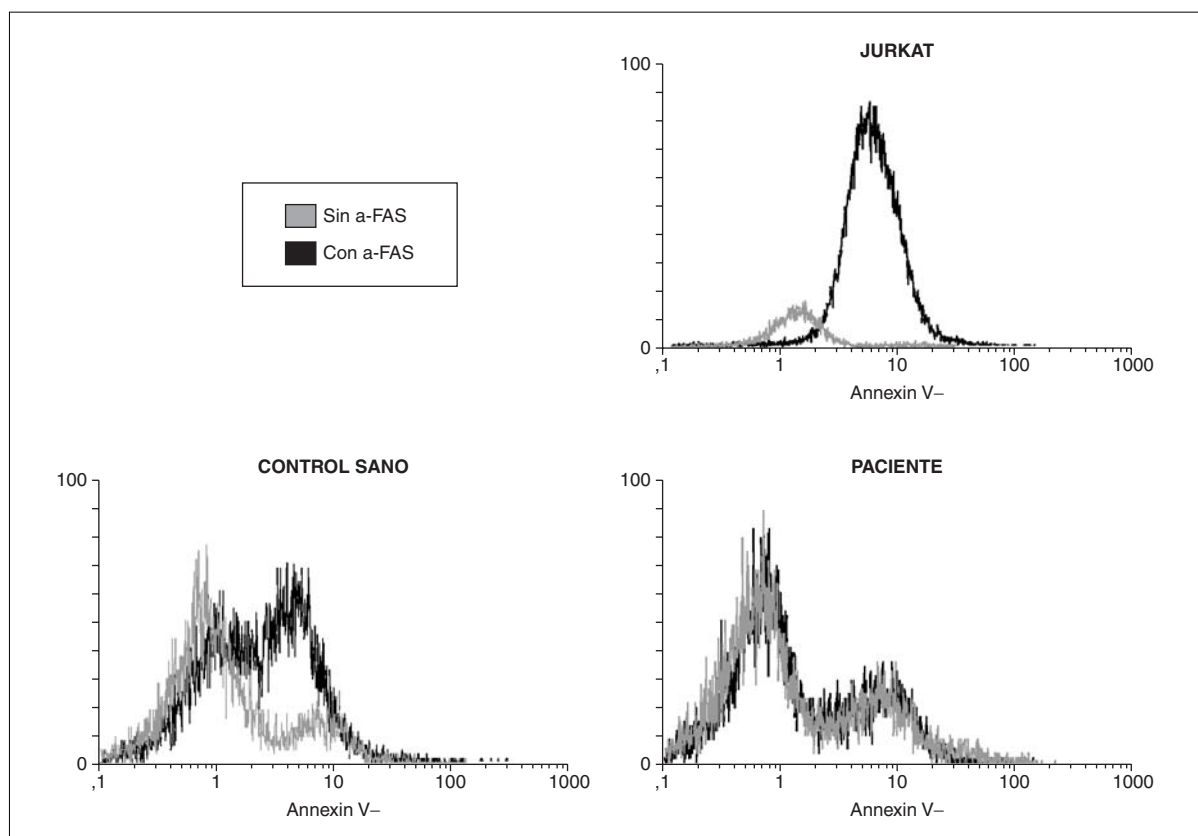


Figura 2. Inducción de apoptosis *in vitro* mediante un anticuerpo anti-Fas (CH-11). Controles: (1) JURKAT (línea celular humana T CD4+), (2) Control sano estimulado *in vitro* con PHA + IL-2; (3) Paciente R234Q (ausencia completa de apoptosis inducida por anti-FAS).

drome completo en los ALPS Ia, aunque en el momento actual se desconoce de cual puede tratarse.

Un segundo defecto genético que afecta de manera determinante a la apoptosis inducida por Fas se ha descrito en dos familias en las que la mutación aparece en el gen de la caspasa-10¹³. En estos pacientes se encuentra afectada la cascada apoptótica de todos los receptores que inducen apoptosis en linfocitos, es decir, el propio Fas, TNF R1, DR3 y los receptores de TRAIL (DR4 y DR5). Curiosamente, en los órganos linfoides también se acumulan células dendríticas, lo que no ocurre en los ALPS convencionales. Este fenómeno puede explicar la mayor gravedad de las alteraciones autoinmunes que se encuentran en los pacientes de ALPS II; anemia hemolítica y trombocitopenia autoinmunes graves, neuritis óptica y meningitis.

La existencia de modelos murinos de ALPS II está impedido por el hecho de que estos animales carecen de una molécula de caspasa-10 funcional, mientras que la abolición de la molécula más próxima, la Caspasa-8, produce letalidad embrionaria. Curiosamente, se ha descrito recientemente una pareja de hermanos con mutaciones en el gen de la caspasa-8 y el fenotipo es totalmente diferente del ALPS, ya que se limita a una inmunodeficiencia de severidad media¹⁴.

Ausencia de defectos en la apoptosis inducida por Fas (ALPS Ib y III)

De manera rutinaria, la sensibilidad a Fas se evalúa utilizando determinados anticuerpos monoclonales contra el receptor. Por tanto un defecto de FasL o de otro tipo de receptor daría lugar a un análisis funcional normal. Hasta el momento sólo se ha descrito un único caso de la deficiencia de Fas ligando (FasL)¹⁵. Sin embargo, el fenotipo de este caso es sustancialmente diferente de los ALPS clásicos y se caracteriza por linfoproliferación crónica unida a lupus eritematoso sistémico. Sin embargo, faltan dos de las características clásicas del ALPS; la esplenomegalia y la presencia de células T DN (CD4-CD8-). Aunque se han buscado mutaciones de FasL en otros grupos de pacientes (enfermos con ALPS Ia y mutaciones en Fas, pacientes de LES, etc); no se ha encontrado ningún otro caso.

Finalmente, un porcentaje importante de los pacientes que desde un punto de vista clínico se diagnostican como ALPS y que también presentan hipergammaglobulinemia y un exceso de células T DN, muestran una inducción normal de apoptosis a través de Fas. En este grupo de pacientes (varias decenas hasta el momento) no se ha encontrado ningún defecto molecular. Aunque no se ha podido demos-

trar, se especula que en ellos esté afectada otra vía de apoptosis linfocitaria desconocida por el momento, y que podría implicar otro tipo de receptores apoptóticos, como DR6, DR3, etc.

Bibliografía

1. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980;68:251-306.
2. Ka-Ming Chan F, Lenardo MJ. Programmed Cell Death in Fundamental Immunology. Ed. William A. Paul; 2003; p. 841-64.
3. Surh CD, Sprent J. T-cell apoptosis detected *in situ* during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 1994;372:100-3.
4. Sohn SJ, Rajpal A, Winoto A. Apoptosis during lymphoid development. *Curr Opin Immunol* 2003;15:209-16.
5. Ohashi PA. Negative selection and autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2003;15:209-16.
6. Strasser A, Bouillet P. The control of apoptosis in lymphocyte selection. *Immunological Reviews* 2003;193:82-92.
7. Canale VC, Smith CH. Chronic lymphadenopathy simulating malignant lymphoma. *J Pediatr* 1967;70:891-9.
8. Nagata S, Suda T. Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunol Today* 1995;16:39-43.
9. Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, Roberts I, Debatin K, Fischer A, et al. Mutations in fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 1995;268:1347-9.
10. Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE, Dale JK, Middleton LA, Lin AY, et al. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 1995;93:5-46.
11. Drappa J, Vaishnav AK, Sullivan KE, Chu J-L, Elkon KB. Fas gene mutations in the Canale-Smith syndrome an inherited lymphoproliferative disorder associated with autoimmunity. *N Engl J Med* 1996;335:1643-9.
12. Le Deist F, Emile JF, Rieux-Laucat F, Benkerrou M, Roberts I, Brousse N, et al. Clinical, immunological, and pathological consequences of Fas-deficient conditions. *Lancet* 1996;348:719-23.
13. Wang J, Zheng L, Lobito A, Chan FK, Dale J, Sneller M, et al. Inherited human caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell* 1999;98:47-58.
14. Chun HJ, Zheng L, Ahmad M, Wang J, Speirs CK, Siegel RM, et al. Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature* 2002;419:395-9.
15. Dianzani U, Bragardo M, DiFranco D, Alliaudi C, Scagni P, Buonfiglio D, et al. Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations in pediatric patients with autoimmunity/lymphoproliferation. *Blood* 1997;89:2871-9.
16. Wu JG, Wilson J, He J, Xiang LB, Schur PH, Mountz JD. Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease. *J Clin Invest* 1996;98:1107-13.

RUTAS DE MUERTE CELULAR Y ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD EN LOS SÍNDROMES LINFOPROLIFERATIVOS CRÓNICOS. IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS

D. COLOMER

Unidad de Hematopatología. Hospital Clínic. Barcelona.

Introducción

Las nociones iniciales acerca del desarrollo tumoral partían de la idea de que éste era únicamente el resultado de una proliferación celular no controlada. Sin embargo, en los últimos años, se han descrito diversas alteraciones genéticas primarias implicadas en linfomas, que sugieren que las vías relacionadas con el control de la proliferación celu-

lar y la apoptosis deben ser cruciales en el desarrollo de estos tumores y que tan importante es la proliferación como la pérdida de la capacidad de las células para entrar en muerte celular programada o apoptosis. Las células progresan a través del ciclo celular haciendo paradas en los denominados *checkpoints*, en los cuales se evalúa la integridad del material genómico antes de procederse a la división celular. En dichos *checkpoints*, el ADN lesionado se repara o la célula entra en la denominada muerte celular programada o apoptosis, lo que permite la eliminación de células anómalas antes de que el ADN defectuoso pase a la progenie. Por ello, la incapacidad de las células lesionadas para entrar en apoptosis puede conducir a la formación de tumores. Un ejemplo de enfermedad donde se detecta una acumulación de células en el organismo como consecuencia, probablemente, de un defecto en la eliminación natural de los linfocitos B es la leucemia linfática crónica (LLC) de tipo B¹.

La gran diversidad biológica de las hemopatías malignas contrasta con el relativamente limitado repertorio de estrategias terapéuticas disponibles. Estas estrategias se basan esencialmente en protocolos empíricos de combinaciones de agentes farmacológicos, radioterapia y trasplante de médula ósea^{2,3}. Recientemente se han empezando a introducir tratamientos de base biológica pero estos son todavía muy incipientes y limitados⁴. En este momento se conoce que muchos de los agentes quimioterápicos ejercen su función induciendo la muerte celular por apoptosis⁵. Las bases moleculares implicadas en la inducción de apoptosis por fármacos, la respuesta celular frente a estos tratamientos, y las alteraciones en las vías de apoptosis no son bien conocidas y pueden tener una importancia clave en el reconocimiento de las resistencias a fármacos y en el diseño de nuevas terapias. La mayoría de estos agentes quimioterápicos inducen daño al ADN, por lo que se activan la proteína quinasa dependiente de ADN (DNA-PK) y la proteína mutada de la ataxia telangiectasia (ATM). Estas proteínas fosforilan y estabilizan a p53. Los altos niveles de p53, en lugar de parar el ciclo, activarán el mecanismo de apoptosis, de manera que la célula que está excesivamente dañada muere. Se han detectado mutaciones del gen *ATM* y disminución/desaparición de la expresión de la proteína en un subgrupo de pacientes con LLC y linfoma de células del manto (LCM)^{6,7}. Se ha propuesto que mutaciones de *ATM* o de p53 pueden conllevar una resistencia celular a la apoptosis inducida por ciertos fármacos. El conocimiento de los mecanismos moleculares que intervienen en el control de la apoptosis pueden ser básicos para el desarrollo de nuevas terapias más específicas y selectivas.

Modelo experimental

Hemos desarrollado un modelo experimental para el análisis de la citotoxicidad inducida por fármacos

en la LLC y en el LCM. Para ello se aíslan las células tumorales y se criopreservan hasta su utilización. Posteriormente se realiza un ensayo *ex vivo* para la análisis de citotoxicidad y inducción de apoptosis.

Este modelo experimental se ha utilizado para:

Análisis de las vías implicadas en la muerte celular

Los estudios previos realizados por nuestro grupo demuestran que la vía mitocondrial es la principal responsable de la activación de la apoptosis inducida por los fármacos frecuentemente utilizados en el tratamiento de la LLC, como son la fludarabina, la mitoxantrona y los glucocorticoides^{8,9}. El daño producido por estos agentes desencadena diversas señales intracelulares que llegan a la mitocondria, induciendo una pérdida de potencial de membrana mitocondrial y la liberación de proteínas al citosol. Por un lado, el citocromo c, se une a Apaf-1 y a la caspasa-9, activándola desencadenando la activación de la caspasa-3. Se postula que en la fase de inducción de la ruta mitocondrial puede estar regulada por las proteínas de la familia Bcl-2¹⁰. La familia del Bcl-2 comprende actualmente más de 20 proteínas. Todas ellas contienen por lo menos uno de los dominios conservados conocidos como *Bcl-2 homology domains* (de BH1 a BH4) y se clasifican en tres subgrupos; antiapoptóticas que contienen por lo menos el dominio BH1 y BH2 (Bcl-2, Mcl-1, Bcl-X_L, Bcl-w, A1-Bfl-1, NR-13, Boo/DIVA/Bcl-2-L-10 y Bcl-B), proapoptóticas que contienen los dominios BH1, BH2 y BH3 (Bax, Bak, Bok/Mtd y Bcl-X_s) y proapoptóticas que sólo contienen el dominio BH3 (Bid, Bad, Bik/Nbk, Hrk/DP5, BNIP3, Noxa, Puma/Bbc3, Blk y Bim_L/Bod). El dominio BH3 es esencial para la actividad proapoptótica. El mecanismo de acción de Bcl-2 es desconocido, pero se han propuesto diversos mecanismos. Se postula que pueden formar heterodímeros entre las formas antiapoptóticas y proapoptóticas y estas uniones anularían su funcionalidad. De esta manera, un cambio en los niveles de proteína que modifiquen la proporción relativa, como la descrita para el heterodímero Bcl-2/Bax, puede explicar el efecto regulador sobre la apoptosis. También se han descrito cambios en su localización subcelular. La mayoría de proteínas de la familia de Bcl-2 tienen un dominio de anclaje a membrana. Bcl-2 se localiza en la membrana mitocondrial externa, en la membrana nuclear y en el retículo endoplasmático. En cambio, Bid, Bad, Bax y Bim se localizan principalmente en el citosol y en respuesta a estímulos apoptóticos se translocan a la mitocondria. Los cambios de localización pueden ser debidos a cambios de conformación o oligomerización, como ocurre con la proteína Bax, a cambios en su estado de fosforilación descrito en la proteína Bad o por proteólisis como ocurre en la proteína Bid. Otra hipótesis es que algunas proteínas de la familia del Bcl-2, como, por ejemplo, el Bcl-X_L, Bcl-2 y

Bax pueden formar canales iónicos. Todas estas propiedades que ejercen los miembros de la familia Bcl-2 no son excluyentes y se ha descrito que son muy importantes para regular la integridad de la mitocondria y la vía de apoptosis mitocondrial. Resultados de nuestro grupo han demostrado que uno de los primeros eventos en la apoptosis inducida por diferentes fármacos en las células de LLC, es el cambio de conformación de las proteínas Bax y Bak¹¹. Se ha observado una correlación entre el número de células apoptóticas y el número de células positivas marcadas con anticuerpos contra Bax y Bak que reconocen los cambios conformacionales de estas proteínas (fig. 1). La preincubación de las células con Z-VAD-fmk, un inhibidor general de caspasas, inhibe la activación de la caspasa-3, la exposición de los residuos de fosfatidilserina, la generación de especies de oxígeno reactivas y parcialmente revierte la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, pero no afecta a los cambios conformacionales de Bax y Bak. Estos resultados sugieren que los cambios de conformación de Bax y Bak tienen lugar antes de que ocurra la activación de las caspasas. El cambio conformacional va acompañado de la integración del Bax a la mitocondria, sin que se detecten cambios en la cantidad total de la proteína Bax y Bak. Fludarabina y la combinación de fludarabina, ciclofosfamida y mitoxantrona (FCM) inducen la estabilización de p53, pero este proceso no es fundamental para la inducción del cambio de conformación, ya que también se detecta en células tratadas con agentes no genotóxicos como es la dexametasona. Estos resultados confirman que el cambio de conformación de Bax y Bak es uno de los primeros eventos en la apoptosis de las células de la LLC. El mecanismo exacto por el que esto ocurre se desconoce, pero se postula que pueden tener un papel esencial las proteínas de la familia Bcl-2 "solo BH3".

Estudio *in vitro* del efecto citotóxico de fármacos y análisis del mecanismo de acción

Se han descrito muchos fármacos que pueden inducir *in vitro* la apoptosis de las células de LLC. Uno de los tratamientos más utilizados en el tratamiento de la LLC se basa en el empleo de análogos a las purinas, siendo la fludarabina, sola o combinada uno de los tratamientos más utilizados. Se ha analizado el efecto citotóxico de la fludarabina, y de su combinación con ciclofosfamida y mitoxantrona (FCM) en la LLC¹². La ciclofosfamida ejerce un efecto sinérgico sobre la fludarabina, y la adición de mitoxantrona a esta combinación es efectiva en un grupo de pacientes que ya han recibido otros tratamientos. La citotoxicidad observada va acompañada como se ha descrito anteriormente por la inducción de apoptosis a través de la ruta mitocondrial. La evaluación de la quimiosensibilidad a diferentes fármacos *ex vivo* ha demostrado ser útil para predecir

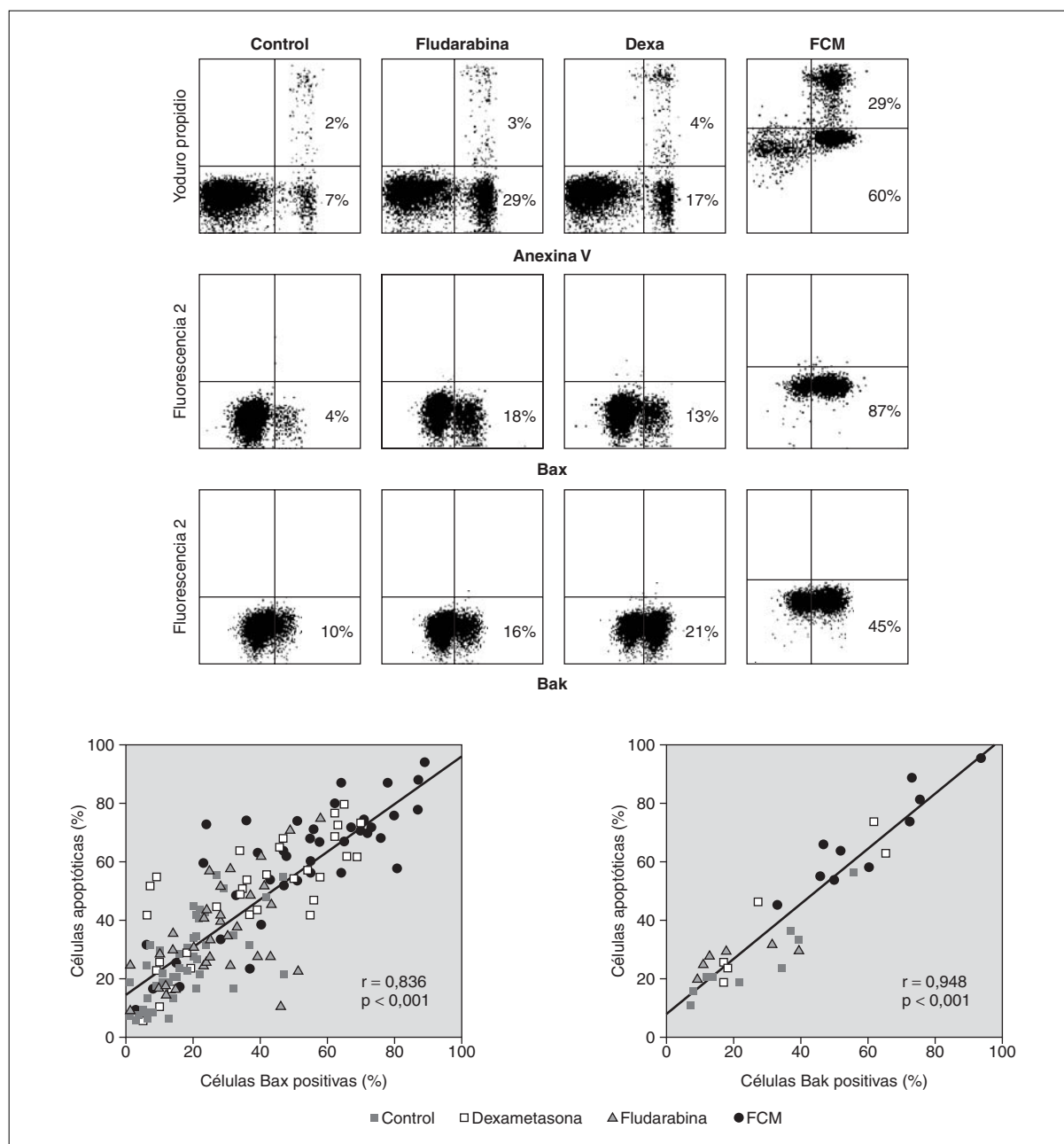


Figura 1. La apoptosis inducida por fármacos va acompañada de cambios conformacionales de Bax y Bak. A) Células de un paciente de LLC se incubaron con fludarabina 5 µg/ml, dexametasona 10 µM o la combinación de FCM durante 24 h, y se analizó la viabilidad celular mediante marcaje con anexina V, y los cambios de conformación de Bax y Bak mediante citometría de flujo. B) Correlación entre la viabilidad celular y las células positivas para Bax. C) Correlación entre la viabilidad celular y las células positivas para Bak.

la respuesta clínica *in vivo* de estos pacientes. Así, los estudios realizados *ex vivo* se han confirmado con estudios *in vivo* en pacientes afectados de LLC¹³.

Las células de LCM, al igual que las de la LLC, se caracterizan por ser células CD5+, pero a diferencia de éstas el pronóstico es peor y responden muy poco al tratamiento¹⁴. A diferencia con lo que ocurre con la LLC, los defectos en la inducción de la muerte celular en estos síndromes no han sido estudiados. Nuestro

grupo, ha estudiado la inducción de apoptosis mediante fármacos en los LCM, analizando sobre todo la vía mitocondrial de inducción de apoptosis¹⁵. Para ello se han analizado cuatro líneas celulares de LCM (JVM-2, Granta 519, Rec-1 y NCEB-1) y células primarias de LCM, y se han incubado con FCM y las combinaciones de éstos. A diferencia de lo que ocurre en las células de la LLC, la mitoxantrona, un inhibidor de la topoisomerasa II, ejerce un gran efecto ci-

totóxico, a dosis farmacológicas, en cambio se necesitan dosis muy altas para inducir un efecto citotóxico con fludarabina y ciclofosfamida. Al realizar combinaciones de estos fármacos, la adición de fludarabina y/o ciclofosfamida no indujo ningún efecto aditivo o sinérgico. A las 24 h, concentraciones farmacológicas de mitoxantrona indujeron citotoxicidad en las células de los 10 pacientes con LCM (mediana DL50 de 0,37 $\mu\text{g/ml}$; rango, 0,10-0,98 $\mu\text{g/ml}$). La incubación de células de LCM con mafosfamida, indujo citotoxicidad a dosis no farmacológicas (mediana DL50 de 6,01 $\mu\text{g/ml}$; rango, 2,66-11,38 $\mu\text{g/ml}$). Por el contrario, la fludarabina (1-10 $\mu\text{g/ml}$) no ejerció ningún efecto citotóxico. Después de 48 h de incubación con fludarabina, se detectó citotoxicidad en 5 casos (50%), dos de ellos con dosis farmacológicas (1-5 $\mu\text{g/ml}$) y los tres restantes a dosis altas de fludarabina (10 $\mu\text{g/ml}$). La combinación de mitoxantrona (0,5 $\mu\text{g/ml}$) y mafosfamida (1 $\mu\text{g/ml}$) produjo un efecto sinérgico en las células de LCM. No se detectó efecto sinérgico ni aditivo tras la incorporación de fludarabina (fig. 2). La citotoxicidad observada iba acompañada por las características propias de apoptosis: pérdida del potencial de membrana mitocondrial, activación de las caspasas-9, -8 y -3, proteólisis de PARP, disminución de la proteína antiapoptótica Mcl-1 y cambios en la conformación de las proteínas Bax y Bak. Sin embargo, no se detectaron cambios en los niveles de expresión de Bcl-2, Bax y Bak. Estos resultados sugieren que la mitoxantrona, *in vitro*, induce un efecto citotóxico en células de pacientes con LCM a dosis farmacológicas inferiores a las que indujeron citotoxicidad en células de LLC, sugiriéndose que la mitoxantrona, debería tenerse en cuenta al diseñar nuevos tratamientos para los pacientes con LCM.

Cabe destacar que en una de las líneas celulares estudiadas, la NCEB-1 ninguna de las drogas anali-

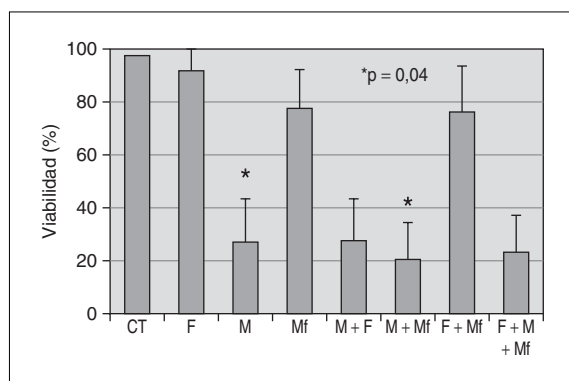


Figura 2. Efecto citotóxico de fludarabina, mitoxantrona y mafosfamida solos o en combinación en células primarias de LCM. Células de 10 pacientes con LCM se incubaron con 37 °C durante 24 h en ausencia de ningún fármaco (CT), con dosis farmacológicas de fludarabina (F; 1 $\mu\text{g/ml}$), mitoxantrona (M; 0,5 $\mu\text{g/ml}$), y mafosfamida (Mf; 1 $\mu\text{g/ml}$), o con la combinación de éstas. La viabilidad celular se determinó mediante marcaje con anexina V y análisis por citometría de flujo.

zadas ejerció ningún efecto citotóxico. Las posibles causas a esta falta de respuesta pueden ser debidas a que esta línea celular presenta alteraciones tanto en ATM y p53, dos genes reguladores del daño a ADN. Estas alteraciones son muy frecuentes en los LCM aunque generalmente se presentan de forma alternativa. Los resultados obtenidos sugieren que es necesario la funcionalidad de alguno de los puntos de control de daño a ADN para que los fármacos genotóxicos ejerzan su función citotóxica.

Recientemente se han clonado los transportadores de nucleósidos de alta afinidad o concentrativos y dependientes de sodio (CNT1, CNT2 y CNT3) y los de baja afinidad o equilibrativos e independientes del catión (ENT1 y ENT2)¹⁶. CNT1 es un transportador preferentemente de pirimidinas, CNT2 de purinas y CNT3 de ambas. ENT1 y ENT2 difieren en la sensibilidad al análogo de nucleósidos NBTI. Nuestro grupo ha demostrado que los principales transportadores de fludarabina en las células de LLC son los equilibrativos, observándose una relación entre la captación de fludarabina mediante los transportadores equilibrativos y la citotoxicidad observada *in vitro*¹⁷. Al analizar la expresión a nivel proteico de ENT1 y ENT2 en las células de la LLC se ha observado una correlación de la expresión proteica de ENT2 tanto con la captación de fludarabina como la citotoxicidad observada *in vitro* (fig. 3).

En los últimos años se han introducido tratamientos inmunoterápicos. Uno de los más utilizados es el rituximab (anti-CD20)¹⁸. El rituximab es un anticuerpo monoclonal (AcMo) quimérico humano y de ratón, que reconoce el antígeno CD20, una fosfoproteína no glucosilada de 33 a 37 kDa que se expresa en más del 95 % de las células B, tanto normales como neoplásicas. Se ha demostrado su efectividad en el tratamiento de los linfomas no hodgkinianos de bajo grado. La tasa de respuesta es similar a los tratamientos convencionales, pero la toxicidad es más baja. El mecanismo de acción del rituximab no está claro, por lo que no se conocen las causas en las que en unos pacientes es efectivo y en otros no. Estudios *in vitro* sugieren que la unión del rituximab a CD20 puede inducir apoptosis, citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y dependiente del anticuerpo (ADCC). Nuestro grupo ha analizado el efecto *in vitro* del rituximab en células de diferentes tipos de linfomas¹⁹, observándose un efecto citotóxico en las células de 9 de los 33 pacientes afectados de LLC, y en las células de 16/16 LCM, 4/4 linfomas foliculares y 2/2 tricoleucemia. El efecto citotóxico se detecta cuando los pacientes expresan más de 50×10^3 moléculas de CD20 por célula y se correlaciona con el número de moléculas de CD20 por célula (fig. 4). Por lo que se demuestra que el rituximab puede ser un tratamiento eficaz en aquellos linfomas que expresan un gran número de moléculas de CD20 por célula. La preincubación de las células con CD59, una proteína reguladora de complemento, aumenta

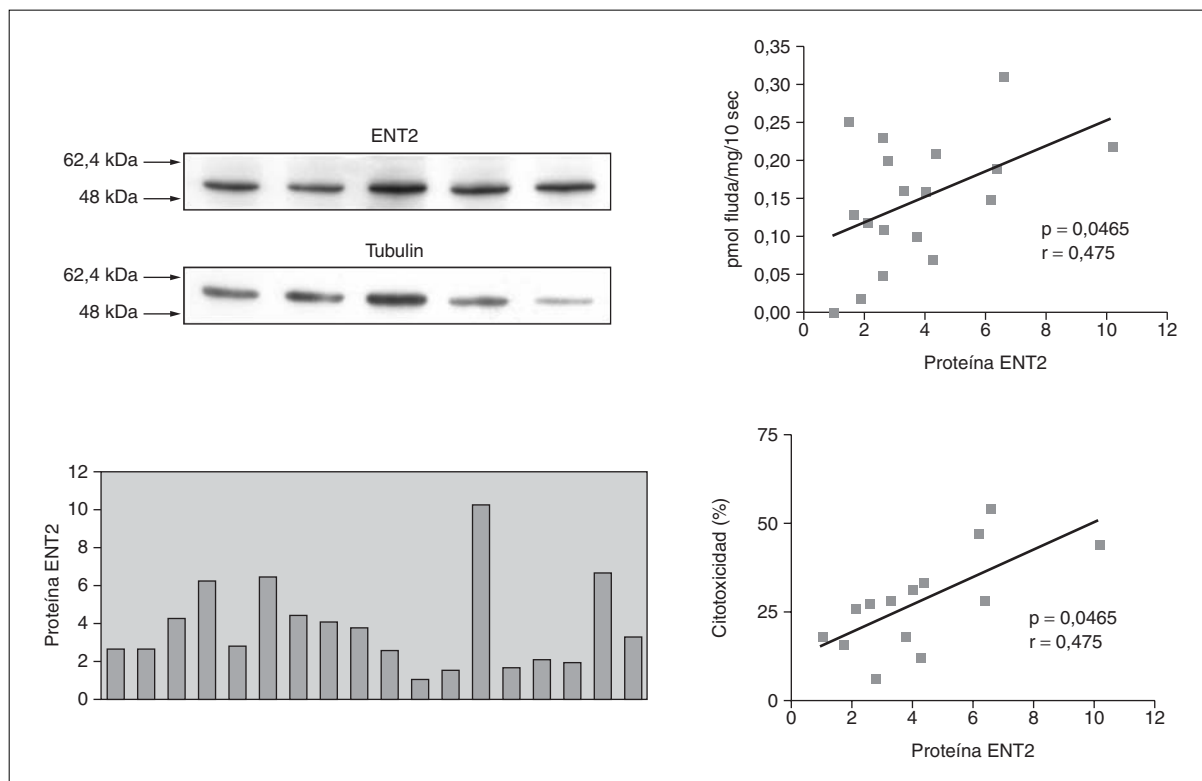


Figura 3. Expresión proteica de hENT2 en células de LLC y correlación con el transporte de fludarabina y la citotoxicidad *ex vivo*. A) Western blot de hENT2 y α -tubulina. B) Expresión de hENT2 normalizada con la cantidad de tubulina en todos los casos estudiados. C) Correlación de los niveles proteicos de hENT2 y la incorporación de fludarabina (10 s, 1 μ M). D) Correlación de los niveles proteicos de hENT2 con la sensibilidad *ex vivo* a la fludarabina, expresado como el porcentaje de células apoptóticas después de 48 h de tratamiento con 7,5 μ M de fludarabina.

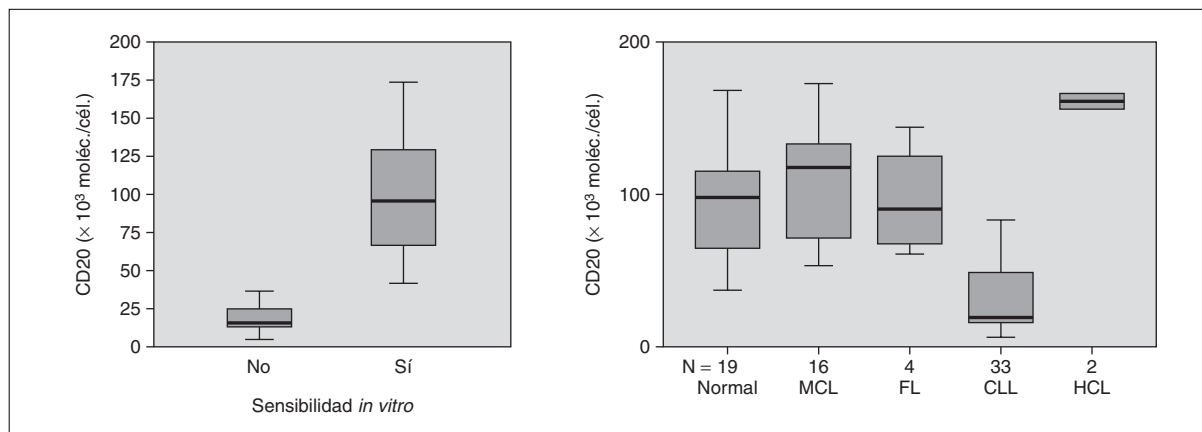


Figura 4. Moléculas de CD20 por célula y su relación con la sensibilidad *in vitro* a rituximab. A) Número de moléculas de CD20 por célula en diferentes hemopatías malignas. B) Correlación del número de moléculas de CD20 por célula y la sensibilidad *in vitro* al rituximab.

y sensibiliza las células al rituximab. Nuestros resultados sugieren que el mecanismo de acción del rituximab se basa en inducir la muerte celular por complemento. Este proceso es independiente de la activación de las caspasas y está asociado a producción de radicales libres de oxígeno (ROS).

Conclusiones

La mayoría de las nuevas terapias aplicadas al tratamiento en LLC y el LCM no han mejorado la supervivencia global de estos pacientes y no existe ningún fármaco que cure estas enfermedades. Por ello la búsqueda de nuevas terapias es básico e imprescindible.

Los estudios *in vitro*, previos al tratamiento del paciente permiten un diseño personalizado para cada paciente. El modelo que tenemos de aislamiento de las células tumorales en estas hemopatías permite trabajar directamente con células tumorales primarias, que no han sido transformadas. Esta metodología, es una forma muy útil de extrapolar los resultados obtenidos con el tratamiento a realizar en los pacientes. Estos estudios *in vitro* permitirán un tratamiento racional de estas hemopatías y la optimización de las dosis de los diversos fármacos.

Los estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro* demuestran que existen muchas diferencias en la respuesta a un mismo tratamiento entre los diferentes pacientes analizados. Los estudios *in vitro*, pueden ser útiles para estudiar las causas de este diferente comportamiento.

Bibliografía

- Shanafelt TD, Geyer SM, Kay NE. Prognosis at diagnosis: Integrating molecular biologic insights into clinical practice for patients with CLL. *Blood* 2004;103:1202-10.
- Montserrat E. Treatment options in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol J* 2004;5(Suppl 1):2-9.
- Seymour JF. New treatment approaches to indolent non-Hodgkin's lymphoma. *Semin Oncol* 2004;31:27-32.
- Coiffier B. Monoclonal antibodies combined to chemotherapy for the treatment of patients with lymphoma. *Blood Rev* 2003;17:25-31.
- Reed JC. Apoptosis-targeted therapies for cancer. *Cancer Cell* 2003;3:17-22.
- Camacho E, Hernández L, Hernández S, Tort F, Bellosillo B, Bea S, et al. ATM gene inactivation in mantle cell lymphoma mainly occurs by truncating mutations and missense mutations involving the phosphatidylinositol-3 kinase domain and is associated with increasing numbers of chromosomal imbalances. *Blood* 2002;99:238-44.
- Pettitt AR, Sherrington PD, Stewart G, Cawley JC, Taylor AM, Stankovic T. p53 dysfunction in B-cell chronic lymphocytic leukemia: inactivation of ATM as an alternative to TP53 mutation. *Blood* 2001;98:814-22.
- Bellosillo B, Dalmau M, Colomer D, Gil J. Involvement of CED-3/Ice proteases in the apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 1997;89:3378-84.
- Bellosillo B, Colomer D, Pons G, Gil J. Mitoxantrone, a topoisomerase II inhibitor, induces apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Br J Haematol* 1998;100:142-6.
- Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 2003;22:8590-607.
- Bellosillo B, Villamor N, López-Guillermo A, Marce S, Bosch F, Campo E, et al. Spontaneous and drug-induced apoptosis is mediated by conformational changes of Bax and Bak in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100:1810-6.
- Bellosillo B, Villamor N, Colomer D, Pons G, Montserrat E, Gil J. *In vitro* evaluation of fludarabine in combination with cyclophosphamide and/or mitoxantrone in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:2836-43.
- Bosch F, Ferrer A, López-Guillermo A, Gine E, Bellosillo B, Villamor N, et al. Fludarabine, cyclophosphamide and mitoxantrone in the treatment of resistant or relapsed chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2002;119:976-84.
- Campo E. Genetic and molecular genetic studies in the diagnosis of B-cell lymphomas I: Mantle cell lymphoma, follicular lymphoma, and Burkitt's lymphoma. *Hum Pathol* 2003;34:330-5.
- Ferrer A, Marce S, Bellasilla B, Villamor N, Bosch F, López-Guillermo A, et al. Activation of mitochondrial pathway in mantle cell lymphoma. High sensitivity to mitoxantrone in cases with functional DNA damage response genes. *Oncogene* 2004. En prensa.
- Pastor-Anglada M, Molina-Arcas M, Casado FJ, Bellosillo B, Colomer D, Gil J. Nucleoside transporters in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 2004;18:385-93.
- Molina-Arcas M, Bellosillo B, Casado FJ, Montserrat E, Gil J, Colomer D, et al. Fludarabine uptake mechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2003;101:2328-34.
- Grillo-López AJ. Rituximab (Rituxan/MabThera): The first decade (1993-2003). *Expert Rev Anticancer Ther* 2003;3:767-79.
- Bellosillo B, Villamor N, López-Guillermo A, Marce S, Esteve J, Campo E, et al. Complement-mediated cell death induced by rituximab in B-cell lymphoproliferative disorders is mediated *in vitro* by a caspase-independent mechanism involving the generation of reactive oxygen species. *Blood* 2001;98:2771-7.

APOPTOTIC PATHWAYS AND THEIR CLINICAL RELEVANCE IN ACUTE LEUKEMIA

L. KARAWAJEW AND W.-D. LUDWIG

Robert-Rössle-Klinik at the HELIOS Klinikum Berlin-Buch, Charité-Universitätsmedizin Berlin. Berlin. Alemania.

Introduction

Apoptosis, the genetically controlled cell suicide program, is critical for tissue development and maintaining tissue homeostasis. Its deregulation may be a significant factor in the etiology of malignant cell transformation and in the mechanisms of acquired chemoresistance¹. As the fundamental biological and clinical importance of apoptosis has been recognised, it has become the subject of considerable research activities and much progress has been made in the understanding of its main regulatory pathways, although many aspects of their basic mechanism of action as well as tissue-specific regulation remain elusive. The purpose of this review is to provide a background to the pathways and molecular components of apoptosis, to discuss their relevance to hematological malignancies, and to overview their prognostic impact and potential for novel therapies for acute leukemias.

Major apoptotic pathways and their regulatory components

Signalling cascades eventually leading to apoptotic cell death may utilize two different, extrinsic or death receptor-associated, and intrinsic or mitochondrial pathways^{2,3}. The extrinsic route is initiated by death receptor ligands and is a critical mediator of several physiological and pathophysiological processes, including homeostasis of the mature blood lymphocytes and cell-mediated target cell killing. The mitochondrial pathway is the main route of apoptotic signals initiated by cell stress resulting from interaction of naturally occurring environmental or chemotherapeutic agents with their specific cellular targets.

In the extrinsic route, pro-apoptotic signalling begins with oligomerization or aggregation of the membrane-bound death receptors, CD95 (Fas) and TRAIL-R1,-R2 (DR4, DR5), which belong to the TNF receptor/nerve growth factor receptor superfamily^{2,4}. Upon binding by their cognate ligands, CD95L or TRAIL, oligomerization of these receptors causes recruitment of the cytoplasmic adapter protein FADD (Fas-associated death domain) through homotypic interactions between their death domains. This assembly, in turn, recruits procaspase-8, thus forming the death-inducing signalling complex (DISC). In the DISC, procaspase-8 is activated by self-processing and initiates thereby the subsequent cascade of additional processing and activation of

downstream effector caspases-3 and -7. The pathway can be negatively regulated by antagonistic molecules like c-FLIP (cellular FLICE inhibitor protein) which is able to compete with FADD adaptor protein for binding to procaspases-8 and regulate cell death at the level of the DISC^{2,4}.

Death receptor signalling via the extrinsic pathway thus represents an effective and straightforward mechanism of caspase activation. By contrast, the intrinsic, mitochondrial pathway of apoptosis, induced by, e.g., anti-cancer drug treatment, is a more complex and less elucidated process of cellular stress response³. Its initiation is coupled to multiple cellular stress reactions, including cell cycle arrest and activation of damage-specific repair mechanisms. This signal transduction phase involves integration of pro- and antiapoptotic signals and converges on the Bcl-2 family of proteins, which ultimately determines if the mitochondrial apoptosis program is initiated⁵. The Bcl- family proteins share at least one of four homologous regions termed Bcl homology (BH) domains (BH1 to BH4). Based on their biological function and sequence homology, Bcl-2 family members can be classified into three main categories: antiapoptotic proteins of the Bcl-2 subfamily such as Bcl-2, Bcl-xL and Mcl-1, pro-apoptotic proteins of the Bax subfamily such as Bax and Bak, and "BH3-only" proteins such as Bad and Bid. The members of the BH3-only protein subfamily share sequence homology only in the BH3 domain and are important transducers of apoptotic signals from cytosol to the mitochondrial membrane⁵. Interactions between the members of these subfamilies ultimately decide about the integrity of the outer mitochondrial membrane. The disruption or permeabilization of the outer membrane, yet poorly understood mechanistically, leads to a subsequent release of cytochrome *c* from mitochondria³. The released cytochrome *c* forms an essential part of the apoptosis complex, the apoptosome, which is composed of cytochrome *c*, adaptor protein Apaf-1, and procaspase-9^{1,3}. The formation of the apoptosome induces autocatalytic processing of procaspase-9. The mature caspase-9 in turn activates its primary downstream target procaspase-3, which initiates the ultimate stage of apoptotic cell degradation.

Activation of effector caspases, which cleave a number of structural and regulatory cellular proteins and are responsible for the typical morphologic and biochemical features of an apoptotic cell, represents, therefore, the point of convergence of both apoptotic pathways⁵. Consistent with their pivotal role in apoptosis, activation of caspases is tightly controlled by additional molecular mechanisms, including the protein family of inhibitors of apoptosis, IAPs, of which X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) appears to be the most potent member and is expressed in a variety of tissues⁶. To prevent spontaneous cell death, XIAP binds directly to and inhibits

processed caspase-9 and caspases-3 and -7. To overcome the antiapoptotic action of XIAP in mitochondrial pathway, pro-apoptotic SMAC ("second-mitochondrial-activator-of-caspases") is released from mitochondrion upon its membrane permeabilization and removes XIAP blockage of activated caspase^{5,6}. In the death receptor triggered apoptosis, XIAP has been shown to be cleaved in smaller peptides, which specifically lose their ability to bind caspase-3, but not caspase-9.

Although extrinsic and intrinsic pathways for apoptosis are capable of operating independently, accumulating evidence suggests that a cross-talk between the two pathways exists. In the death receptor signalling, activated caspase-8 may cleave off an N-terminal fragment of the BH3-only protein Bid, thus allowing the truncated Bid protein (tBid) to translocate to the mitochondria and induce cytochrome *c* release by interaction with other Bcl-2 family members⁵. Moreover, the intrinsic pathway can be amplified by components of the death receptor cascade, as cytostatic drugs have been reported to activate caspase-8 secondarily to mitochondrial damage⁷.

Apoptosis-regulating proteins in acute leukemia: Expression and prognostic impact

Bcl-2 protein family

In leukemia cell lines, overexpression of antiapoptotic (e.g. Bcl-2, Bcl-xL) proteins has been associated with an increased resistance to various apoptosis-inducing cytotoxic drugs⁵. Screening of primary leukemia patient samples disclosed a heterogeneous expression pattern of Bcl-2, Bcl-xL and Bax proteins⁸⁻¹². In acute lymphoblastic leukaemia (ALL), expression levels of these proteins failed to show any clinical impact on disease outcome⁸. In acute myeloid leukaemia (AML), a worse response to induction therapy was associated with increased levels of Bcl-2 and Bcl-xL, and decreased expression levels of the proapoptotic Bax¹¹, but neither Bcl-2 nor Bax nor Bcl-xL expression had a significant influence on overall or disease-free survival¹². Most interestingly, Bax/Bcl-2 ratio disclosed independent prognostic value in AML^{9,11}. Lower Bax/Bcl-2 ratios were significantly associated with poor-risk cytogenetics, a lower complete remission rate and a shorter overall survival. With respect to immunophenotype, increased Bcl-2, Bcl-xL levels and lower Bax and Bax/Bcl-2 values were associated with more immature FAB-M0/M1 AML subtypes and CD34-expressing blasts⁹.

Caspases

Initiator and effector caspases are critical participants in both, death-receptor and mitochondrial apoptotic pathways. Procaspases-2, -3, -7, -8, and-9 have been reported to be constitutively present in primary leukemia cells. Expression levels of these proteins, as well as of the apoptosome adap-

tor protein APAF-1, however, did not correlate with prognostic factors or response to induction therapy in AML and ALL, and there were no systematic alterations in levels of APAF-1 and procaspases at relapse compared with diagnosis¹³. With regard to event free survival, contradictory data on the correlation between levels of procaspase-3 and survival have been reported for patients with AML^{13,14}.

IAP protein family

Of IAP family members studied (XIAP, cIAP1 and 2, NAIP and survivin), XIAP expression was significantly lower in patients with favorable as compared with intermediate or poor cytogenetics in AML⁶. There was a trend toward better overall survival in patients expressing lower amounts of XIAP⁶. No significant difference in remission rate or survival in AML patients expressing high versus low levels of surviving were found. However, survivin expression became an independent negative prognostic factor for survival when adjusted for established prognostic factors (cytogenetics, age, and WBC)¹⁵.

Death receptors

In normal lymphocytes, expression levels of death receptors for CD95 and TRAIL ligands have been found to be increased in activated T- and B-cells, and to contribute to immune homeostasis and cell-mediated cytotoxicity. In acute leukemia, constitutive expression of CD95 and, to a lower extent, of TRAIL receptors have been reported. CD95 expression levels correlated with an immature AML phenotype. However, neither CD95 nor TRAIL receptor expression showed predictive impact on treatment outcome in AML or ALL^{10,16,17}.

Apoptotic pathways in acute leukemia: Functional integrity and clinical impact

Activation of effector caspases

In view of the complex interplay of a variety of pro- and antiapoptotic molecules, assessment of the functional integrity of apoptosis pathways may represent a more promising experimental approach. Schimmer et al¹⁸ investigated the functional status of cytochrome *c* and caspase-8 dependent pathways for effector caspase activation in AML cells using electroporation to introduce apoptogenic proteins into cells. In a small series of 24 AML patients, simultaneous blocks in both, the intrinsic and extrinsic pathways have been found to predict for chemoresistant disease and decreased patient survival¹⁸.

In order to assess post-mitochondrial pathways of apoptosis, we have developed a flow cytometric method for simultaneous detection of mitochondrial cytochrome *c* release and caspase-3 activation, using a conformation-sensitive cytochrome *c* antibody and antibodies specifically detecting activated caspase-3¹⁹. The method proved to detect deficient mi-

tochondrial apoptosis signalling in leukemic blasts from pediatric ALL patients (N = 67 pts), and identified the cytochrome *c*-mediated caspase activation as the most predictive parameter for blast cell persistence at days 8, 15 and 33 of induction therapy (Meyer et al, manuscript in preparation).

Death receptor signalling

With regard to functionality of extrinsic apoptosis pathways in acute leukemia, cell lines of leukemia origin, like Jurkat or HL-60, disclose high sensitivity to death receptor triggering¹⁶. In contrast, primary ALL and AML samples have been found to be largely refractory to apoptotic signalling via both, CD95 and TRAIL receptors^{10,16,17}. The poor responsiveness to CD95 could not be explained by genetic alterations of the CD95 gene, as CD95 mutations were found to be extremely rare in acute leukemia²⁰. In several cases, however, a sensitization to death receptor-induced apoptosis has been observed in blast cells under cytotoxic drug-induced stress conditions, thus indicating a principal therapeutic usage of the death receptor signalling in the clinical setting⁷.

Survival cytokine signalling

In normal hematopoiesis, cell survival is a differentiation stage-dependent process strictly controlled by stromal microenvironment through, e.g., cytokine receptor signalling which is intimately linked to the intracellular apoptotic programs of hematopoietic cells. This linkage may be differentially preserved in leukemia cells and, therefore, account for differential response to therapy. Clinical significance of stroma cell dependence has been demonstrated by investigation of bone marrow stroma-supported cell recovery in ALL. In these studies, lower recovery rates were associated with better event free survival and hyperdiploidy of leukemia blast cells²¹.

In T-cell precursor ALL, susceptibility of apoptotic pathways to survival signalling has been assessed by investigating *in vitro* apoptosis modulation by cytokines IL-2, -4, and -7. In particular IL-7, the key regulator in normal T-cell development, was found to be a highly potent inhibitor of spontaneous and drug-induced apoptosis by Bcl-2 upregulation in leukemic blasts^{22,23}. Classification of a large series of T-cell precursor ALL samples (N = 130) according to their *in vitro* IL-7 responsiveness revealed association of IL-7 responsive samples with the prognostically favorable cortical thymocyte immunophenotype and with early *in vivo* therapy response, thus indicating a potential clinical relevance of the survival signalling in ALL²².

Apoptosis targeting in acute leukemia

Targeting of Bcl-2 protein family

A great deal of effort is currently aimed at developing novel agents to modulate the expression and function of Bcl-2 proteins. Strategies involve antisense

agents directed against Bcl-2 and Bcl-xL mRNA, design of short peptides inhibiting Bcl-2 function, and high throughput screening for synthetic and naturally occurring BH3-mimicking compounds²⁴. Of these approaches, antisense therapies directed against Bcl-2 have progressed to the level of clinical trials for different types of cancers, including hematological malignancies. The Bcl-2 antisense molecule, G3139 (also referred to as Genasense), has advanced to Phase III clinical trials in AML, chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma. Given the synergistic apoptosis induction by anti-cancer drugs and Bcl-2 antisense molecules observed *in vitro* and in xenograft models, most clinical trials combine the antisense agents with conventional chemotherapy^{24,25}.

Targeting for caspase activation

IAP-family members are endogenous antagonists of the caspase activation and, therefore, represent an attractive target for novel therapeutic strategies aimed at induction of apoptosis in drug-resistant cells. Antisense-mediated reductions in XIAP, cIAP1 and survivin, have been demonstrated to induce apoptosis of tumor cell lines in culture, or sensitize cells to cytotoxic anticancer drugs, thus providing an experimental basis for their therapeutic application²⁵. Furthermore, NMR and X-ray crystallography studies on structural basis of IAP recognition by the endogenous antagonist of IAPs, SMAC, have facilitated the design of synthetic peptides that can mimic binding activity of SMAC to IAP, thereby either triggering apoptosis or enhancing drug- and TRAIL sensitivity in tumor cell lines *in vitro* and in some tumor xenograft models²⁵.

Sensitization to apoptosis through death-receptor signalling pathway

Given the tendency of chemoresistant cells to have defects in their intrinsic pathway, apoptosis induction via the alternative extrinsic pathway represents an attractive anti-tumor strategy⁴. As agonistic antibodies triggering CD95 receptor signalling, are highly toxic to liver, investigations have been focussed on activation of TRAIL-mediated apoptosis. Several recombinant versions of death receptor ligand, facilitating high-order multimerization of the DR4 and DR5 TRAIL receptors, have been described to be well tolerated even at high doses in non-human primates⁴. An additional mechanism to enhance susceptibility to death receptor triggering has been suggested by studies of the naturally occurring triterpenoids and their synthetic analogues, that trigger a poorly defined pathway for ubiquitination and degradation of the caspase-8 binding FLIP protein²⁵.

Final considerations

Apoptotic mechanisms and their deregulation critically contribute to malignant cell transformation and to chemoresistance. In numerous studies, the

expression of individual apoptotic proteins in acute leukemia cells in the context of the other cell-biological, immunophenotypic and clinical features has been addressed. However, most of these studies failed to demonstrate an independent prognostic significance of these proteins. Investigation of the functional integrity of apoptotic and survival pathways and their distinct parts of signalling cascades seems to be a more promising approach to predict clinical outcome and response to chemotherapy in leukemia. In addition to their prognostic relevance, identification of apoptotic pathways and better understanding of their regulatory mechanisms provide an experimental basis for the discovery of novel anti-cancer drugs and offers multiple opportunities for therapeutic intervention. The apoptosis-targeting agents promise to be useful clinically, either by selectively inducing apoptosis in tumor cells, or by sensitizing chemoresistant cells to leukemia treatment with conventional cytotoxic agents. At present, however, efficacy of most of the compounds interfering with apoptosis-resisting mechanisms has been mainly demonstrated *in vitro* cell culturing and in animal experimental models. Although clinical phase II and III studies, e.g. with Bcl-2 antisense molecules, are in progress, it remains to be determined whether the promising potential of these molecules as cancer therapeutics will hold-up in the clinical setting. Moreover, several important issues have not yet been addressed, including the questions of tissue-specific and individual patterns of expression of molecular targets and their changes during therapy. To this end, high-throughput technologies in genomics and proteomics offer novel opportunities to investigate therapy-specific apoptosis regulation and its close cooperation with signal transduction, cell cycle regulation and repair mechanisms at the functional level in individual patients²⁶.

References

1. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: Critical control points. *Cell* 2004; 116:205-19.
2. Schimmer AD, Hedley DW, Penn LZ, Minden MD. Receptor- and mitochondrial-mediated apoptosis in acute leukemia: A translational view. *Blood* 2001;98:3541-53.
3. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000;6:513-9.
4. Almasan A, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL: Apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14:337-48.
5. Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 2003;22:8590-607.
6. Tamm I, Kornblau SM, Segall H, Krajewski S, Welsh K, Kitada S, et al. Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias. *Clin Cancer Res* 2000;6:1796-803.
7. Friesen C, Fulda S, Debatin KM. Cytotoxic drugs and the CD95 pathway. *Leukemia* 1999;13:1854-8.
8. Wuchter C, Karawajew L, Ruppert V, Schrappe M, Harbott J, Rätei R, et al. Constitutive expression levels of CD95 and Bcl-2 as well as CD95 function and spontaneous apoptosis *in vitro* do not predict the response to induction chemotherapy and relapse rate in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2000;110:154-60.
9. Del Poeta G, Venditti A, Del Principe MI, Maurillo L, Buccisano F, Tambarini A, et al. Amount of spontaneous apoptosis detected by Bax/Bcl-2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2003;101:2125-31.

10. Wuchter C, Richter S, Oltersdorf D, Creutzig U, Harbott J, Karawajew L, et al. High expression levels of X-linked inhibitor of apoptosis protein and survivin correlate with poor overall survival in childhood de novo acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2004;10, in press.
11. Kornblau SM, Vu HT, Ruvolo P, Estrov Z, O'Brien S, Cortes J, et al. BAX and PKCalpha modulate the prognostic impact of BCL2 expression in acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* 2000;6:1401-9.
12. Schaich M, Illmer T, Seitz G, Mohr B, Schakel U, Beck JF, et al. The prognostic value of Bcl-XL gene expression for remission induction is influenced by cytogenetics in adult acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2001;86:470-7.
13. Svingen PA, Karp JE, Krajewski S, Mesner PW Jr, Gore SD, Burke PJ, et al. Evaluation of Apaf-1 and procaspases-2, -3, -7, -8, and -9 as potential prognostic markers in acute leukemia. *Blood* 2000;96:3922-31.
14. Estrov Z, Thall PF, Talpaz M, Estey EH, Kantarjian HM, Andreeff M, et al. Caspase 2 and caspase 3 protein levels as predictors of survival in acute myelogenous leukemia. *Blood* 1998;92:3090-7.
15. Adida C, Recher C, Raffoux E, Daniel MT, Taksin AL, Rousselot P, et al. Expression and prognostic significance of survivin in de novo acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2000;111:196-203.
16. Karawajew L, Wuchter C, Ruppert V, Drexler H, Dorken B, Ludwig WD. Differential CD95 expression and function in T and B lineage acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia* 1997;11:1245-52.
17. Wuchter C, Krappmann D, Scheiderei C, Dorken B, Ludwig WD, Karawajew L. *In vitro* susceptibility to TRAIL-induced apoptosis of acute leukemia cells in the context of TRAIL receptor gene expression and constitutive NF-kappa B activity. *Leukemia* 2001;15:921-8.
18. Schimmer AD, Pedersen IM, Kitada S, Eksioglu Demiralp E, Minden MD, Pinto R, et al. Functional blocks in caspase activation pathways are common in leukemia and predict patient response to induction chemotherapy. *Cancer Res* 2003;63:1242-8.
19. Stahnke K, Mohr A, Liu J, Meyer LH, Karawajew L, Debatin KM. Identification of deficient mitochondrial signaling in apoptosis resistant leukemia cells by flow cytometric analysis of intracellular cytochrome c, caspase-3 and apoptosis. *Apoptosis* 2004;9:457-65.
20. Beltinger C, Bohler T, Karawajew L, Ludwig WD, Schrappe M, Debatin KM. Mutation analysis of CD95 (APO-1/Fas) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 1998;102:722-8.
21. Ito C, Kumagai M, Manabe A, Coustan Smith E, Raimondi SC, Behm FG, et al. Hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia with 51 to 65 chromosomes: a distinct biological entity with a marked propensity to undergo apoptosis. *Blood* 1999;93:315-20.
22. Karawajew L, Ruppert V, Wuchter C, Kösser A, Schrappe M, Dörken B, et al. Inhibition of *in vitro* spontaneous apoptosis by IL-7 correlates with upregulation of Bcl-2, cortical/mature immunophenotype, and better cytoreduction in childhood T-ALL. *Blood* 2000;96:297-306.
23. Wuchter C, Ruppert V, Schrappe M, Dorken B, Ludwig WD, Karawajew L. *In vitro* susceptibility to dexamethasone- and doxorubicin-induced apoptotic cell death in context of maturation stage, responsiveness to interleukin 7, and early cytoreduction *in vivo* in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;99:4109-15.
24. Shangary S, Johnson DE. Recent advances in the development of anti-cancer agents targeting cell death inhibitors in the Bcl-2 protein family. *Leukemia* 2003;17:1470-81.
25. Reed JC. Apoptosis-targeted therapies for cancer. *Cancer Cell* 2003;3:17-22.
26. Cheok MH, Yang W, Pui CH, Downing JR, Cheng C, Naeve CW, et al. Treatment-specific changes in gene expression discriminate *in vivo* drug response in human leukemia cells. *Nat Genet* 2003;34:85-90.

COAGULOPATÍAS DE LAS VÍAS EXTRÍNSECA Y COMÚN

COORDINADORES: J.A. AZNAR. *Falta centro, Valencia*

R. PÉREZ-GARRIDO. *Unidad de Coagulopatías Congénitas HH UU Virgen del Rocío. Sevilla*

Resumen del simposio

En este simposio, en primer lugar, revisaremos los déficit congénitos de la vía extrínseca y común de la coagulación. Las formas homocigotas son de escasa prevalencia, entre 1/500.000 y 2.000.000. A diferencia de lo que sucede con la hemofilia, no han sido tan bien caracterizadas en cuanto a gravedad de la sintomatología, al defecto molecular implicado y al tratamiento de los episodios hemorrágicos.

Son déficit transmitidos, generalmente, de forma autosómica recesiva, siendo homocigotos o dobles heterocigotos los pacientes con manifestaciones clínicas relevantes. La mayoría se expresan fenotípicamente por la reducción de los factores plasmáticos medidos por métodos funcionales (tipo I). Los defectos cualitativos (tipo II) son menos frecuentes. Las disfibrinogenemias transmitidas con carácter autosómico dominante son una excepción.

Recientemente se han realizado progresos en el estudio de las alteraciones moleculares, aunque no son empleadas rutinariamente para control genético y diagnóstico prenatal. Estas alteraciones son debidas a defectos de ADN en los genes que codifican el correspondiente factor de coagulación. Las mutaciones suelen estar distribuidas por todo el gen y existe una relación entre el genotipo-fenotipo. Como excepciones encontramos dos deficiencias: *a)* déficit combinados de FVIII y FV, por defecto en los genes que codifican una proteína relacionada con el transporte intracelular de factores, y *b)* déficit combinados de los factores vitamina K dependientes por alteración en los genes responsables de enzimas implicadas en las modificaciones postraslacionales de estos factores y del metabolismo de la vitamina K.

El síntoma clínico común a estos defectos es el aumento de sangrado durante procedimientos invasivos o extracciones dentales, siendo también frecuentes los sangrados por mucosas (epistaxis y menorragias). Hemorragias con compromiso vital, hemartros y hematomas pueden ocurrir en pacientes homocigotos para déficit de protrombina y factor X. Las deficiencias de factor VII presentan síntomas de severidad variable, no correlacionados, a veces, con el nivel de factor, estando descrita la hemorragia intracraneal en formas severas. Fenómenos trombóticos han sido asociados con afibrinogenemias y déficit de factor VII.

La administración del factor deficiente, como en la hemofilia, es el tratamiento fundamental, pero existen pocos productos específicos y su dosis óptima no está bien establecida. Así, deberemos recurrir al plasma fresco congelado en el déficit de factor V, a concentrados protrombóticos o concentrados de factor IX-X en las deficiencias de protrombina y de factor X, y a concentrados específicos para el déficit de fibrinógeno y factor VII. El tratamiento profiláctico sólo es utilizado en algunas formas severas de déficit de factor X, algunos déficit de fibrinógeno y recientemente en déficit severos de factor VII.

En segundo lugar trataremos los déficit adquiridos de la vía común y extrínseca de la coagulación. El hígado es el principal órgano de síntesis de los factores de coagulación; la protrombina, y los factores VII y X son de síntesis exclusivamente hepática y precisan de la acción de la vitamina K para ser funcionales. El fibrinógeno y el factor V también se sintetizan en el hígado, sin participación de la vitamina K.

La cirrosis hepática, las hepatitis, las alteraciones del parénquima hepático y las enfermedades infiltrativas pueden conducir a un déficit en la síntesis de proteínas plasmáticas relacionadas con la hemostasia.

La vitamina K interviene en la síntesis de los factores II, VII, IX y Xa través de la carboxilación de los residuos glutámico de la región N terminal de la cadena peptídica. En ausencia de vitamina K, los factores se sintetizan, pero son inactivos. Estados deficitarios en vitamina K se producen: *a)* por falta de aporte, en alcohólicos, en pacientes ingresados en UCI y en recién nacidos; *b)* por defectos de absorción, en pacientes con alteraciones cuantitativas y/o cualitativas de la mucosa intestinal, y *c)* por defectos de síntesis, secundarios a fármacos fundamentalmente dicumarínicos, aunque otros fármacos como las cefalosporinas también son capaces de inhibir la γ -carboxilación de los residuos glutámicos de los factores de la coagulación vitamina K dependientes.

Analizaremos la implicación de la vía extrínseca y común de la coagulación en pacientes con coagulación intravascular diseminada. Por ser la generación de trombina mediada por la unión del factor tisular a su ligando, el factor VII, el hecho central en la mayoría de los pacientes.

Por último, abordaremos los déficit adquiridos aislados secundarios a infecciones, neoplasias, hematopatías y a fármacos.

DEFICIENCIA DE FACTOR VII: EPIDEMIOLOGÍA, BASES MOLECULARES, CLÍNICA Y TRATAMIENTO

V. JIMÉNEZ YUSTE, T. COBO, A. VILLAR,
M. QUINTANA, R. CHAVES
Y F. HERNÁNDEZ-NAVARRO

Centro de Coagulopatías. Hospital Universitario La Paz. Madrid.

Introducción

El déficit de factor VII (FVII) es una coagulopatía heredada de forma autosómica recesiva con una prevalencia estimada en las formas graves de 0,5 a 1 caso por cada millón¹. La deficiencia conocida desde 1951, es la más común dentro de las denominadas coagulopatías autosómicas recesivas con una frecuencia del 0,5 al 1% de las deficiencias congénitas (tabla 1)^{2,3}.

El espectro de las manifestaciones clínicas es muy variable, no existiendo una correlación estrecha entre los niveles plasmáticos de FVII y la tendencia hemorrágica⁴. A continuación se revisarán los conocimientos actuales en la clínica, tratamiento y alteraciones genéticas ligadas a la deficiencia del FVII de la coagulación.

El papel del FVII en la coagulación

El FVII es una glucoproteína vitamino-K dependiente sintetizada a nivel hepático con un peso molecular de 50 kDa. En condiciones fisiológicas tras un daño a nivel vascular, el FVII se une a una proteína transmembrana como es el factor tisular (FT), iniciándose así el proceso de la coagulación. La unión del FVII al FT y la subsecuente generación de la serinproteasa, el FVIIa, conducen a la formación del complejo FT-FVIIa que inicia la denominada vía extrínseca de la coagulación. Sin embargo, aún es desconocido el mecanismo exacto por el cual el FVII se convierte en FVIIa⁵.

La mayoría del FVII circula a nivel plasmático como una única cadena, la forma de cimógeno inac-

tivo, en una concentración aproximada de 10 nmol/l (0,5 µg/ml) y una pequeña cantidad (aproximadamente entre 10 y 110 pmol/l) circula en la forma activada de doble cadena, conformada por una cadena ligera y otra pesada⁶. La conversión de cadena simple en una doble, se realiza a través de la rotura de la unión peptídica entre la arginina 152 y la isoleucina 153, dando origen a una cadena ligera de 20 kDa y una pesada de 30 kDa.

El inhibidor fisiológico más importante del complejo FT-FVIIa es el inhibidor de la vía del factor tisular (IVFT). El IVFT forma parte de la familia de inhibidores de Kunitz⁷ con un peso molecular de 32 kDa y una molécula de 276 aminoácidos, circula en plasma asociado a lipoproteínas en una concentración baja de 60-180 ng/ml. El IVFT es sintetizado por los megacariocitos y las células endoteliales, y la liberación desde las células endoteliales se ve incrementada tanto por la heparina como por varios agonistas plaquetarios.

Bases moleculares de la deficiencia de FVII

El gen del FVII (*F7*) se localiza en el brazo largo de cromosoma 13 en 13q34, cercano al gen del factor X de la coagulación. El gen *F7* tiene una longitud aproximada de 12 kb de ADN y esta constituido por nueve exones que sintetizan una proteína madura de 406 aminoácidos (fig. 1). El gen *F7* presenta una homología en su secuencia de aminoácidos con otras proteínas vitamino-K dependientes (residuos -17 a -1), lo que parece tener una importancia esencial para la gamma-carboxilación dependiente de vitamina K⁸.

La actividad del FVII en plasma se ve influenciada por factores genéticos y ambientales. Entre estos últimos destacan la cantidad de grasas en la dieta, el nivel de triglicéridos en plasma, la edad, obesidad, diabetes y en mujeres la utilización de anticonceptivos. Dentro de los factores genéticos destacan la influencia de los diferentes polimorfismos del gen *F7*. El gen *F7* contiene unos seis polimorfismos implicados en la variabilidad de los niveles plasmáticos de actividad del FVII. Esta variación se estima que puede llegar a ser hasta de un 30%.

Los conceptos actuales de inicio y desarrollo del proceso de la coagulación han conducido a especular que la ausencia total de FVII es incompatible con la vida. El modelo murino de deficiencia de FVII, con una ausencia total de factor, apoyan de forma fehaciente esta hipótesis. A pesar de que los ratones se desarrollan durante el período fetal a término, fallecen nada más nacer debido a complicaciones hemorrágicas graves a nivel abdominal y del sistema nervioso central⁹. En contra de esta hipótesis existen casos en la literatura médica que avalan la compatibilidad con la vida aún con ausencia total FVII en plasma¹⁰.

La página Web en la cual se hayan incluidas las mutaciones que afectan al gen *F7* (<http://euro->

Tabla 1. Características generales de las coagulopatías heredadas de forma autosómica recesiva

Deficiencia	Prevalencia	Gen en el cromosoma
Fibrinógeno	1:1.000.000	4
Protrombina	1:2.000.000	11
Factor V	1:1.000.000	1
Factor V + VIII	1:1.000.000	18
Factor VII	1:500.000	13
Factor X	1:1.000.000	13
Factor XI	1:1.000.000	4
Factor XIII	1:2.000.000	6 (subunidad A) Y 1 (subunidad B)

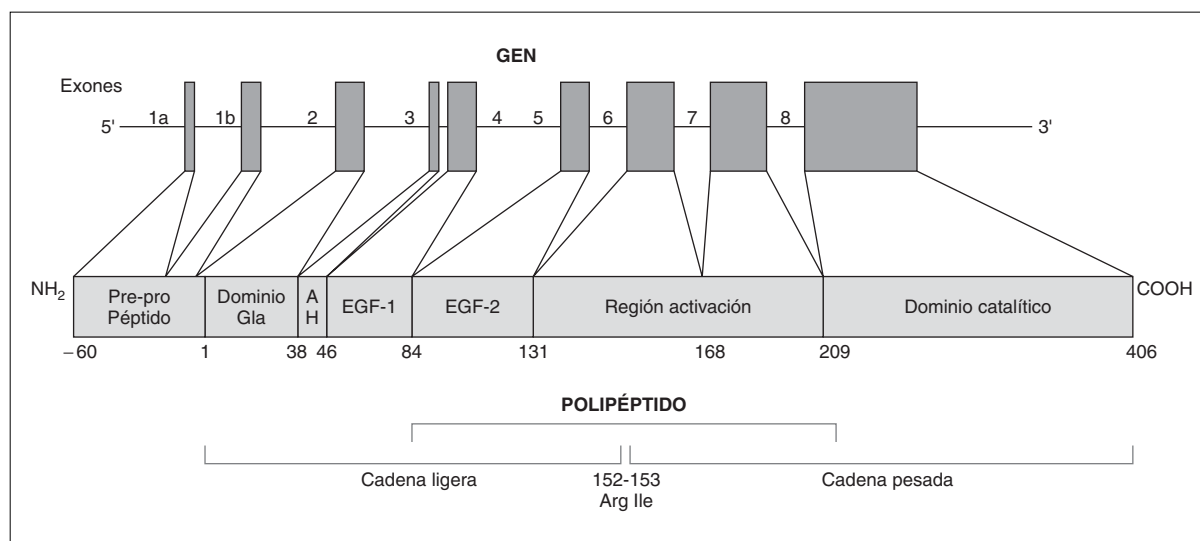


Figura 1. ¡¡¡OJO!!! FALTA PIE.

pium.csc.mrc.ac.uk) tiene registradas algo más de 120 mutaciones. La mayoría de ellas afectan a dominio catalítico, que es codificado por los exones 6, 7 y 8. Dentro del tipo de mutación las sustituciones de un único nucleótido son las más frecuentes (tabla 2)⁶.

Es difícil conocer el mecanismo exacto por el cual muchas mutaciones producen un determinado fenotipo dado que sólo un pequeño número de mutaciones que afectan al gen del F7 se han podido expresar *in vitro*. En un intento de conocer y predecir el efecto de determinadas mutaciones se han desarrollado modelos estructurales. A través de estos modelos se pretende conocer como mutaciones que deberían estar asociadas a fenotipos graves se comportan de forma inexplicada con una tendencia hemorrágica moderada.

Determinación de los niveles plasmáticos de FVII

La determinación de la actividad procoagulante del FVII (FVII:C) se realiza de forma tradicional mediante un método en una etapa dependiente del FT (tromboplastina). El FT obtenido de diferentes especies conduce a una importante variabilidad de la sensibilidad de la técnica. Para determinación de niveles de FVII:C en pacientes con déficit, la utilización de una tromboplastina humana parece expresar de forma más real los niveles de FVII:C, mientras que un FT extraído de conejo infraestima estos niveles y con el uso de tromboplastina de origen bovino se produce una sobrestimación de la tasa de FVII:C¹¹. Actualmente existen de forma comercial FT humano obtenido por tecnología recombinante, siendo éste el FT recomendado para el diagnóstico correcto de niveles bajos de FVII:C¹. Existen también métodos cromogénicos para determinar los niveles de FVII:C,

aunque a diferencia del método coagulativo ha sido poco validado en el diagnóstico de pacientes con déficit de FVII¹².

Dada la pequeña cantidad de FVII que se convierte en FVIIa en los métodos funcionales, el FVII:C mide tanto el zimógeno inactivo (FVII) como el FVIIa preformado. Se estima que entre el 8 y el 30% de la actividad del FVII:C medida en los métodos que utilizan FT de conejo o bovino es atribuible al FVIIa, mientras que el restante 70 al 92% es debido a su zimógeno¹³.

Diferentes técnicas han sido desarrolladas para la determinación de la concentración antigénica de FVII (FVII:Ag). Los antiguos electroinmunoensayos y radioinmunoensayos han sido sustituidos en la rutina por métodos basados en técnicas de ELISA (análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas). En comparación con los niveles de FVII:C, los pacientes son descritos como casos con cantidades

Tabla 2. Mutaciones del gen del F7

	Casos descritos
<i>Localización de la mutación</i>	
Región promotora	6
Región pre-pro-péptido	9
Dominio Gla	7
Dominio EGF-1	9
Dominio EGF-2	10
Región activación	8
Dominio catalítico	61
<i>Tipo de mutación</i>	
Mutación en promotor	6
Mutación región unión	17
Mutación sin sentido	6
Mutaciones puntuales	77
Inserciones/delecciones	14

Tabla 3. Manifestaciones clínicas más frecuentes en la deficiencia de FVII en orden decreciente de frecuencia

Metrorragias
Epistaxis
Sangrado postextracción dental
Hemartrosis
Equimosis
Hematomas musculares
Hematuria
Sangrado en sistema nervioso central
Melena

de FVII:Ag: VII- (CRM- o disminuidas), VIIR (balanceadas) y VII+ (CRM+ o aumentadas). Los casos VII+ son debidos a mutaciones puntuales que causan síntesis de una cantidad normal de proteína con función procoagulante disminuida. En algunas variantes genéticas el nivel antigénico de FVII es normal o por encima de la normalidad a pesar de una cantidad indetectable o muy baja de FVII:C. La ratio del FVII:Ag/FVII:C ha sido utilizada para la estimación del riesgo de portador de la mutación¹⁴.

La determinación directa de FVIIa puede ser útil en aquellos casos en los existen discrepancias entre FVII:C y FVII:Ag, debidas a la activación del FVII. Un primer método de determinación utilizaba una molécula mutada de FT dando origen a un FT soluble incapaz de promover la conversión de FVII a FVIIa, pero con capacidad de cofactor para FVIIa en el método coagulativo en una etapa¹⁵. Un segundo método de determinación de FVIIa se basa en métodos inmunológicos utilizando un anticuerpo con alta especificidad para FVIIa. Se han descrito discrepancias entre ambos métodos a la hora de medir los niveles endógenos basales de FVIIa en plasma. La razón para esta discrepancia no es conocida, pero la lectura que se extrae de estos resultados es la existencia de trazas demostrables de FVIIa en el plasma en condiciones normales.

Manifestaciones clínicas

Un aspecto fundamental que caracteriza la clínica de la deficiencia de FVII es la pobre relación entre niveles plasmáticos de factor y la aparición de complicaciones hemorrágicas. Así como en la hemofilia en la que los niveles residuales de FVIII y FIX constituyen un parámetro que permite predecir la aparición de clínica hemorrágica tanto espontánea como producida tras trauma o cirugía, en el caso de la deficiencia de FVII esta relación no es tan estrecha, existiendo en la literatura especializada pacientes con niveles plasmáticos inferiores al 2% con total ausencia de clínica hemorrágica^{1,11}. A juzgar por las descripciones de diferentes autores en la literatura médica se debe asumir que la aparición de sangrado es difícil de que aparezca, inclusive en cirugía, con niveles de FVII:C superiores al 15%^{11,16}.

Otro aspecto interesante de la clínica de la deficiencia de FVII es el amplio espectro de la localización de las hemorragias. En la tabla 3 quedan reflejadas las manifestaciones hemorrágicas más frecuentes de los pacientes con deficiencia de FVII.

Diagnóstico de la deficiencia de FVII

El diagnóstico de la deficiencia de FVII se inicia en un varón o mujer con clínica de equimosis, epistaxis repetidas, sangrado tras extracciones dentales, o sangrado musculoesquelético o debido a detección de un tiempo de protrombina alargado. El paciente tipo con déficit de FVII presenta un alargamiento del tiempo de protrombina que corrige tras la mezcla 1:1 con plasma normal. El tiempo de cefalina y otros tests de coagulación son normales. Si se detecta de forma repetida una disminución de los niveles de FVII:C con determinación de FII:C, FX:C y fibrinógeno funcional normal, el paciente es diagnosticado de deficiencia de FVII. El estudio de otros miembros de su familia en primer grado puede identificar otros pacientes homocigotos con los mismos niveles que el paciente y familiares heterocigotos con niveles más elevados de FVII pero con valores inferiores a la normalidad, confirmando así el carácter hereditario de la deficiencia de FVII. Otros análisis a realizar en estos pacientes es la estimación del nivel de FVII:Ag¹¹.

Deficiencia adquirida de FVII

La deficiencia adquirida de FVII se observa en diferentes patologías pero sobre todo en aquellas en las cuales existe una enfermedad hepática subyacente o de utilización de anticoagulantes orales (antagonistas de la vitamina K). Aunque de forma extremadamente infrecuente se han descrito casos de deficiencia adquirida de FVII debido a la aparición de autoanticuerpos debido a neoplasia, autoinmunidad o fármacos¹⁷.

Trombosis y deficiencia de FVII

Un dato añadido al amplio espectro clínico de sangrado en los pacientes con déficit de FVII, es la descripción de diferentes casos de trombosis asociados a la deficiencia. Se ha especulado con la posibilidad de que los pacientes con deficiencia de FVII produzcan una proteína de FVII que es incapaz de unirse al IVFT, uno de los inhibidores fisiológicos de la coagulación más importantes⁶. En un reciente estudio realizado se demuestra que no existe de forma específica un fenotipo de FVII o de mutación tendente a la trombofilia en los pacientes con deficiencia de FVII y fenómenos trombóticos. Asimismo se observa que la deficiencia grave de FVII no ofrece una protección frente a fenómenos trombóticos asociados a factores de riesgos, como la cirugía o tratamiento sustitutivo. Esta es la razón por la cual se debe valorar de forma precisa la necesidad y dosis del tratamiento sustitutivo en cirugía de los pacientes deficientes en FVII¹⁸.

Manejo de los episodios hemorrágicos

No existen recomendaciones específicas en el tratamiento de la deficiencia de FVII. En casos de niños y pacientes adultos no tratados previamente con deficiencia moderada-grave, el factor VIIa recombinante (rFVIIa) es probablemente la opción terapéutica de elección³.

Aspectos farmacocinéticos de la deficiencia de FVII

La vida media del FVII es de aproximadamente de unas 5 h, pero en caso de sangrado puede ser menor de 3 h. A diferencia de otros trastornos hemorrágicos congénitos como la hemofilia A o B en los cuales son necesarios niveles elevados de factor en plasma para obtener una hemostasia adecuada, en los pacientes con deficiencia de FVII necesitan un nivel superior 0,10-0,15 unid/ml para obtener hemostasia incluso en casos de cirugía. El tratamiento sustitutivo puede realizarse con plasma fresco congelado, concentrado de complejo protrombínico con suficientes cantidades de FVII, concentrados de FVIII plasmático o rFVIIa^{3,6,11}.

Plasma fresco congelado

La cantidad de FVII contenido en plasma al igual que el resto de los factores de la coagulación es por definición de 1 U/ml. A pesar de que el plasma ha sido utilizado durante muchos años como tratamiento de los episodios hemorrágicos en pacientes deficientes de FVII existe poca información en relación con su eficacia¹¹. Las desventajas de su utilización son la vida media corta del FVII que condiciona la administración repetida de plasma, la dificultad de administración de forma rápida para detener hemorragias graves y problemas relacionados con la sobrecarga de volumen asociada a la transfusión de plasma. Por otro lado, las técnicas utilizadas en la inactivación viral del plasma, como el tratamiento con azul de metileno, condicionan una disminución en la concentración de diferentes factores de coagulación contenidos en el plasma. Esto hace que los niveles de FVII del plasma sean sensiblemente inferiores a la unidad por mililitro.

Concentrados del complejo protrombínico

Los concentrados del complejo protrombínico contienen FVII como parte integrante del complejo y han sido utilizados en el control de episodios hemorrágicos de los pacientes deficientes de FVII. La cantidad de FVII contenido en estos preparados es diferente, por ello debe prestarse atención a la concentración de FVII indicada en el prospecto del producto a utilizar. Muchos de los concentrados utilizados presentan cantidades activadas de FVII, FIX y FX y es por lo que se recomienda su uso con especial precaución dado que han sido descritas en la literatura médica cuadros de trombosis arterial y venosa asociadas con su uso. Por ello no se recomienda su administración en pacientes con hepatopatía, en casos de grandes traumatismos y en neonatos³.

Concentrados de FVII

Diferentes tipos de concentrados de FVII han sido utilizados de forma eficaz en el control de los episodios hemorrágicos de los pacientes deficientes de FVII o como profilaxis durante cirugía. A pesar de su utilización, no existe un consenso en las dosis óptimas a utilizar, con buenos resultados publicados con una amplia variedad de dosis. En cirugía se han descrito dosis que varían entre 8 a 40 U/kg cada 4-6 h durante 10 días¹⁹. Sin embargo se acepta de forma general, que se deben mantener niveles de FVII:C superiores a 0,2 U/ml durante procedimientos quirúrgicos mayores y realizar una monitorización cautelosa para evitar niveles valle demasiado bajos y especialmente niveles pico elevados con el objeto de prevenir la aparición de complicaciones trombóticas⁶. Concentrados de FVII han sido también utilizados de forma eficaz en la profilaxis de episodios hemorrágicos en niños con deficiencia grave de FVII a dosis entre 10-50 U/kg, de una a tres veces en semana. Aunque esta pauta parece del todo ilógica si tenemos en mente la vida media tan corta del FVII, en la práctica parece ser eficaz¹⁹.

FVII activo recombinante (rFVIIa)

Diferentes estudios han demostrado que rFVIIa es un tratamiento seguro en los pacientes con deficiencia de FVII²⁰⁻²⁴. Actualmente, su próxima autorización por parte de las autoridades sanitarias europeas como indicación de su uso en la deficiencia de FVII y a la luz de las diferentes experiencias clínicas, convierten al rFVIIa en la alternativa terapéutica de elección en el tratamiento de los pacientes con deficiencia de FVII.

La experiencia mayor descrita proviene de Mariani et al²², donde un total de 17 pacientes la mayoría con deficiencia grave de FVII (< 0,01 U/ml) fueron tratados con rFVIIa. De estos 17 pacientes, siete fueron sometidos a procesos quirúrgicos mayores y 15 presentaron hemartrosis. La dosis utilizada varió desde 9,09 a 70,59 µg/kg, con una dosis media de 20 µg/kg. En el grupo de las hemartrosis, 15 de ellas fueron tratadas con una única dosis de rFVIIa, con buenos resultados en todas excepto uno de los episodios. Más de una dosis necesitaron cuatro de la hemartrosis, pero el tratamiento fue considerado satisfactorio. En este estudio un total de 7 procesos quirúrgicos fueron tratados con rFVIIa sin objetivarse complicaciones hemorrágicas. La dosis de rFVIIa fue administrada cada 2-3 h en las primeras 24 h y posteriormente cada 3-8 h durante el período postoperatorio hasta que se consideró que el riesgo de sangrado había disminuido. Otros grupos han descrito la eficacia de la utilización de rFVIIa en diferentes episodios hemorrágicos²⁰⁻²⁴, en general una dosis de 20-25 µg/kg cada 4-6 h parece ser eficaz en el tratamiento de los episodios hemorrágicos y la profilaxis quirúrgica³. En cuanto a la duración de la administración depende de la indicación del trata-

miento, aunque algunos episodios pueden necesitar una única administración. Los pacientes con dosis de 20 µg/kg cada 6 h, esta pauta produce niveles pico de FVII plasmáticos de 4,3 a 8,3 U/ml con niveles valle de 0,3 U/ml³. En un caso de utilización de dosis accidentales suprafiológicas se ha asoció a la aparición de anticuerpos frente al FVII.

Es importante destacar que en niños y mujeres gestantes el rFVIIa presenta un aclaramiento mayor por lo que en estas situaciones se necesitarían administraciones más frecuentes o la utilización de infusión continua. Probablemente en estas situaciones en las cuales se requiere una administración más frecuente de rFVIIa, el modo de administración más adecuado sea la infusión continua²⁰.

Asimismo es de destacar la reciente publicación de su utilización en profilaxis de los episodios hemorrágicos de los pacientes con deficiencia de FVII, que es capaz de controlar las complicaciones hemorrágicas de estos pacientes a pesar de su vida media tan corta, con administraciones 2 o 3 veces semanales por un mecanismo de acción aún no aclarado²⁴.

Consideraciones finales

La deficiencia congénita de FVII es una coagulopatía heredada de forma autosómica recesiva con una frecuencia estimada de 1 caso cada 5.000.000, lo que la convierte en la coagulopatía más frecuente de las denominadas autosómicas recesivas con una frecuencia del 0,5 al 1 % de las deficiencias congénitas. La clínica es heterogénea y sin una estrecha relación con los niveles plasmáticos de FVII:C, aunque niveles superiores a 0,10-0,15 U/ml no suelen estar asociados a complicaciones hemorrágicas y permiten una cirugía segura. El diagnóstico de la deficiencia de FVII se realiza en un varón o mujer con clínica hemorrágica o debido a detección de un tiempo de protrombina alargado que corrige tras la mezcla 1:1 con plasma normal y con el tiempo de cefalina y otros tests de coagulación normales. La detección de una disminución de los niveles de FVII:C con determinación de FII:C, FX:C y fibrinógeno funcional normal confirman el diagnóstico de deficiencia de FVII. En el manejo terapéutico de los episodios hemorrágicos y en la profilaxis quirúrgica se han utilizado diferentes alternativas, pero en el momento actual el factor VIIa recombinante es probablemente el tratamiento de elección en los pacientes con deficiencia de FVII.

Bibliografía

1. Peyvandi F, Mannucci PM, Asti D, Abdoullahi M, Di Rocco N, Sharifan R. Clinical manifestations in 28 Italian and Iranian patients with severe factor VII deficiency. *Haemophilia* 1997;3:242-6.
2. Alexander G, Goldstein R, Landwerh G, Cook CD. Congenital SPCA deficiency: A new hitherto unrecognized coagulation defect with hemorrhage rectified by serum and serum fractions. *J Clin Invest* 1951;30:596-608.
3. Perry DJ. Factor VII deficiency. *Br J Haematol* 2002;118:689-700.
4. Ragni MV, Lewis JH, Spero JA, Hasiba U. Factor VII deficiency. *Am J Hematol* 1981;10:79-88.

5. Hoffman, Monroe DM. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost* 2001;85:958-65.
6. Perry DJ. Factor VII deficiency. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003;14: S47-S54.
7. Van der Logt CP, Reitsma PH, Bertina RM. Intron-exon organization of the human gene coding for the lipoprotein-associated coagulation inhibitor: the factor Xa dependent inhibitor of the extrinsic pathway of coagulation. *Biochemistry* 1991;30:1571-7.
8. McVey JH, Boswell E, Mumford AD, Kemball-Cook G, Tuddenham EGD. Factor VII deficiency and the FVII mutation database. *Human mutation* 2001;17:3-17.
9. Rosen ED, Chan JC, Idusogie E, Clotman F, Vlasuk G, Luther T, et al. Mice lacking factor VII develop normally but suffer fatal perinatal bleeding. *Nature* 1997;390:290-4.
10. Peyvandi F, Mannucci PM, Jenkins PV, Lee A, Coppola R, Perry DJ. Homozygous 2bp deletion in the human FVII gene: A non-lethal mutation that is associated with a complete absence of circulating factor VII. *Thromb Haemost* 2000;84:635-7.
11. Ingerslev J, Kristensen HL. Clinical picture and treatment strategies in factor VII deficiency. *Haemophilia* 1998;4:689-96.
12. Awisati G, ten Cate JW, van Wijk EM, Kahle LH, Mariani G. Evaluation of a new chromogenic assay for factor VII and its application in patients on oral anticoagulation treatment. *Br J Haematol* 1980;45:343-52.
13. Morrissey JH. Plasma factor VIIa: measurement and potential clinical significance. *Haemostasis* 1996;26:66-71.
14. Mariani G, Hermans J, Orlando M, Mazzucconi MG, Ciavarella N. Carrier detection in factor VII congenital deficiency. *Br J Haematol* 1985;60:687-94.
15. Morrissey JH, Macik BG, Neuenschwander PF, Comp. PC. Quantitation of activated factor VII levels in plasma using a tissue factor mutant selectively deficient in promoting factor VII activation. *Blood* 1993;81:734-44.
16. Triplett DA, Brandt JT, Batard MA, Dixon JL, Fair DS. Hereditary factor VII deficiency: heterogeneity defined by combined functional and immunological analysis. *Blood* 1985;66:1284-7.
17. Aguilar C, Lucía JF, Hernández P. A case of an inhibitor autoantibody to coagulation factor VII. *Haemophilia* 2003;9:119-20.
18. Mariani G, Hermann FH, Schulman S, Batorova A, Wulff K, Etro D, et al, for the International Factor VII deficiency study group. Thrombosis in inherited factor VII deficiency. *J Thromb Haemost* 2003;1:2153-8.
19. Cohen LJ, McWilliams NB, Neuberger R, Zinkham W, Bauer K, Gribble TJ, et al. Prophylaxis and therapy with factor VII concentrate (human immune), vapor heated in patients with congenital factor VII deficiency: a summary of case reports. *Am J Hematol* 1995;50:269-76.
20. Jiménez Yuste V, Villar A, Morado M, Canales M, Hernández MC, Sanjurjo MJ, et al. Continuous infusion of recombinant activated factor VII during caesarean section delivery in a patient with congenital factor VII deficiency. *Haemophilia* 2000;6:588-90.
21. Ingerslev J, Knudsen L, Hvid I, Tange MR, Fredberg U, Sneppen O. Use of recombinant factor VIIa in surgery in factor-VII-deficient patients. *Haemophilia* 1997;3:215-8.
22. Mariani G, Testa MG, Di Paolantonio T, Molskow Bech R, Hedner U. Use of recombinant, activated factor VII in the treatment of congenital factor VII deficiencies. *Vox Sang* 1999;77:131-6.
23. Scharrer I. Recombinant factor VIIa for patients with inhibitors to factor VIII, factor IX or factor VII deficiency. *Haemophilia* 1999;5:253-9.
24. Mathijssen NC, Masereeuw R, Verbeek K, Lavergne JM, Costa JM, Van Herede WL, et al. Prophylactic effects of recombinant factor VIIa in factor VII deficient patients.

DIÁTESIS HEMORRÁGICAS DE LAS DEFICIENCIAS CONGÉNITAS DE LOS FACTORES II, V Y X

A.R. CID, S. HAYA, P. CASAÑA, J.A. AZNAR

Unidad de Coagulopatías Congénitas.
Hospital Universitario La Fe. Valencia.

Introducción

La hemostasia sanguínea comprende un conjunto de mecanismos que posibilitan el control de la pérdida sanguínea tras la lesión de un vaso y al mismo tiempo, una vez restaurada la integridad del vaso, permiten el control de la propagación del coágulo por mecanismos anticoagulantes. La función del control del sangrado se lleva a cabo por el mecanismo de hemostasia primaria, en el que desempeñan un papel

primordial las plaquetas y el factor Von Willebrand y posteriormente por la acción de los distintos factores de la coagulación hasta la formación de fibrina.

El esquema clásico de coagulación por el que la activación de la vía común se podía alcanzar tanto por la vía intrínseca como extrínseca de forma independiente, se ha mostrado insuficiente para explicar los procesos de coagulación, y se ha demostrado la interacción de las dos vías y la importancia de las superficies celulares¹. Sin embargo, hoy en día se sigue considerando que uno de los pasos más importantes en el conjunto de los procesos de coagulación sanguínea es la formación de trombina.

La formación de trombina se suele producir inicialmente a partir de la acción de la vía extrínseca (complejo factor tisular-factor VII activado [FT-FVIIa]). Las pequeñas cantidades de trombina así formadas, actúa sobre los factores V, VIII y XI (FV, FVIII y FXI) activándolos y produciendo un mecanismo de amplificación en la generación de trombina. La trombina generada en mayores cantidades posibilita la transformación del fibrinógeno en fibrina.

En ambos momentos del proceso de formación de trombina interviene la conocida vía común de la coagulación. La formación de trombina se produce a partir de su precursor la protrombina o factor II (FII) de la coagulación. La protrombina precisa de la acción del factor X (FX), el cual es activado tanto a partir de la vía extrínseca como la intrínseca de la coagulación. Cuando el factor X activado (FXa) interacciona con el factor V activado (FVa), fosfolípidos y calcio, formando el denominado complejo protrombinasa, la formación de trombina se produce más rápidamente que cuando sólo actúa el FXa.

Las deficiencias de los factores de coagulación que intervienen en la vía común de la coagulación pueden conllevar un problema hemorrágico, en algunos casos grave. Trataremos las deficiencias congénitas de estos factores de la coagulación.

Deficiencia congénita del FII de la coagulación o protrombina

La deficiencia congénita de la protrombina o FII fue sospechada inicialmente en 1947 y posteriormente descrita en 1955 y 1962 por Quick². Se trata de una de las deficiencias congénitas de factores de coagulación menos frecuentes. Dentro de las deficiencias de la protrombina podemos distinguir la hipoprotrombinemia en la que tanto la molécula de protrombina como su función se encuentran disminuidas, y la disprotrombinemia que es un defecto funcional caracterizado por la discrepancia entre la cantidad de molécula y su funcionamiento.

La protrombina es una glucoproteína de unos 71.600 Da de peso molecular y una composición conocida de 579 aminoácidos. Es sintetizada en el hepatocito en presencia de vitamina K y tiene una vida media larga, de aproximadamente 70 h. Está compuesta por cinco dominios: el propérido, el domi-

nio Gla, dos dominios "Klinge" 1 y 2 y una zona catalítica o sitio activo³.

La protrombina es activada por el FXa en la superficie de las plaquetas activadas en presencia de FV y calcio. Cuando actúa el complejo protrombinasa se produce inicialmente la escisión de la unión peptídica Arg320-Ile321 produciendo meizotrombina. Esta es posteriormente escindida en la unión Arg271-Thr272 generando el fragmento 1.2 y la α -trombina que es la enzima activa. El proceso es diferente cuando sólo actúa el FXa. Inicialmente se produce la escisión en la unión peptídica Arg271-Thr272 produciendo el fragmento 1.2 y la pretrombina 2. La escisión en la unión Arg 320-Ile321 en la pretrombina 2 produce dos cadenas una de 49 residuos (cadena A) y otra de 259 residuos (cadena B). La trombina escinde su cadena A en la Arg284 generando la forma estable de α -trombina⁴.

Las deficiencias de la protrombina siguen un patrón de herencia autosómico recesivo. Como hemos comentado los defectos de la protrombina pueden dividirse en hipoprotrombinemia o deficiencia de la protrombina tipo 1 y disprotrombinemia o deficiencia de la protrombina tipo 2. Ambas pueden ser deficiencias homocigotas o heterocigotas. Además en la disprotrombinemia, podemos encontrar casos de heterocigotos dobles o compuestos (asociación entre dos alteraciones diferentes que causan disprotrombinemia o entre una alteración de este tipo junto con otra que causa hipoprotrombinemia)⁵. En las tablas 1 y 2 se muestran distintos casos publicados en la literatura especializada.

El diagnóstico se puede sospechar con los tests rutinarios de laboratorio ya que tanto el tiempo de

Tabla 1. Distintas hipoprotrombinemias homocigotas comunicadas en la literatura médica

Referencia	Año	N.º de casos	Sexo
Quick et al	1947	1	V
Van Creveld	1954	6	4V;2M
Borchgrevinck et al	1959	1	M
Josso et al	1962	1	V
Livingstone and Johstone	1963	1	V
De Bastos et al	1964	3	2V;1M
Girolami et al	1969	1	M
Kattlove et al	1970	2	1V;1M
Girolami et al	1970	1	V
Girolami et al	1970	1	V
Ikkala et al	1971	1	M
Nemerson	1972	1	V
Baudo et al	1972	1	V
Piña-Cabral et al	1973	1	V
Gill et al	1978	1	M
Montgomery et al	1978	1	V
Valls de Ruiz et al	1987	1	M
Poort et al	1994	6	4 V;2M
Akhavan et al	2000	10	6 M;4V

V: varón; M: mujer.

Tabla 2. Distintas disprotrombinemias descritas en la literatura médica

Referencia	Nombre	Año	Genotipo	Sexo
Shapiro et al	Cardeza	1969	Heterozigoto	-
Josso et al	Barcelona	1971	Homozigoto/heterozigoto	4V;2M
Girolami et al	Padua	1974	Heterozigoto	4V;1M
Kahn et al	Brussels	1974	Homozigoto/heterozigoto	4V;1M
Shapiro et al	San Juan	1974	Heterozigoto compuesto	5V;2M
Girolami et al	Molise	1978	Heterozigoto compuesto	-
Owen et al	Quick	1978	Heterozigoto compuesto	1M
Bezeaud et al	Madrid	1979	Homozigoto/heterozigoto	2M/2V
Henriksen et al	Quick	1987	Heterozigoto compuesto	-
Poon et al	Birmingham I, II	1979-1981	-	-
Montgomery et al	Denver	1980	Homozigoto/heterozigoto	2V;1M
Weinger	Houston	1980	-	1V
Smith et al	Gainesville	1981	Heterozigoto	2M
Josso et al	Metz	1982	Heterozigoto compuesto	9M;3V
Rubio et al	Habana	1983	Heterozigoto compuesto	3V;1M
Board et al	Camberra	1983	-	-
Bezeaud et al	Salakta	1984	Homozigoto	1M;1V
Huisse et al	Clamart	1985	Heterozigoto	2M
Rocha et al	Segovia	1986	Homozigoto/heterozigoto	2V;1M
Ruiz-Saez et al	Perija	1986	Homozigoto/heterozigoto	2V;2M
Dumont et al	Poissy	1987	Homozigoto/heterozigoto	2V;2M
Miyata et al	Tokushima	1987	Heterozigoto	-
Lutze et al	Magdeburg	1989	Heterozigoto	4V;3M
Morishita et al	Himi	1991	Homozigoto/heterozigoto	3M;1V
Miyata et al	Obihiro	1995	Homozigoto	1V
Friezner et al	Frankfurt	1995	Homozigoto/heterozigoto	2V;2M
O'Marcaigh et al	Corpus Christi	1996	Heterozigoto compuesto	2V;1M
O'Marcaigh et al	Dhahran	1996	Homozigoto/heterozigoto	5M;3V
Henriksen et al	Greenville	1998	Heterozigoto	1V

V: varón; M: mujer.

protrombina (TP) como el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPA) se encuentran alargados junto con un tiempo de trombina (TT) normal. Posteriormente se realizan tests específicos para detectar esta deficiencia. Se pueden utilizar técnicas para determinar la actividad funcional de la proteína como son los métodos de coagulación en uno o dos tiempos o métodos cromogénicos. Junto a éstos también hay métodos que emplean como agentes activados diferentes venenos o estafilocoagulasa. En algunas disprotrombinemias estos últimos tests pueden ser normales. Los análisis inmunológicos revelarán valores mayores de proteína que su función en las disprotrombinemias y similares a los valores funcionales en la hipoprotrombinemia. Los pacientes homocigotos con hipoprotrombinemia presentan una actividad y un nivel antigénico por debajo del 10%. En los heterocigotos los niveles se sitúan entre un 40-60%. En los pacientes con disprotrombinemias la actividad en los homocigotos o heterocigotos compuestos se encuentra entre un 1-20%, mientras que en los heterocigotos está alrededor del 50% con niveles antigénicos normales^{3,5}.

El diagnóstico diferencial debe realizarse básicamente con las deficiencias de vitamina K como la enfermedad hemorrágica del recién nacido, malabsor-

ción, tratamiento o intoxicación con dicumarínicos y similares y la enfermedad hepática. En raras ocasiones se objetiva la presencia de anticuerpos contra la protrombina en pacientes con anticoagulante lúpico³.

El gen de la protrombina se encuentra en el cromosoma 11 y contiene 14 exones y 13 intrones. Algunas mutaciones en las hipoprotrombinemias han sido detectadas como una mutación missense con sustitución de un aminoácido o deleciones de nucleótidos como se muestra en la tabla 3. Las mutaciones descritas en disprotrombinemias son recogidas en la tabla 4. Señalar que un polimorfismo (sustitución de G por A en posición 2021 de la región 3'-UT) ha sido asociado a niveles incrementados de protrombina y a un aumento de la incidencia de trombosis^{4,7}.

Clínicamente los pacientes homocigotos para hipoprotrombinemia suelen presentar manifestaciones hemorrágicas, más frecuentemente en forma de epistaxis, hematomas y equimosis, hemorragias en tejidos blandos y sangrado postoperatorio. En las mujeres son frecuentes las metrorragias y menorragias y el sangrado posparto. Aunque menos frecuentemente también se han descrito hemartros y hemorragias cerebrales. Los pacientes heterocigotos para hipoprotrombinemia suelen ser asintomáticos, aunque se han descritos problemas hemorrági-

cos tras extracciones dentales y cirugía. En el caso de las disprotrombinemias la clínica hemorrágica es más variable y los niveles de proteína no se correlacionan claramente con la clínica. Incluso hay descritas ciertas disprotrombinemias con niveles funcionales de protrombina disminuidos que no presentan clínica hemorrágica^{3,5}.

El tratamiento actual de esta deficiencia se realiza con la administración de plasma fresco congelado (PFC) o concentrados de complejo protrombínico (CCP). El mínimo nivel plasmático hemostático suele situarse en torno al 20 U/dl de FII, pero éste puede ser variable sobre todo en las disprotrombinemias. Si utilizamos PFC, dada la vida media larga de este factor, se puede administrar una dosis inicial de 10-20 ml/kg seguido de 3 ml/kg cada 24 h. Los CCP presentan cantidades variables de varios factores de la coagulación (II, VII, IX y X). Este producto tiene ciertas ventajas sobre el PFC ya que con volúmenes menores podemos conseguir una buena acción hemostática. La dosis se debe calcular de forma individualizada, teniendo en cuenta la deficiencia del paciente y que valores queremos alcanzar y la recuperación *in vivo* del factor. Posteriormente es aconsejable la monitorización de los niveles de FII para ajustar el tratamiento. Con el uso de este producto se han descrito complicaciones tromboembólicas por lo que siempre hay que buscar la mínima dosis terapéutica⁸.

Deficiencias congénitas del FV de la coagulación

Quick fue el primer autor que sospechó la existencia de un factor en plasma necesario para la conversión de la protrombina en trombina. Owren⁹, en 1943, lo identificó, denominándolo FV de la coagulación por ser el quinto factor descubierto.

La deficiencia grave del FV es una enfermedad hemorrágica rara con una frecuencia en torno a 1 en 1.000.000. La deficiencia de este factor sigue una transmisión autosómica recesiva. Pacientes con deficiencia congénita del FV de la coagulación pueden ser divididos en tres grupos: los que presentan tanto una actividad funcional como antigénica indetectables, los que presentan una disminución de ambas y los pacientes con niveles antigénicos mayores que la función de la molécula³.

El FV es una glucoproteína de 330.000 Da sintetizada en los hepatocitos y megacariocitos. Sobre un 75% circula en la sangre como una molécula precursora y el 25% restante se encuentra almacenado en los gránulos α de las plaquetas³.

Tras la secreción, el FV circula como un polipéptido con baja actividad procoagulante. La conversión del FV a su forma activa (FVa) se produce a través de la acción de la trombina y/o del FXa por la escisión de 3 residuos arginina (Arg 709, Arg 1018 y Arg 1545). El FVa actúa como cofactor del FXa que junto con fosfolípidos forman el complejo protrombinasa. En presencia de iones calcio, el

Tabla 3. Defectos moleculares en hipoprotrombinemias congénitas

Referencia	Año	Defecto molecular
Iwahana et al	1992	4177insT
Poort et al	1994	Y44C
O'Marcaigh	1996	Q541X
Tamari et al	1997	7248-7249delG
Poort et al	1997	C138Y
Poort et al	1997	W357C
Poort et al	1998	W569X
Poort et al	1998	1261 C > G
Akhavan et al	2000	R1Q
Akhavan et al	2000	R2W
Akhavan et al	2000	D118Y
Akhavan et al	2000	R220C
Akhavan et al	2000	S354R
Akhavan et al	2000	R538C
Akhavan et al	2000	301-302delK
Akhavan et al	2003	20062-20063delGT

Tabla 4. Defectos moleculares en disprotrombinemias congénitas

Variante/referencia	Defecto molecular
Barcelona/Madrid/Obihiro	R271C
Padua/Dhahran	R271H
Molise/Tokushima	R418W
Quick I/Corpus Christi	R382C
Quick II	G558V
Salakta/Frankfurt	E446A
Himi I	M337T
Himi II	R388H
Camberra	E157L
Greenville	R517Q
Segovia	G319R
Tamari et al	R340W
Akhavan et al	G330S
Akhavan et al	R382H
Denver	Q300K
Denver	Q309K
Sun et al	K556T
Akhavan et al	H562R

complejo protrombinasa, posibilita la conversión de la protrombina en trombina. Esta reacción es 300.000 veces más rápida con respecto a la reacción que se produce cuando actúa sólo el FXa. La contribución fundamental del FVa en el complejo protrombinasa es la retención del FXa en la superficie de la membrana celular, incrementando su afinidad por los fosfolípidos de la bicapa. La proteína C activada (PCA) se une al FVa de forma competitiva con el FXa y lo escinde en tres residuos arginina (Arg 306, Arg 506 y Arg 679) produciendo su inactivación. La plasmina también inactiva la molécula de FVa por la acción en cuatro uniones peptídicas (Lys 309, Lys 310, Arg 313 y Arg 348). La molécula de FV no activada contribuye al au-

Tabla 5. Defectos moleculares en deficiencias congénitas del factor V

Referencia	Año	Genotipo	Defecto molecular
Murray et al	1995	Homozigoto	A221V
Guasch et al	1998	Homozigoto	1303X
Montefusco et al	2000	Homozigoto	2833-2834del
Van Wijk et al	2001	Heterozigoto compuesto	1130-1139del, Y1702C
		Homozigoto	4291-4294del
		Homozigoto	Q773X
		Heterozigoto	K310X
		Heterozigoto	C585R
Castoldi et al	2001	Homozigoto	Y1702C
		Heterozigoto compuesto	Y1702C, desconocida
Xie et al	2001	Homozigoto	1763A > C
Van Wijk et al	2001	Homozigoto/homozigoto	3571C > T (FV Leiden)
Schrijver et al	2002	Homozigoto	1701G > T (E498X)
Schrijver et al	2002	Homozigoto	R2074H
Bossone et al	2002	Homozigoto	R2074C
Ajzner et al	2002	Heterozigoto compuesto	2952delT, 5493insG
Fu et al	2003	Heterozigoto compuesto	G392C, 4887-8delG
Hou et al	2003	Heterozigoto	675delA
Montefusco et al	2003	Heterozigoto compuesto	T1702C, R1606X
		Heterozigoto compuesto	V1813M, R712X
		Heterozigoto compuesto	5127-5128insA, C472G
		Homozigoto	W1854X
		Homozigoto	Y1702C
		Heterozigoto compuesto	R1002X, 6122-6123ins
Duga et al	2003	Homozigoto	R2074C
Asselta et al	2003	Homozigoto	P2070L
		(Mutación de Mary)*	
Asselta et al	2003	Homozigoto	IVS19 + 3A > T
Fu et al	2004	Homozigoto	IVS8-2A > G
		Heterozigoto compuesto	2238-9delAG, G2079V

*Primera paciente descrita por Owren.

mento de la inactivación del FVIIIa por la acción del complejo PCA/proteína S¹⁰.

La molécula de FV es estructural y funcionalmente similar al FVIII. Las dos proteínas comparten la estructura de los dominios A1-A2-B-A3-C1-C2. Su activación conlleva la pérdida del dominio B. El FVa está compuesto por una cadena pesada de 105 kDa (A1-A2) y una ligera de unos 74 kDa (A3-C1-C2)¹¹.

El diagnóstico de la deficiencia de este factor se sospecha, al igual que en la deficiencia de protrombina, ante un alargamiento del TP y TTPA, que se corrigen con la adición de plasma normal absorbido, con un TT normal. Posteriormente se confirma la deficiencia de este factor con tests de coagulación para medir su función coagulante y técnicas inmunológicas para detectar la molécula. Un 25 % del total del FV se encuentra almacenado en las plaquetas y aunque los estudios de funcionalidad plaquetaria en estos pacientes son normales, hasta un tercio pueden presentar un tiempo de hemorragia prolongado. Algunos pacientes con déficit de FV pueden presentar inhibidores los cuales se pueden detectar por que no se corrigen o se prolongan el TP y el TTPA tras mezclar plasma del paciente con plasma normal³.

El diagnóstico diferencial se debe establecer principalmente con las deficiencias adquiridas por la presencia de autoanticuerpos, habitualmente asociados a enfermedades (carcinomas, pancreatitis, tuberculosis pulmonar, etc.), presentándose menos frecuentemente de forma idiopática. Se han descrito anticuerpos inhibidores contra el FV y la trombina en pacientes que reciben trombina bovina tónica ya que esta trombina puede estar contaminada con FV bovino. En hepatopatías graves o en la coagulación intravascular diseminada también existen niveles disminuidos de FV normalmente asociados a descenso de otros factores de la coagulación³.

El gen del factor V se localiza en el cromosoma 1 y posee 25 exones. Desde 1995 se han comunicado numerosas mutaciones presentadas en la tabla 5¹²⁻¹⁴.

Un polimorfismo en el gen del FV que conlleva la sustitución de arginina 506 por glutamina en la molécula, es conocido como FV Leiden. Este es un punto de escisión por la PCA, por lo que los pacientes con este polimorfismo presentan una inactivación del FV Leiden por la PCA 10 veces inferior que el FV normal, siendo los individuos heterocigotos y sobre todo los homocigotos más propensos a sufrir problemas trombóticos. El haplotipo HR2, caracterizado por la

mutación histidina 1299 arginina en la molécula de FV, presentan una resistencia leve a la PCA por alteración de la escisión en la Arg 506 y la Arg 306 y un incremento del riesgo de trombosis venosa. Recientemente se ha publicado que pacientes con FV HR2 y otra alteración del FV, tanto el FV Leiden como deficiencias de FV, aumentan su riesgo trombótico^{10,15}.

Clínicamente los pacientes con niveles de FV inferiores al 1% suelen presentar problemas hemorrágicos graves. Aunque los pacientes con niveles hasta un 10% también pueden tener una tendencia hemorrágica variable, en general los niveles de FV no se correlacionan bien con la gravedad del sangrado, por lo que hay autores que han sugerido que está más relacionada con el FV plaquetario. Pacientes con FV Quebec presentan clínica hemorrágica y se caracterizan por trombocitopenia leve con niveles normales o discretamente disminuidos de FV en plasma pero niveles funcionales de FV plaquetario bajos. Los problemas hemorrágicos en las deficiencias típicas se manifiestan principalmente en forma de equimosis, epistaxis y gingivorragias, menorragia, sangrado gastrointestinal e incluso sangrado tras la caída del cordón umbilical y en el sistema nervioso central. Se ha descrito algún caso de deficiencia del FV de la coagulación con tendencia trombótica³.

La principal arma terapéutica para la deficiencia de FV es el PFC. Generalmente es suficiente alcanzar unos valores mínimos entre 15-30% previo a un procedimiento quirúrgico. Las dosis utilizadas de PFC son inicialmente de 15-20 ml/kg, seguidas de una dosis de mantenimiento de 5-10 ml/kg cada 12-24 h. Aunque no está aclarada su vida media, ya que se ha estimado desde unas 4 hasta 36 h, parece que esta es larga. En caso de no controlar un problema hemorrágico con estas medidas se puede añadir al tratamiento concentrados de plaquetas, teniendo siempre en cuenta que pueden inducir la creación de anticuerpos antiplaquetarios y que es un hemoderivado no inactivado viralmente⁸. Se han comunicado algunos casos del uso de rFVIIa en pacientes con inhibidores o reacciones alérgicas al plasma con resultados variables.

Deficiencias congénitas del FX (factor Stuart-Prower) de la coagulación

Durante los años 50 dos grupos de investigadores descubrieron el FX al estudiar dos pacientes con sospecha de deficiencia del factor VII de la coagulación. Ambos pacientes, Stuart y Prower, aportaron su nombre a la deficiencia del FX de la coagulación o de Stuart-Prower¹⁶.

La deficiencia de este factor sigue una herencia autosómica recesiva. También es poco frecuente en su forma grave, afectando a 1/500.000 personas. Los pacientes homocigotos presentan una deficiencia grave con clínica manifiesta de sangrado, mientras que los heterocigotos pueden presentar manifestaciones hemorrágicas ante procedimientos quirúrgicos. Al igual que en las deficiencias anteriores hay casos con

niveles descendidos tanto de la molécula como de su función (CRM-) y otros en que con cantidades normales de factor este es disfuncionante (CRM+)¹⁶.

El FX es sintetizado en el hígado y es uno de los factores vitamina-K dependientes. Circula en plasma como una glucoproteína de 59.000 Da de peso molecular con una cadena ligera de 17.000 Da y una cadena pesada de 42.000 Da³.

El FX es activado bien por la vía extrínseca, por el complejo FT-FVIIa o por la vía intrínseca, complejo FIXa/FVIIIa con fosfolípidos e iones calcio. En ambos casos se produce la escisión de la unión peptídica arginina 194-isoleucina 195 de la cadena pesada. Tanto la cadena pesada como la ligera del FVa interactúan con el FXa. Como hemos visto anteriormente según si actúa sólo el FXa o el complejo protrombina se produce una escisión diferente en la molécula de protrombina, aunque el producto final sea igualmente la producción de α -trombina. La diferencia radica en que cuando interviene el complejo protrombina la generación de trombina es mucho más rápida que si sólo interviene el FXa. El mayor inhibidor de la vía extrínseca es el inhibidor de la vía del factor tisular dependiente de FXa. Éste forma un complejo con el FXa el cual se une al complejo FT-FVIIa formando una estructura cuaternaria y produciendo la inhibición. El FXa es inhibido por la antitrombina III, siendo esta reacción acelerada por la presencia de heparina^{3,16}.

El diagnóstico de laboratorio se sospecha ante un TP y TTPA alargado con un TT normal. El tiempo de veneno de víbora de Russell, que activa el FX directamente, suele estar alterado aunque ha sido normal en algunas variantes. Posteriormente se confirma con tests específicos para medir la función del FX e inmunológicos para cuantificar la cantidad de molécula^{3,16}.

El diagnóstico diferencial incluye la enfermedad hepática y las deficiencias de vitamina K por malabsorción o ingesta de dicumarínicos o análogos, en la que están afectados otros factores vitamina-K dependientes. Hay escasas publicaciones de deficiencias adquiridas secundarias a la presencia de un inhibidor contra el FX y es frecuente la asociación de esta deficiencia con algunas infecciones (lepra, micoplasma) y sobre todo con la amiloidosis por unión del factor a las fibras amiloides^{3,16}.

El gen del FX se encuentra en el brazo largo del cromosoma 13 y está compuesto por 8 exones y 7 intrones. Tanto la estructura del gen como la secuencia de aminoácidos muestran gran similitud con otros factores de la coagulación vitamina-K dependientes, sugiriendo su origen común. Numerosas alteraciones genéticas han sido encontradas en las distintas variantes de la deficiencia de este factor como se muestra en la tabla 6¹⁷⁻¹⁸.

La severidad de la clínica hemorrágica en estos pacientes parece estar asociada al nivel de factor. Los pacientes con deficiencias graves pueden presentar todo tipo de hemorragias mucosas (epistaxis, me-

Tabla 6. Variantes y defectos moleculares en las deficiencias del factor X

Variante/autor	Genotipo	Defecto molecular
Friuli	Homozigoto	P343S
Ketchikan	Homozigoto	E14K
Malmö	Heterozigoto	E26B
Marseille	Homozigoto	S334P
Öckero	Homozigoto	G114R
Prower	Heterozigoto doble	B282N, R287W
Roma	Homozigoto	T318M
St. Louis	Homozigoto	E7G
San Antonio	Heterozigoto doble	814delC, R326C
Santo Domingo	Homozigoto	G20R
Stockholm	Heterozigoto	B282N
Stuart	Homozigoto	V246M
Viagoya 1	Homozigoto	R306C
Viagoya 2	Heterozigoto	G366S
Viena	Homozigoto	G204E
Vorarlberg	Homozigoto	E14G
Wenatchee I	Heterozigoto doble	R139C, B57T
Wenatchee II	Heterozigoto	B57T
Frankfurt I	Heterozigoto	E25K
Odom et al	Heterozigoto doble	H383Q, Y421R
	Heterozigoto doble	W421R, H383Q
Marchetti et al	Heterozigoto doble	S334P, E102K
Peyvandi et al	Homozigoto	R(-1)T
	Homozigoto	G78B
	Homozigoto	C81Y
	Homozigoto	G94R
	Homozigoto	B95E
	Homozigoto	G222B
	Homozigoto	IVS1 + 3 AT
	Homozigoto	IVS2-3 TG
Padua 4	Homozigoto	C350F
Leicester	Homozigoto	I411F
Au et al	Heterozigoto doble	33-34delGC, F71S
Pinotti et al	Heterozigoto	V342A

Tabla 7. Déficit combinados de factores de la coagulación

Tipo	Factores deficitarios
I	V, VIII
II	VIII, IX
III	II, VII, IX, X
IV	VII, VIII
V	VIII, IX, XI
VI	IX, XI
VII	VII, XII

trorragias, sangrado gastrointestinal), sangrado tras la caída del cordón umbilical y aunque no tan frecuentes como en pacientes con hemofilia A o B, no son raros los hematomas y hemartros que pueden llegar a producir artropatía. En pacientes heterocigotos el riesgo hemorrágico suele asociarse a intervenciones cruentas^{3,16}.

Los niveles de FX necesarios para alcanzar hemostasia no son claramente conocidos, aunque se sugiere que niveles entre 10-35% son suficientes. El tra-

tamiento de esta deficiencia se puede realizar con PFC a dosis iniciales de 15-20 ml/kg seguido de 3-6 ml/kg cada 24 h, ya que la vida media del FX es de 40 h. Una segunda opción es la utilización de CCP que presentan concentraciones variables de este factor. Dado que se ha documentado un riesgo especial de problemas tromboticos en estos pacientes cuando se tratan con CCP se recomienda no aumentar los valores de este factor en plasma en más de un 40-50%^{8,16}. Existe en la actualidad concentrados más purificados que contienen FIX y FX (Factor IX/X HS[®]) que pueden ser una buena opción terapéutica. Con todos los tratamientos disponibles es recomendable la monitorización de los valores plasmáticos alcanzados para ajustar las pautas de tratamiento. En pacientes con deficiencia severa y clínica hemorrágica importante se puede realizar tratamiento profiláctico con concentrados de factor IX/X o CCP que se administran una o dos veces a la semana^{19,20}.

Deficiencias combinadas congénitas de factores de la coagulación

Se han descrito diferentes déficits combinados congénitos de la coagulación que son poco frecuentes (tabla 7). Trataremos los que implican a los factores de la vía común de la coagulación.

Deficiencia combinada de FV y FVIII o tipo I

Se trata de la deficiencia combinada más frecuente. Normalmente los pacientes presentan unos niveles concordantes de actividad antigénica y coagulante, situados en torno al 15%. El patrón de herencia es autosómico recesivo. Las alteraciones genéticas de esta deficiencia se suelen encontrar en el cromosoma 18, en el gen *ERGIC-53*. Este gen codifica una proteína chaperona que reside en el compartimiento intermedio del retículo endoplásmico/Golgi e interviene en el transporte intracelular del FV y FVIII. Diferentes mutaciones han sido identificadas en este gen.

La deficiencia se sospecha en pacientes con clínica hemorrágica leve y con un TP y TTPA leve o moderadamente prolongados, confirmándolo con la valoración de los niveles de ambos factores. Clínicamente no suelen presentar sangrado espontáneo, asociándose a problemas hemorrágicos tras extracciones dentarias o cirugía.

El tratamiento consiste en el aporte de FV con PFC y aporte de FVIII con desmopresina o concentrados de FVIII³.

Deficiencia combinada de FII, FVII, FIX y FX o tipo III

Esta deficiencia se suele asociar con niveles reducidos de proteína C, S o proteína Z. Los pacientes con deficiencia de los factores vitamina-K dependientes suelen presentar una clínica hemorrágica más grave que otras deficiencias combinadas, por lo que suelen requerir tratamiento. El empleo de vitamina K sólo ha sido eficaz en ciertos pacientes por la que en ocasiones se ha requerido la utilización de PFC o CCP.

Bibliografía

1. Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1381-9.
2. Quick AJ, Hussey CV. Hereditary hypoprothrombinemia. *Lancet* 1962; i:173-7.
3. Roberts HR, White GC. Inherited disorders of prothrombin conversion. En: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN, editors. *Hemostasis and thrombosis*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001; p. 839-41.
4. Greenberg DL, Davie EW. Blood coagulation factors: their complementary DNAs, genes, and expression. En: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN, editors. *Hemostasis and thrombosis*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001; p. 21-57.
5. Girolami A, Scarano L, Saggiorato G, Girolami B, Bertomoro A, Marchiori A. Congenital deficiencies and abnormalities of prothrombin. *Blood Coag Fibrinol* 1998;9:557-69.
6. Akhavan S, Mannucci PM, Lak M, Mancuso G, Mazzucconi MG, Rocino A, et al. Identification and three-dimensional structural analysis of nine novel mutations in patients with prothrombin deficiency. *Thromb Haemost* 2000;84:989-97.
7. Akhavan S, Luciani M, Lavoretano S, Mannucci PM. Phenotypic and genetic analysis of a compound heterozygote for dys- and hypoprothrombinemia. *Br J Haematol* 2003;120:142-4.
8. Di Paola J, Nugent D, Young G. Current therapy for rare factor deficiencies. *Haemophilia* 2001;7(Suppl 1):16-22.
9. Owren PA. Parahemophilia. Haemorrhagic diathesis due to absence of a previously unknown clotting factor. *Lancet* 1947;1:446-51.
10. Mann KG, Kalafatis M. Factor V: a combination of Dr Jekyll and Mr Hyde. *Blood* 2003;101:20-30.
11. Kane WH. En: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN, editors. *Hemostasis and thrombosis*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001; p. 157-65.
12. Fu QH, Zhou RF, Liu LG, Wang WB, Wu WM, Ding QL, et al. Identification of three F5 gene mutations associated with inherited coagulation factor V deficiency in two Chinese pedigrees. *Haemophilia* 2004; 10:264-70.
13. Fu Q, Wu W, Ding Q, Hu Y, Wang X, Wang H, et al. Type I coagulation factor V deficiency caused by compound heterozygous mutation of F5 gene. *Haemophilia* 2003;9:646-9.
14. Montefusco MC, Duga S, Aseelta R, Malcovati M, Peyvandi F, Santagostino E, et al. Clinical and molecular characterisation of 6 patients affected by severe deficiency of coagulation factor V: broadening of the mutational spectrum of factor V gene and *in vitro* analysis of the newly identified missense mutations. *Blood* 2003;102:3210-6.
15. Faioni EM, Castaman G, Asti D, Lussana F, Rodeghiero F. Association of factor V deficiency with factor V HR2. *Haematologica* 2004;89: 195-200.
16. Perry DJ. Factor X and its deficiency states. *Haemophilia* 1997;3: 159-72.
17. Cooper DN, Millar DS, Wacey A, Pemberton S, Tuddeham EGD. Inherited factor X deficiency: molecular genetics and pathophysiology. *Thromb Haemost* 1997;78:161-72.
18. Au WY, Lam CC, Cheung WC, Kwong YL. Two novel factor X mutations in a Chinese family with factor X deficiency. *Ann Hematol* 2004; 83:304-6.
19. Kouides PA, Kulzer L. Prophylactic treatment of severe factor X deficiency with prothrombin complex concentrate. *Haemophilia* 2001;7: 220-3.
20. McMahon C, Smith J, Goonan C, Byrne M and Smith OP. The role of primary prophylactic factor replacement therapy in children with severe factor X deficiency. *Br J Haematol* 2002;119:789-91.

ALTERACIONES DEL FIBRINÓGENO EN LA HEMOSTASIA

V. VILA, E. RÉGANON Y J. AZNAR

Centro de Investigación y Departamento de Biopatología
Clínica. Hospital Universitario La Fe. Valencia.

Introducción

El fibrinógeno es una glucoproteína plasmática (340 kDa) compuesta por dos subunidades idénticas. Cada subunidad está compuesta por tres cadenas polipeptídicas, A α , B β y γ que se mantienen unidas por puentes disulfuros¹. Las tres cadenas son codificadas por tres genes diferentes, expresados

constitutivamente en los hepatocitos y situados en el cromosoma 4². Las 6 cadenas se organizan en tres dominios globulares que se unen por la zona N-terminal de las cadenas A α , B β y γ formando el dominio central "E". Los dos extremos de cada subunidad contienen la zona C-terminal de las cadenas polipeptídicas B β y γ y constituyen el dominio "D". La zona C-terminal de la cadena A α forma un nódulo globular que tiene la capacidad de asociarse entre sí y con el dominio central "E"⁴. La zona no globular de interconexión de los dominios está formada por 111 aminoácidos de las cadenas A α , y γ , y 112 residuos de la B β . La característica del fibrinógeno de ser una molécula dimerica y simétrica le confiere la capacidad fundamental de hacer de puente entre sus propias moléculas, polimerizándose, o entre moléculas distintas, tanto solubles en circulación como insertadas en distintos tipos celulares de la sangre y del endotelio vascular. Estas interacciones moleculares están moduladas por sitios específicos o dominios de la molécula que le confieren múltiples funciones (tabla 1). Dominios específicos de la zona N-terminal se asocian tanto con la unión de la trombina a la molécula de fibrinógeno, tripéptido Gly-Pro-Asp, y A α 7,9,12,15,16, como con los aminoácidos críticos, A α Arg16 y B β Arg14, por los que por acción catalítica de la trombina se liberan los fibrinopéptidos A y B^{1,3}. Estos sitios específicos modulan la principal función del fibrinógeno como sustrato de la trombina, que es transformarse en fibrina. Otros dominios de la zona N-terminal, localizados en β 15-42, y β 68, se asocian con la unión de la trombina a la molécula de fibrinógeno, y se denominan no sustrato por no estar relacionados con la liberación de los fibrinopéptidos. Estos sitios unen trombina después de la liberación del fibrinopéptido B, y constituyen un almacén de trombina. Estudios cristalográficos han proporcionado datos que asocian sitios específicos de la estructura del fibrinógeno con su función. Así, por la resolución de la estructura de la región C-terminal de la cadena γ se ha caracterizado los sitios funcionales para la polimerización de fibrina, unión de calcio, y unión covalente por FXIII⁵⁻⁷. Los sitios específicos implicados en la polimerización de fibrina son los llamados A, a, B y b que intervienen en las asociaciones D:E y D:D de moléculas de fibrina. Los sitios A y B se localizan en la zona N-terminal de las cadenas α (17-19, Gly-Pro-Arg) y β (15-17, Gly-His-Arg), respectivamente. Los sitios a y b se localizan en la zona C-terminal de las cadenas γ (319-320 y 374-376) y α respectivamente (tabla 1). La fibrina formada es capaz de modular su propia fibrinólisis por unirse al plasminógeno en los residuos α (148-160) y a su activador el t-pA en γ (312-324) facilitando la formación de plasmina que produce la lisis de la fibrina⁸. La zona de interconexión de los dominios contiene los lugares de rotura de las tres cadenas por la plasmina. El fibrinógeno pertenece a la familia de proteínas

Tabla 1. Sitios específicos de la molécula de fibrinógeno implicados en interacciones moleculares

	$A\alpha$	$B\beta$	γ
Trombina			
Ligando	7,9,12,15,16	15-42, 68	
Sitio catalítico	16	14	
Polimerización			
A	17-19 (Gly-Pro-Arg)		
a			319-320 374-376
B		15-17 (Gly-His-Arg)	
b	C-terminal		
D:D			Arg275, Tyr280 Ser300
FXIII	237,328, 508,556,562		406-398 (γ - γ)
Hidratos de carbono-A siálico		364-366 (Asn-Arg-Thr)	52-54 (Asn-Lys-Thr)
Plasmina/plasminógeno	148-160		312-324
t-pA			400-411 (AGDV)
Plaquetas	95-97 (RGD) 572-574 (RGD)		370-383 318-322
CE	95-97 (RGD) 572-574 (RGD)		
Ca			311-336

RGD: secuencia Arg-Gly-Asp; AGDV: secuencia Ala-Gly-Asp; incluida en el dodecapéptido γ C-terminal.

adhesivas y tiene la capacidad de interactuar con distintas células sanguíneas. Los sitios de unión del fibrinógeno a receptores plaquetarios (GP IIb/IIIa) se localizan en α (95-97) y α (572-574) (Arg-Gly-Asp), y γ (400-411)⁹⁻¹⁰. La interacción del fibrinógeno con las plaquetas es esencial para la agregación plaquetaria lo que le confiere una función de gran relevancia en la hemostasia primaria. El fibrinógeno también interactúa con otras células sanguíneas, como diferentes tipos de leucocitos, y vasculares como células endoteliales y musculares lisas, uniéndose a receptores específicos a través de dominios del fibrinógeno como los que contienen la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD, α 95-97 y α 572-574) por los que se une a las células endoteliales¹¹. Las alteraciones estructurales de fibrinógeno pueden ser de carácter congénito o adquirido y pueden producir modificaciones en sus propiedades funcionales y alterar alguno de sus papeles hemostáticos.

Defectos congénitos del fibrinógeno

Las alteraciones congénitas del fibrinógeno son causadas, en su mayoría, por un espectro de mutaciones puntuales de los genes que codifican las tres cadenas polipeptídicas $A\alpha$, $B\beta$ y γ , con sustitución de un simple aminoácido. Estos defectos en el ADN pueden influir sobre la síntesis de fibrinógeno, dando como resultado variaciones en la concentración de fibrinógeno circulante y causar afibrinogenemias,

hipofibrinogenemias y pueden, también, causar una variedad de alteraciones estructurales que producen defectos funcionales (disfibrinogenemias). Los defectos genéticos del fibrinógeno no son frecuentes si se compara con otros defectos hemostáticos, es por lo que la prevalencia de las disfibrinogenemias congénitas entre la población general no está establecida. El patrón de heredabilidad es casi siempre autosómico dominante¹³.

De todos los casos de alteración congénita del fibrinógeno se ha determinado el defecto estructural en 326 variantes, hasta abril de 2004¹⁴⁻¹⁵. En la actualidad se han descrito 146 mutaciones diferentes, 61 se localizan en la cadena $A\alpha$, 32 en la $B\beta$ y 53 en la γ (tabla 2). Estas mutaciones causan alteraciones estructurales definidas que pueden asociarse con defectos funcionales y alterar el papel del fibrinógeno en la hemostasia. La mayoría de los pacientes (60%) no tienen historia clínica de hemorragia o trombosis, mientras que un 26% desarrolla episodios hemorrágicos y un 14% trombóticos¹⁵. Las manifestaciones hemorrágicas incluyen sangrado postoperatorio, sangrado postparto, hemartrosis, hematomas, retraso en cicatrización de heridas, y varían en la severidad de moderado a grave¹³. Las manifestaciones trombóticas incluyen trombosis venosas de las extremidades inferiores, tromboflebitis, trombo embolismo pulmonar, trombosis arterial, y combinación de trombosis venosa y arterial¹².

Cuando se examinan los defectos localizados en las diferentes cadenas del fibrinógeno se observa que la cadena A α es la que sufre el mayor número de mutaciones (42 %) y en la que con más frecuencia se repiten estas mutaciones, siendo responsable del 56 % de los casos caracterizados de defectos congénitos de fibrinógeno¹⁵. La cadena B β es en la que se producen menor número de mutaciones (22 %) y la que ha causado menos casos de defectos congénitos de fibrinógeno (16 %). La cadena γ sufre el 36 % de las mutaciones caracterizadas y es responsable del 28 % de los casos de defectos moleculares del fibrinógeno. Sin embargo, las alteraciones de fibrinógeno debidas a la cadena A α presentan menor implicación clínica siendo el 64 % asintomáticas, y del 36 % restante, 27 % desarrolla episodios hemorrágicos y sólo un 10 % trombóticos. Los defectos de la B β se asocian, en su mayoría, con manifestación clínica (59 %), de tipo hemorrágico (35 %) o trombótico (24 %). Los defectos debidos a la cadena γ son en su mayoría asintomáticos (61 %), pero los que producen manifestación clínica causan con la misma frecuencia episodios trombóticos (19 %) o hemorrágicos (20 %).

Disfibrinogenemias

Cuando se analizan los datos de los defectos del fibrinógeno que causan disfibrinogenemias¹⁵, se observa que el número de variantes caracterizadas genéticamente es de 252, en las que se han identificado 110 mutaciones diferentes (tabla 2). Estas mutaciones se localizan 42 en la cadena A α , 22 en la B β y 46 en la γ . Un 55 % de los casos de disfibrinogenemia no tienen historia clínica de hemorragia o trombosis, mientras que un 27 % desarrolla episodios hemorrágicos y un 18 % trombóticos.

La cadena A α es la que sufre el mayor número de mutaciones (38 %) y en la que con más frecuencia se repiten estas mutaciones en los casos de disfibrinogenemia congénita (53 %) (tabla 2). De los 610 aminoácidos que componen la cadena A α , la zona la N-terminal es en la que más veces se ha identificado un defecto molecular. El 56 % de las mutaciones producen defectos en los 20 primeros aminoácidos. La mutación que más se repite es la que origina un cambio de Arg en posición 16 por Cys o His (78 casos).

Este defecto origina una alteración funcional del fibrinógeno, retraso en la liberación de fibrinopéptidos y en la posterior polimerización de fibrina, debido a que es sobre 16-Arg donde se produce la acción catalítica de la trombina, con la liberación de FpA (tabla 1). Esta misma mutación se puede manifestar con clínica hemorrágica (18 casos, 23 %), trombótica (6 casos, 8 %) o sin manifestación clínica (54 casos, 69 %). La mutación en posición 19Arg, la presentan 8 variantes con manifestación hemorrágica en el 50 % y trombótica en un 25 %. Otras mutaciones de interés se asocian con clínica trombótica, y se producen en los residuos A α 272, 328, 452, 461, 532, y 554. Se han descrito tres casos que presentan clínica trombótica y hemorrágica, producidas por las mutaciones en A α 151 y A α 328 Gln stop, la mutación A α 461Lys stop y la mutación que causa A α 80 Asn deleción. Los defectos estructurales de la cadena A α son asintomáticos en un 56 %. Los síntomas clínicos más frecuentes son hemorrágicos (32 %) siendo los episodios trombóticos del 14 %.

La cadena B β es la que sufre el menor número de mutaciones (20 %), y, es en la que con menor frecuencia se repiten estas mutaciones, siendo sólo el 14 % del total de los disfibrinógenos los que son causados por defecto de la cadena B β ¹⁵ (tabla 2). Sin embargo, las mutaciones que se producen en esta cadena tienen mayor trascendencia clínica, produciendo defectos de fibrinógeno que causan síntomas en el 60 % de los casos, con un porcentaje de episodios trombóticos del 29 % y de hemorrágicos del 31 %. La alteración de la zona N-terminal de la cadena B β es la más crítica en la tendencia a la trombosis¹⁵, estando implicada en este defecto la sustitución del aminoácido 14-Arg o 44-Arg por Cys en el 50 % de los casos de fibrinógeno con trombosis. Otra mutación en posición B β 68, también se asocia con trombosis. Los aminoácidos de esta zona N-terminal son los sitios específicos de unión de la trombina a la molécula de fibrinógeno/fibrina (tabla 1), por lo que la pérdida de capacidad de interacción, parece tener importancia en la adecuada neutralización de la trombina circulante. Los defectos de fibrinógeno que producen clínica hemorrágica son, por el contrario, debidos en su mayoría a mutaciones producidas en la zona C-terminal de la cadena B β ¹⁵.

Tabla 2. Resumen de las mutaciones de los genes de las cadenas A α , B β y γ , identificadas en los defectos de fibrinógeno caracterizados como disfibrinogenemias. Implicación en la clínica trombótica o hemorrágica

	Mutación		Variante		Trombosis		T/H	Hemorragia		Asintomático	
	n.º	%	n.º	%	n.º	%	n.º	n.º	%	n.º	%
A α	42	38	133	53	19	14	3	43	32	74	56
B β	22	20	35	14	10	29	-	11	31	14	40
γ	46	42	84	33	17	20	2	15	18	52	62
Total	110		252		45	18	5	68	27	140	55

Tabla 3. Resumen de las mutaciones de los genes de las cadenas A α , B β y γ , identificadas en los defectos de fibrinógeno caracterizados como afibrinogenemias. Implicación en la clínica trombotica o hemorrágica

	Mutación		Variante		Trombosis		T/H	Hemorragia		Asintomático	
	n.º	%	n.º	%	n.º	%	n.º	n.º	%	n.º	%
A α	20	54	51	69	-	-	-	7	14	44	86
B β	10	27	16	22	1	6	1	7	44	9	56
?	7	19	7	9	-	-	-	3	43	4	57
Total	37		74		1	< 1	1	17	23	57	77

En la cadena γ se han detectado 46 mutaciones diferentes identificadas en 84 variantes de fibrinógeno (tabla 2). En general, las mutaciones en la cadena γ se producen en la zona carboxiterminal¹⁵, implicando: a) pérdida de la interacción con receptores plaquetarios; b) pérdida de aminoácidos implicados en la interacción de sitios A²a², y c) pérdida de potencia en la interacción lateral D:D(γ 275)¹⁶. La mayoría de ellas son asintomáticas (62%) y en las restantes se presentan en semejante proporción episodios tromboticos (20%) o hemorrágicos (18%). Las mutaciones que con más frecuencia se repiten son las que se producen en la posición 275 que implica la sustitución de un residuo Arg por Cys, en 15 variantes, o por His, en 10 variantes. La mayoría de los 25 fibrinógenos con sustitución γ (275) Arg son asintomáticos (71%) aunque también se ha caracterizado esta mutación en fibrinógenos asociados a episodios tromboticos, en un 24% y sólo en un 4% a hemorrágicos. Otra mutación de interés es la que produce la sustitución de γ (308)Asn por Lys, identificada en 5 variantes de fibrinógeno que causa síntomas en el 60% de los casos, asociándose a episodios tromboticos en 2 de ellas (40%) y hemorrágicos en una (20%). Esta sustitución de γ (308)Asn produce cambios en la polimerización D:D y estabilización por FXIII¹⁷. Mutaciones entre γ 318 y 322 se detectan en 7 variantes en las se ha observado pérdida de interacción plaquetaria, afinidad al calcio y fallo de polimerización que puede asociarse a episodios tromboticos o hemorrágicos. La mutación 327Ala \rightarrow Thr produce resistencia a la fibrina y episodios tromboticos arteriales. Otras mutaciones γ 292 Gly-Val, y γ 318 Asp-Gly cursan con clínica trombotica y hemorrágica.

Afibrinogenemias

La afibrinogenemia congénita es una alteración del fibrinógeno, de heredabilidad autosómica recesiva, caracterizada por la ausencia total de esta proteína en plasma¹⁸. Son causadas por mutaciones homocigotas o por mutaciones combinadas. Los casos de las mismas mutaciones expresadas de forma heterocigota pueden producir hipofibrinogenemias¹⁹. Las mutaciones que han sido caracterizadas en los 74 casos de afibrinogenemias¹⁵ se han localizado en

los genes que codifican las tres cadenas del fibrinógeno (tabla 3). Algunas mutaciones impiden el ensamblaje de los tres pares de cadenas de fibrinógeno (γ 153 Cys \rightarrow Arg), y otras inhiben su secreción (B β 414Gly \rightarrow Ser)²⁰.

Los defectos del gen que codifica la cadena A α son los que han causado el mayor número de casos de afibrinogenemia¹⁵. El 69% de los 74 casos de afibrinogenemias caracterizadas, son debidas a mutaciones de la cadena A α (tabla 3). Una mutación que provoca la delección de 11kb, causando pérdida de aminoácidos en la zona N-terminal de la cadena A α , se ha asociado con 8 casos de afibrinogenemia. Otras mutaciones del gen que codifica la cadena A α en la zona central y C-terminal producen cortes de cadena que también se asocian con afibrinogenemias, como es el caso de Arg en posición 149 (5 casos) y 151 (11 casos). El 86% de estas afibrinogenemias son asintomáticas, y el 14% restante presenta clínica hemorrágica, sin que se observen casos de clínica trombotica.

Defectos genéticos de la cadena B β se han caracterizado en 16 casos de afibrinogenemias causados por 10 mutaciones distintas (tabla 3). En la zona N-terminal se produce la mutación B β 17 (Arg 17 stop), descrita en 4 casos, dos asintomáticos, uno con clínica hemorrágica y otro con clínica hemorrágica y trombotica, en el que se combina con la mutación B β 414. El resto de las afibrinogenemias, son causadas, en su mayoría, por mutaciones producidas en la zona C-terminal de esta cadena que incluyen la formación de B β truncadas. La pérdida de 25 aminoácidos de la zona carboxiterminal no inhibe el ensamblaje de las seis cadenas pero inhiben su secreción²¹. Las afibrinogenemias debidas a mutaciones de la cadena B β se manifiestan el 56% asintomáticas y el 44% con clínica hemorrágica.

Defectos de la cadena γ sólo se han observado en 7 casos de afibrinogenemia, cada uno causado por una mutación distinta (γ + 1, γ 15, γ 76, γ 152 delección, γ 197stop y γ 231stop). La clínica asociada a estos casos es la hemorrágica en un 43% y son asintomáticos el 57% restante. No se han observado episodios tromboticos.

Los defectos de coagulación de las afibrinogenemias no son más severos que el de las hemofilias A

y B, y sorprendentemente, son en su mayoría asintomáticas. La hemorragia del cordón umbilical es a menudo la primera manifestación clínica. Epistaxis, menorragia, hemorragia gastrointestinal, y hemartrosis pueden ocurrir con distinta intensidad. También se han dado casos de hemorragia intracerebral espontánea y rotura del bazo²².

El análisis de los disfibrinógenos ha proporcionado una información de utilidad, para entender detalles moleculares que se asocian con funciones específicas de la molécula de fibrinógeno. Los mecanismos fisiopatológicos que asocian el defecto molecular con el riesgo de hemorragia, parecen deberse a alteraciones localizadas en los sitios específicos implicados en la liberación de fibrinopéptidos ($\text{A}\alpha$ 16Arg \rightarrow Cys o His), así como, en los implicados en la polimerización de los monómeros de fibrina. Las bases fisiopatológicas de trombosis en las disfibrinogenemias, se podrían asociar con mutaciones que conducen a una disminuida unión a la trombina en los sitios de la fibrina (β 15-42, β 68), lo que implicaría una peor neutralización de la trombina circulante con posibles accidentes trombóticos. Otro mecanismo que se podría asociar con la trombosis en las disfibrinogenemias, podría estar relacionado con mutaciones que alteran los sitios de unión del plasminógeno y t-pA, o que produzcan una resistencia a la degradación de la fibrina por plasmina, con inhibición de la fibrinólisis. Sin embargo, en algunos casos se ha observado que el mismo defecto puede manifestar indistintamente clínica trombótica o hemorrágica, en la misma variante o en distintas variantes con idéntica mutación, o ausencia de manifestación clínica. La interacción de los aspectos genéticos con los medioambientales pueden también determinar variaciones de la manifestación clínica.

Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico de alteraciones del fibrinógeno se pone de manifiesto por modificaciones, tanto de su concentración plasmática como de su función, que se identifican en el análisis previo a la caracterización de las mutaciones de los genes que codifican sus cadenas. Una primera aproximación al diagnóstico de fibrinógenos alterados incluye la valoración de la concentración de fibrinógeno por técnica de cuantificación proteica y funcional (posible discrepancia), el análisis de liberación de fibrinopéptidos (56% anormal), la cinética de polimerización de fibrina (90% anormal), la formación de fibrina estabilizada (17% anormal), la permeabilidad de la fibrina, el análisis de heterogeneidad del fibrinógeno circulante mediante medida del peso molecular de la molécula completa y de sus cadenas por electroforesis, el estudio de degradación de fibrinógeno/fibrina por plasmina (resistencia en el 50%), estudio de unión de fibrinógeno a trombina, plasminógeno y t-pA, cuantificación de hidratos de carbono, de ácido siálico, o de fósforo, interacción con plaquetas o

células endoteliales. La valoración de todos estos estudios se ha realizado de forma irregular en el diagnóstico diferencial de disfibrinogenemias.

Las pruebas básicas que se realizan para el diagnóstico de disfibrinogenemia²³ son el tiempo de trombina y reptilase, y la relación entre la valoración antigénica y funcional del fibrinógeno.

El tratamiento de las disfibrinogenemias/afibrinogenemias es sintomático. Los episodios hemorrágicos se tratan con perfusión de plasma o fibrinógeno purificado. Los episodios trombóticos con anticoagulación oral, o heparina.

Alteraciones adquiridas de fibrinógeno

Las disfibrinogenemias adquiridas más frecuentes son las causadas por hepatopatías. Se ha detectado disfibrinogenemia en un 80% de pacientes con diversa patología hepática, abarcando el estudio desde cirrosis hepática, hepatocarcinoma o fallo hepático²⁴. El defecto de fibrinógeno se ha asociado a aumento en el contenido de ácido siálico en las cadenas $\text{B}\beta$ y γ ²⁵ de la molécula lo que resulta en fallo de la polimerización de la fibrina²⁶, posiblemente mediado por el aumento de cargas negativas originado que promueve fuerzas de repulsión entre monómeros de fibrina.

Las disfibrinogenemias adquiridas se han asociado también a ciertas enfermedades malignas, no sólo hepáticas sino también se ha diagnosticado en carcinoma renal²⁷. La presencia de disfibrinogenemias puede considerarse marcador neoplásico. Estudios *in vitro* han sugerido que la disfibrinogenemia asociada a cáncer está originada por la síntesis de fibrinógeno anormal, producido por las células tumorales, en el que se ha detectado la pérdida de un péptido N-terminal de la cadena $\text{B}\beta$ ²⁸. Este defecto produce un fallo en la unión de las tres cadenas.

Otras disfibrinogenemias adquiridas se han asociado al uso de medicamentos como mitramicina²⁹, isotretinoína³⁰ y L-asparraginasa³¹.

La asociación de las disfibrinogenemias adquiridas con clínica trombótica o hemorrágica no es concluyente. Raramente se ha asociado directamente los episodios hemorrágicos²⁹ o trombóticos³² con la presencia de una disfibrinogenemia adquirida. La dificultad de determinar la implicación del defecto del fibrinógeno con la clínica, es debido, en parte, porque la mayoría de pacientes que desarrollan disfibrinogenemia adquirida son los que presentan patología hepática, en la cual se desarrollan una variedad de anomalías hemostáticas que podrían contribuir al riesgo hemorrágico o trombótico.

Polimorfismos del fibrinógeno

Se han identificado tres polimorfismos en el gen de la cadena beta, β -148C \rightarrow T, $\text{B}\beta$ -854 G \rightarrow A, y $\text{B}\beta$ -455 G \rightarrow A, y dos en el la cadena alfa, α -58 G \rightarrow A y α -312Thr \rightarrow Ala. Los polimorfismos β -148, β -854, β -455 y α -58, modulan los niveles

plasmáticos de fibrinógeno en un 15 %³³. En estudios epidemiológicos previos se demostró que el aumento de fibrinógeno es un factor de riesgo independiente de la enfermedad vascular arterial³⁴. Puesto que los genes de fibrinógeno modulan su concentración plasmática, los polimorfismos podrían asociarse con los accidentes trombóticos. Se han realizado estudios para relacionar estos polimorfismos con las trombosis arterial o venosa, sin que hayan sido concluyentes. En el estudio ECTIM, se asoció los polimorfismos en el gen de la cadena β , con la enfermedad coronaria severa³⁵. Sin embargo, otros estudios han fallado en mostrar asociación de estos polimorfismos con la trombosis venosa³⁶. El polimorfismo $A\alpha$ -312Thr \rightarrow Ala y el polimorfismo $B\beta$ 448Arg \rightarrow Lys generan cambios en la estructura del coágulo de fibrina, causando mayor estabilización y grosor de las fibras³⁷. Esta característica puede proporcionar un mecanismo por el que el fibrinógeno $A\alpha$ -312Ala, y $B\beta$ 448Lys han mostrado predisponer a riesgo de episodios trombóticos³⁸⁻³⁹. Es necesario una mejor caracterización de los polimorfismos y su interacción con factores medioambientales, además de identificar el potencial de nuevos determinantes genéticos.

Heterogeneidad del fibrinógeno de origen no genético

El fibrinógeno plasmático en condiciones normales presenta variaciones por modificaciones biosintéticas o posbiosintéticas que se producen en sitios sensibles de la molécula⁴⁰. Estas variaciones pueden causar cambios en sus propiedades funcionales. Las cadenas α y γ están constitutivamente presentes en dos formas. La variante γ mayoritaria contiene 411 aminoácidos y representa el 85-90% del total. La cadena γ' es más pesada, contiene 427 aminoácidos y representa el 10-15%. Entre ambas cadenas existen diferencias funcionales. La γ' carece del sitio C-terminal de afinidad a plaquetas, sin embargo presenta nuevos sitios de alta afinidad por trombina⁴¹. El fibrinógeno formado por γ y γ' presenta mayor interacción con las plaquetas y menor neutralización de la trombina generada, mientras que el formado por γ' y γ' podría proteger para la trombosis por el efecto contrario. La cadena $A\alpha$ sufre modificaciones postranslacionales siendo parcialmente fosforilada en dos sitios. La fosforilación protege de la fibrinólisis al fibrinógeno y aumenta la cinética de liberación de fibrinopéptidos⁴² lo que le puede predisponer para la trombosis. La cadena $A\alpha$ y γ son parcialmente degradadas por la plasmina originando especies de fibrinógeno circulante de distintos pesos moleculares, y diferentes funciones⁴³. La degradación parcial de la cadena $A\alpha$, produce disminución de la cinética de liberación de fibrinopéptidos, y de la polimerización y estabilización de la fibrina^{40,42}. Este puede ser el mecanismo por el que el fibrinógeno de alto peso molecular (HMWFG),

con aumentada cinética de liberación de fibrinopéptidos, y de polimerización de fibrina, se asocia con riesgo de trombosis⁴⁴. Otras modificaciones moleculares implican glucosilación, sulfatación, oxidación y acetilación, que pueden causar variaciones de función. La glucosilación aumenta la resistencia a la proteólisis y la acetilación la disminuye⁴⁰.

Las causas de alteración de la función del fibrinógeno tienen un amplio espectro. El estudio de las alteraciones ligadas a defectos genéticos, por mutaciones puntuales, sigue proporcionando datos que amplían el conocimiento de las funciones del fibrinógeno. Aunque por su escasa prevalencia su repercusión en la clínica no es frecuente, sin embargo puede ser compleja. Se puede dar la paradoja que defectos congénitos causados por una misma mutación, manifiesten clínica trombótica o hemorrágica que, con técnicas genómicas o proteómicas, es necesario interpretar.

El estudio de las variaciones genéticas polimórficas del fibrinógeno pueden tener más trascendencia clínica. La asociación de los polimorfismos y la enfermedad vascular, arterial o venosa se continúa investigando. Los resultados de los estudios han sido contradictorios y, también, han abierto nuevas posibilidades de asociación entre estructura y función. Se ha podido establecer relación entre polimorfismos y estructura del coágulo o concentración de fibrinógeno. Por otro lado, los factores ambientales pueden intervenir amplificando la modulación genética. En este sentido, en el estudio de los polimorfismos del fibrinógeno, en relación con la patología trombótica, se debe valorar las interacciones entre factores genéticos y factores ambientales.

El conocimiento progresivo sobre la implicación que las alteraciones del fibrinógeno tienen en la hemostasia, puede facilitar la aplicación de nuevas estrategias terapéuticas, incluyendo la terapia génica.

Bibliografía

1. Blomback B. Fibrinogen and fibrin - proteins with complex roles in hemostasis and thrombosis. *Thromb Res* 1996;83:1-75.
2. Henry I, Uzan G, Weil D, et al. The gene coding for the A-alfa, B-beta and gamma chains of fibrinogen map to 4q2. *Am J Hum Genet* 1984; 36:760-8.
3. Doolittle RF. Fibrinogen and fibrin. *Ann Rev Biochem* 1984;53:195-229.
4. Veklich YI, Gorkun OV, Medved LV, Nieuwenhuizen W, Weisel JW. Carboxyl-terminal portions of alpha chains of fibrinogen and fibrin. Localization by electron microscopy and the effects of isolated α C fragments on polymerization. *J Biol Chem* 1993;268:13577-85.
5. Pratt KP, Cote HCF, Chung DW, Stenkamp RE, Davie EW. The primary fibrin polymerization pocket: three-dimensional structure of a 30 kDa C-terminal γ chain fragment complexed with the peptide Gly-Pro-Arg-Pro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:7176-81.
6. Everse SJ, Sparaggon G, Veerapandian L, Riley M, Doolittle RF. Crystal structure of fragment double- from human fibrin with two different bound ligands. *Biochemistry* 1998;37:8637-42.
7. Kostelansky MS, Betts L, Gorkun OV, Lord ST. 2.8 Å crystal structure of recombinant fibrinogen fragment-D with and without two peptide ligands: GHRP binding to the "b" site disrupts its nearby calcium binding site. *Biochemistry* 2002;41:12124-32.
8. Medved L, Nieuwenhuizen. Molecular mechanisms of initiation of fibrinolysis by fibrin. *Thromb Haemost* 2003;89:409-19.
9. Hawiger J, Kloczewiak M, Bednarek MA, Timmons S. Platelet receptor recognition domains on the alpha chain of human fibrinogen: structure-function analysis. *Biochemistry* 1989;28:2909-14.

10. Kloczewiak M, Timmons S, Lukas TJ, Hawiger J. Platelet receptor recognition site on human fibrinogen. Synthesis and structure-function relationship of peptides corresponding to the carboxy-terminal segment of the gamma chain. *Biochemistry* 1984;23:1767-74.
11. Smith RA, Rooney MM, Lord ST, Mosesson MW, Gartner TK. Evidence for new endothelial cell binding sites on fibrinogen. *Thromb Haemost* 2000;84:819-25.
12. Haverkate F, Samama M. Familial dysfibrinogenemia and thrombophilia: report on a study of the SSC subcommittee of fibrinogen. *Thromb Haemost* 1995;73:151-61.
13. Gralnick HR, Connaghan DG. Hereditary abnormalities of fibrinogen. En: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, editors. *Williams Hematology*. 5th ed. New York: McGraw-Hill; 1995; p. 1439.
14. Ebert R. Index of variant human fibrinogens. Boca Raton: CRC Press; 1994.
15. Hans M, Biot F. A database for human fibrinogen variants. *Ann N Y Acad Sci* 2001;936:89-90. Disponible en: http://www.geth.org/pages/database_ang.html.
16. Mosesson MW, Siebenlist KR, DiOrio JP, Matsuda M, Hainfeldt JF, Wall JS. The role of fibrinogen D domain intermolecular association sites in the polymerization of fibrin and fibrinogen Tokio II (γ 275 Arg \rightarrow Cys). *J Clin Invest* 1995;389: 455-62.
17. Okumura N, Gorkun OV, Terasawa F, Lord ST. Substitution of the \rightarrow -chain Asn 308 disturbs the D:D interface affecting fibrin polymerization, fibrinopeptide release, and FXIII catalyzed cross-linking. *Blood* 2004.
18. Neerman-Arbez M. Fibrinogen gene mutations accounting for congenital afibrinogenemia. *Ann NY Acad Sci* 2001;936:496-508.
19. Neerman-Arbez M, Vu D, Abu-Libdeh B, Bouchardy I, Morris MA. Prenatal diagnosis for congenital afibrinogenemia caused by a novel nonsense mutation in the FGB gene in a Palestinian family. *Blood* 2003; 101:3492-4.
20. Maghazal GJ, Brennan SO, Homer VM, George PM. The molecular mechanisms of congenital hypofibrinogenemia. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:1427-38.
21. Duga S, Asselta R, Santagostino E. Missense mutation in the human beta fibrinogen gene cause congenital afibrinogenemia by impairing fibrinogen secretion. *Blood* 2000;95:1336-41.
22. Lak M, Keihani M, Peyvandy F, Manucci PM. Bleeding and thrombosis in 55 patients with inherited afibrinogenemia. *Br J Haematol* 1999;107: 204-6.
23. Cunningham MT, Brandt JT, Laposata ML, Olson JO. Laboratory diagnosis of dysfibrinogenemia. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126:499-505.
24. Francis J, Armstrong D. Acquired dysfibrinogenemia in liver disease. *J Clin Pathol* 1982;35:667-72.
25. Martinez J, MacDonald KA, Palascak JE. The role of sialic acid in the dysfibrinogenemia associated with liver disease: distribution of sialic acid on the constituent chains. *Blood* 1983;61:1196-202.
26. Reganon E, Vila V, Aznar J, Garrido G, Estelles E, Berenguer J. Study of the formation of fibrin clot in cirrhotic patients: an approach to study of acquired dysfibrinogenemia. *Thromb Res* 1987;46:705-14.
27. Dawson N, Barr C, Alving B. Acquired dysfibrinogenemia: paraneoplastic syndrome in renal cell carcinoma. *Am J Med* 1985;78:682-6.
28. Rybarczyk BJ, Simpson-Haidaris PJ. Fibrinogen assembly, secretion, and deposition into extracellular matrix by MCF-7 human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 2000;60:2033-9.
29. Ashby M, Lazarchick J. Acquired dysfibrinogenemia secondary to mitramycin toxicity. *Am J Med Sci* 1986;292:53-5.
30. Auroousseau M, Levacher S, Beneton C. Transient dysfibrinogenemia and thrombocytopenia associated with recurrent acute pancreatitis: the course of isotretinoin therapy. *Rev Med Intern* 1995;16:622-5.
31. MacDonag J, Carrell N, Lee M. Dysfibrinogenemia and other disorders of fibrinogen structure and function. En: Colman R, Hirsh J, Marder V, Salzman E, editors. *Hemostasis and Thrombosis*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott, 1993; p. 314-34.
32. D'Souza L, Cotos M, Glueck H. An acquired abnormal fibrinogen associated with thromboembolic disease and pseudotumor cerebri. *Thromb Haemost* 1979;42:994-1008.
33. Humphries SE, Luong LA, Montgomery HE, Day IMN, Mohamed-Ali V, Yudkin JS. Gene-environment interaction in the determination of levels of plasma fibrinogen. *Thromb Haemost* 1999;82:818-25.
34. Meade TW, Mellows S, Brozovic M. Hemostatic function and ischaemic heart disease: principal results of the Northwick Park Heart Study. *Lancet* 1986;2:533-37.
35. Behague I, Poirier O, Nicaud V. β fibrinogen gene polymorphisms are associated with plasma fibrinogen and coronary artery disease in patients with myocardial infarction. *Circulation* 1996;93:440-9.
36. Bozic M, Teran N, Peterlin B, Stegner M. Fibrinogen polymorphisms TaqI, HaeIII and BclI are not associated with a higher risk of deep vein thrombosis. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003;33:164-9.
37. Lim B, Ariens RA, Carter AM, Weisel J, Grant PJ. Genetic regulation of fibrin structure and function: complex gene-environment interactions may modulate vascular risk. *Lancet* 2003;361:1424-31.
38. Carter AM, Catto AJ, Grant PJ. Association of the α -fibrinogen-Thr312Ala polymorphism with post-stroke mortality in subjects with atrial fibrillation. *Circulation* 1999;99:2423-6.
39. Carter AM, Catto AJ, Bamfor JM, Grant PJ. Gender-specific association of the fibrinogen $\beta\beta$ 448 polymorphism, fibrinogen levels, and acute cerebrovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:589-94.
40. Henschen-Edman A. Fibrinogen non-inherited heterogeneity and its relationship to function in health and disease. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 936:580-93.
41. Mosesson MW. Antithrombin I inhibition of thrombin generation in plasma by fibrin formation. *Thromb Haemost* 2003;89:9-12.
42. Reganon E, Vila V, Aznar J, Lacueva V, Martínez V, Ruano M. Studies on the functionality of newly synthesized fibrinogen after treatment of acute myocardial infarction with streptokinase. Increase in the rate of fibrinopeptide release. *Thromb Haemost* 1993;70:978-83.
43. Reganon E, Vila V, Aznar J, Laiz B. Human fibrinogen heterogeneity. A study of limited fibrinogen degradation. *Clin Chim Acta* 1989;184: 7-18.
44. Reganon E, Vila V, Ferrando F, Martínez-Sales V, Fayos L, Ruano M, et al. Elevated high molecular weight fibrinogen in plasma is predictive of coronary ischemic events after acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* 1999;82:1403-5.

TRASTORNOS ADQUIRIDOS DE LAS VÍAS COMÚN Y EXTRÍNSECA DE LA COAGULACIÓN

C. SALVADOR OSUNA, N. FERNÁNDEZ MOSTEIRÍN Y J.F. LUCÍA CUESTA

Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza.

C. SALVADOR OSUNA

Déficit combinado de factores de la coagulación

Déficit de síntesis de factores

Hepatopatía

La cirrosis hepática se asocia con alteraciones de la coagulación manifestándose en forma de diátesis hemorrágica o fenómenos tromboembólicos. El hígado es el principal órgano de síntesis de los factores de coagulación; la cirrosis hepática, la hepatitis, las alteraciones del parénquima hepático y las enfermedades infiltrativas pueden conducir a un déficit en la síntesis de proteínas plasmáticas relacionadas con la hemostasia.

La protrombina, y los factores VII y X son de síntesis exclusivamente hepática y precisan de la acción de la vitamina K para ser funcionales; el fibrinógeno y el factor V también se sintetizan en el hígado sin participación de la vitamina K, su descenso es de gran trascendencia clínica y traduce un importante daño hepatocelular. Cuando el hepatocito presenta un daño importante la síntesis de factores de coagulación es inviable a pesar de la administración exógena de vitamina K (prueba hepática de Koller). Aunque en escasa cuantía, pueden detectarse en algunas ocasiones proteínas descarboxiladas circulantes, y ser utilizados en ocasiones como marcadores de estos trastornos (producción autónoma en el caso de hepatomas). Los factores VII y X (junto con el factor V) muestran en la fase de daño hepático agudo un descenso más precoz, existiendo poca afectación de la vía intrínseca; posteriormente descendiendo la protrombina y ya en procesos crónicos, los factores de la vía intrínseca IX y XI¹.

Muy frecuentemente estas alteraciones son subclínicas mostrando valores descendidos de los distintos factores de coagulación en ausencia de clínica y/o alargamiento del tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPA) o tiempo de protrombina (TP). La prolongación de ambos parámetros traduce una mayor disfunción hepática asociándose a un peor pronóstico.

Por lo que se refiere al factor tisular (FT) una publicación del año 2001 muestra en contraste con estudios previos la presencia de niveles elevados de FT en pacientes con hepatopatía, estableciéndose así mismo una correspondencia con la clasificación de Child y otros marcadores de síntesis hepática. El por qué de la elevación de los niveles de FT se desconoce, la activación del sistema mononuclear fagocítico y el daño endotelial secundario a la liberación de citocinas por los monocitos conllevaría la expresión de FT a nivel del endotelio. En los pacientes en los que se asocia una insuficiencia renal, no queda claro que exista una relación entre el deterioro de la función renal y la disminución del aclaramiento de FT. Existe una correlación entre los factores fisiopatológicos anteriormente mencionados y el grado de hepatopatía (clasificación de Child, TP y actividad colinesterasa, no así con la aspartato aminotransferasa [AST] y la alanina aminotransferasa [ALT]), más marcada para el FT en los estadios finales de la enfermedad. El impacto de la elevación del FT en la aparición de fenómenos trombóticos no ha podido ser todavía demostrado².

A nivel práctico debemos ser cuidadosos a la hora de valorar los estudios de coagulación fundamentalmente en lo que respecta a un parámetro tan ampliamente utilizado como el índice normalizado internacional (INR). Una reciente publicación³ que comparaba pacientes en tratamiento con warfarina y pacientes afectados de hepatopatía mostraba que para un determinado INR el grado de descenso de los factores I, V y VII es mayor en el segundo grupo, esto último reflejaría la presencia de factores vitamina-K dependientes total o parcialmente descarboxilados (PIVKA-II, que actuarían como inhibidores competitivos y prolongarían el INR en pacientes en tratamiento anticoagulante oral). Del mismo modo empleando distintos reactivos de tromboplastina comercial de diferentes orígenes, se obtenían valores de INR que oscilaban de 1,76 a 2,39⁴. Hay que tener en cuenta además que en muchos países la prioridad ante un posible trasplante hepático se asigna teniendo en cuenta entre otros este parámetro.

Por lo que respecta al déficit de vitamina K en el contexto de hepatopatías de múltiples etiologías este aspecto será tratado en el epígrafe correspondiente.

Falta de aporte de vitamina K

La vitamina K interviene en la síntesis de los factores de la vía extrínseca y común II, VII y X a través de la carboxilación de los residuos glutámico de la región N-terminal de la cadena peptídica de estos fac-

tores de la coagulación. En ausencia de vitamina K, los factores se sintetizan. La dieta media diaria americana contiene entre 300 y 500 μg ⁵. Ingestas tan bajas de vitamina K como 10 $\mu\text{g}/\text{día}$ durante varias semanas, no modifican significativamente la actividad de protrombina, sin embargo, elevan los niveles de protrombina hipocarboxilada (PIVKA II) la detección de esta sustancia es la prueba más sensible de la falta de vitamina K. Posteriormente, disminuye la actividad de los factores vitamina K dependientes. La ingesta de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ de vitamina K, es suficiente para prevenir o limitar estas alteraciones. Es infrecuente observar déficit de vitamina K lo suficientemente graves como para producir alteraciones en el tiempo de Quick, sin embargo, déficit subclínicos de vitamina K, medidos por la elevación de PIVKA II, se observan en alcohólicos con defectos nutricionales⁶ y en pacientes ingresados, fundamentalmente en unidades de cuidados intensivos y de neonatología: en un reciente estudio⁷, en recién nacidos, durante la primera semana de vida, el déficit de vitamina K es importante y se debe, en parte a la falta de aporte (ayuno las primeras 24 h, déficit de vitamina K en la leche materna, y en prematuros, inmadurez hepática, con déficit de síntesis). En el neonato, están habitualmente descendidos, los factores II, VII y X, estando elevado el factor V. Entre el día 1 y 3 de vida, la actividad de protrombina puede ser de entre un 10 y un 30 %, con una incidencia de sangrado (enfermedad hemorrágica del recién nacido) de entre el 0,25 y el 1,7 %, por lo que se recomienda la administración profiláctica de una dosis de 0,5-1 mg intramuscular a todos los recién nacidos. Menos conocida, es la enfermedad hemorrágica tardía por déficit de vitamina K en niños que reciben únicamente lactancia materna. Se debe a la pobreza de la leche materna en vitamina K y tiene una incidencia en Europa de un 4,4 a un 7,2 por 100.000 nacimientos. Si se hace profilaxis al nacimiento, la incidencia desciende a 1,4 a 6,4 por 100.000⁸. Sin embargo, si no se administran suplementos de vitamina K a la madre y al lactante durante las primeras semanas de vida, el déficit subclínico, medido por la elevación de PIVKA II, alcanza a un 48 % de los lactantes⁹.

Falta de absorción de vitamina K

La vitamina K es un factor liposoluble. La deficiencia de vitamina K por déficit de absorción se observan en pacientes con alteraciones cuantitativas y/o cualitativas de la mucosa intestinal: resecciones intestinales, derivaciones, fistulas yeyunales, en enfermedades intestinales inflamatorias crónicas, la incidencia subclínica (elevación de PIVKA II) es de hasta un 31 % de los pacientes¹⁰. En la fibrosis quística, en el esprue y en la enfermedad celíaca, son también habituales los déficit subclínicos de factores de la coagulación vitamina K dependientes, la elevación de los niveles de protrombina hipocarboxilada sin alteración del tiempo de Quick se observa en buena parte de los pacien-

tes, normalizándose la actividad de los factores vitamina K dependientes y el PIVKA II si se realiza un aporte extra de vitamina K¹¹. En fases avanzadas de estas enfermedades, el descenso de los factores puede alargar el tiempo de Quick y producir sangrados.

También se observa déficit de vitamina K en las insuficiencias biliares en pacientes con cirrosis biliar primaria, colestasis intra y extrahepática. En las ictericias obstructivas, el alargamiento del tiempo de Quick se observa a partir de la segunda semana de establecido el cuadro. Los pacientes en tratamiento crónico con bloqueantes de la síntesis de sales biliares (colestiramina) pueden también presentar disminución de la actividad de los factores VII, II, IX y X.

Déficit de síntesis de factores vitamina K dependientes secundarios a fármacos

Los fármacos dicumarínicos, por su similitud con la vitamina K, interfieren de forma competitiva para unirse a los sistemas enzimáticos que regeneran las formas inactivas (epóxido, quinona) de la vitamina K transformándolas en sustancia activa (hidroquinona). El tratamiento con dicumarínicos. Dada la naturaleza de esta charla, no trataremos con más profundidad este tema.

Mención especial merecen otros fármacos de uso habitual, que pueden impedir la normal síntesis de factores de la coagulación vitamina K dependientes:

Las cefalosporinas, especialmente algunas de tercera generación, como moxalactam, cefamandol y cefoperazona, pueden causar hipoprotrombinemia, en algunos raros casos con significado clínico (alargamiento del tiempo de Quick, y más raramente hemorragias). Este efecto secundario se debe a la separación de la molécula del fármaco del radical MTT (1-metiltetrazol-5-tiol), esta sustancia, es capaz de inhibir la γ -carboxilación de los residuos glutámico de los factores de la coagulación vitamina K dependientes. El resultado es la síntesis de unos factores biológicamente inactivos, detectable por la elevación del PIVKA II, y en casos más serios, por la disminución de la actividad de los factores II, VII y X y por el aumento del tiempo de Quick. Otra cefalosporina, la cefazolina, también puede inducir, aunque mucho más raramente, hipoprotrombinemia por el mismo mecanismo. Esta molécula carece de grupo MTT, pero su estructura incluye el grupo MTD (2-metil-1,3,4-tiaziazol-5-tiol), que puede interferir la carboxilación de los factores vitamina K dependientes. El riesgo de hipoprotrombinemia grave, se produce con mayor frecuencia en pacientes con disminución de la actividad del enzima tiopurina-S-metiltransferasa (TPMT), capaz de inactivar los grupos MTT y MTD. Esta enzima es polimórfica, calculándose que un 11 % de individuos caucásicos son heterocigotos para variantes que condicionan una actividad enzimática intermedia, y 1 de cada 300 individuos son homocigotos para variantes de TPMT de nula o muy baja actividad¹².

Los anti-tiroideos tiamídicos propiltiouracilo y metimazol, tienen una estructura similar al grupo MTT, por lo que pueden inducir hipoprotrombinemia y descensos en la actividad de VII y X. Además, el metimazol es capaz de inhibir *in vitro* la enzima epóxido reductasa, impidiendo la regeneración endógena de la vitamina K¹³.

Otros fármacos que dificultan la carboxilación de la protrombina son los anti-epilépticos. Los niveles de PIVKA II están elevados en los pacientes que los consumen¹⁴.

Coagulación intravascular diseminada

El subcomité de coagulación intravascular diseminada (CID) de la Sociedad internacional de trombosis y hemostasia define la CID como un síndrome adquirido caracterizado por la activación intravascular de la coagulación debida a diversas causas y que puede originarse a partir de la microcirculación o bien producir un daño de la misma que si es suficientemente grave lleva a la disfunción orgánica.

Las causas de la CID son múltiples, en la tabla 1 se reseñan de forma resumida las principales.

En algunos casos, particularmente en las CID provocadas por venenos de determinadas serpientes, la CID se inicia por transformación directa del fibrinógeno en fibrina (Botrops, Ankirodon), por conversión del factor II en trombina (Echis carinatus), o por activación directa del factor X (víbora de Russell). Sin embargo, y centrándonos en la vía extrínseca y común de la coagulación, lo más habitual, y el hecho central en la mayor parte de los pacientes con CID es la generación de trombina mediada por la unión del FT a su ligando, el factor VII sin participación inicial del sistema de contacto: la administración de endotoxina o factor de necrosis tumoral alfa a animales o a individuos sanos, provoca un aumento de los niveles de trombina circulante sin activación del sistema de contacto¹⁵, además, la infusión

Tabla 1. Condiciones que se asocian a CID

Sepsis e infección (potencialmente cualquier tipo de microorganismo)
Tumores
Sólidos
Neoplasias hematológicas
Traumatismos. Lesiones de órganos de diverso origen
Daño tisular grave
Traumatismo craneoencefálico grave
Embolismo grave
Patología obstétrica
<i>Abruptio placentae</i>
Embolismo de líquido amniótico
Anomalías vasculares
Aneurismas de grandes vasos
Hemangiomas gigantes (síndrome de Kasabach-Merritt)
Fracaso hepático grave
Otras: reacciones inmunológicas graves; tóxicos: drogas, mordeduras de serpiente, reacción transfusional, etc.

de anticuerpos frente al complejo FT/FVII, es capaz de inhibir la activación de la coagulación inducida por endotoxinas¹⁶ así como de prevenir la CID en babuinos inoculados con *Escherichia coli*¹⁷. El antígeno del factor tisular se detecta en la mayor parte de pacientes con CID, aunque la fuente exacta de FT es motivo de discusión.

Una vez formado el complejo FT/FVIIa, la progresión de la CID lleva al descenso del resto de los factores de la coagulación. Esta progresión depende de la depleción de los sistemas inhibidores de la coagulación y de la fibrinólisis. En el caso de la vía extrínseca, el principal inhibidor del complejo FT/FVIIa, es el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI). En condiciones normales, el TFPI circula en el plasma a bajas concentraciones y unido a lipoproteínas. El papel del TFPI en la CID no está completamente aclarado: en modelos animales, la depleción de este factor con anticuerpos específicos favorece el desarrollo de CID en conejos. Por otra parte, una vez establecida, la infusión de TFPI disminuye globalmente la mortalidad, reduce el depósito de fibrina, y bloquea la respuesta inflamatoria en modelos animales¹⁸. Sin embargo, en la sepsis, y a pesar de que los niveles de TFPI no están demasiado disminuidos, la concentración de TFPI parece insuficiente para regular *in vivo* la activación de la coagulación y la respuesta inflamatoria durante la CID¹⁹. En humanos, parece que la infusión de TFPI no modifica la mortalidad en CID.

En 5 estudios en los que se reúnen 900 pacientes, los hallazgos de laboratorio más frecuentes en la CID son, por orden de frecuencia, la trombocitopenia, la elevación de productos de degradación del fibrinógeno, el alargamiento del tiempo de Quick, la prolongación del TP, la prolongación del tiempo de cefalina y la disminución del fibrinógeno. Si la CID progresa, prácticamente todos los factores de la coagulación disminuyen, sin embargo, el déficit de factor V y el del fibrinógeno son las más frecuentes en CID aguda, así, un fibrinógeno menor a 100 mg/dl, en ausencia de hepatopatía, se asocia invariablemente a una CID aguda. En la CID crónica, el grado de consumo de factores, puede ser compensado por una síntesis hepática aumentada, y las alteraciones de laboratorio antes mencionadas pueden ser mínimas o inexistentes. En estas circunstancias, la patología precipitante, y las pruebas indicadoras de la generación de trombina y fibrinógeno, pueden ayudar al clínico a establecer el diagnóstico de CID.

Otros

Paraproteinemias y amiloidosis

En la amiloidosis se describen diversas alteraciones de la coagulación, a nivel de las vías común y extrínseca de la coagulación. La más habitual es el déficit de factor X, pero también se han descrito dé-

ficit de factor V, VII e inhibidores de la conversión del fibrinógeno a fibrina. El déficit de factor X en la amiloidosis primaria se describió hace más de 40 años. La incidencia es del 8,7%. De éstos, en un 87% de los casos, se observa alargamiento del INR. En un 28% de los pacientes se alarga el T de cefalina. Un 56% de los pacientes con déficit de factor X sangrarán, a veces con niveles de factor entre 25 y 50%. El déficit funcional, medido por descenso de la actividad de factor X, es superior al antigénico que suele ser discreto. En el caso del déficit de factores, el mecanismo más aceptado es la adsorción de factores de la coagulación a las fibrillas de amiloide. Así, el aumento de aclaramiento disminuye la vida media del factor. El tratamiento de las hemorragias con plasma fresco puede ser poco eficaz si los factores infundidos son rápidamente adsorbidos. Recientemente se ha utilizado rFVIIa con éxito. El tratamiento de la amiloidosis con quimioterapia, seguida o no de autotrasplante mejora o incluso normaliza los factores deficitarios²⁰. Se ha descrito también algún caso aislado de amiloidosis primaria en la que la deficiencia adquirida de factor X de coagulación mejora de forma espontánea. Como tratamiento paliativo, la esplenectomía, posiblemente debido a la retirada de abundante amiloide presente en el bazo, y la plasmaféresis, mejoran transitoriamente los niveles de factores de la coagulación.

Alteraciones de la vía extrínseca y común en el síndrome nefrótico y otras nefropatías

En el paciente con síndrome nefrótico, se observan habitualmente aumentos del fibrinógeno, factor II, V, VII y X. Estos aumentos, que a veces se ponen de manifiesto por discretos acortamientos del tiempo de Quick y de cefalina, se correlacionan inversamente con la concentración plasmática de albúmina, lo que sugiere una disminución de su catabolismo y un aumento de la síntesis hepática. En el síndrome nefrótico, hay además una pérdida significativa de factor II a través de la orina, lo que en algunos pacientes puede llevar a un déficit adquirido de protrombina²¹.

Alteraciones de la vía extrínseca y común en cirugía/circulación extracorpórea

En grandes cirugías, especialmente en cirugía cardíaca con *by-pass* cardiopulmonar, no son infrecuentes los déficit de fibrinógeno y del factor V. Éstos suelen ser debidos a una hiperfibrinólisis primaria en el lecho quirúrgico.

Déficit aislados de factores de la coagulación

Déficit de factor X

Mieloma

En 1992 se describió un caso de déficit aislado y recurrente de factor X²²; su etiología no está clara, aun-

que parece que las cadenas ligeras monoclonales se unirían al factor X circulante impidiendo su función.

Tumores sólidos/otras hemopatías

Se han referido déficit adquiridos de factor X en timoma, carcinoma renal/adrenal, carcinoma gástrico, leucemia no linfoblástica aguda y leucemia mieloblástica aguda en tratamiento con amsacrina²³.

Infecciones

Se han descrito déficit transitorios de este factor en el contexto de infección por *Mycoplasma pneumoniae*, observándose una recuperación completa de los niveles a las 3 semanas. El mecanismo es desconocido aunque se cree que el agente infeccioso y el factor X compartirían epítomos similares, siendo retirados de la circulación por el sistema inmune²³.

Inhibidores adquiridos

Son poco frecuentes y suelen ser transitorios. Se han descrito en el contexto de infecciones respiratorias, lepra, grandes quemados y aplicación de trombina tópica; también se han detectado inhibidores en ausencia de factor desencadenante^{23,24}.

Fármacos

Se ha descrito la asociación entre el uso de metilbromuro y la aparición de un déficit reversible de factor X.

Déficit de factor VII

Anemia aplásica

En los años 1980 se describieron varios casos de déficit de factor VII aislado o junto con un descenso de fibrinógeno en pacientes afectados de esta hemopatía, y que habían seguido tratamiento con inmunoglobulina antitimocítica y altas dosis de metilprednisolona. Aunque se desconoce la etiología, parece que podría deberse a una inhibición selectiva de la síntesis de ambos factores por un mecanismo aún no aclarado²⁵.

Inhibidores adquiridos

Se han descrito pocos casos, alguno de ellos asociado a la presencia de anticoagulante lúpico en un paciente con virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y adicto a drogas por vía parenteral o en el contexto de aplasia medular por la unión de un anticuerpo a un sitio no activo dando lugar a un incremento en el aclaramiento del factor^{26,27}.

Déficit de factor V

Inhibidores adquiridos

El antecedente más frecuentemente observado (hasta dos terceras partes de los casos) es la cirugía previa a la aparición del inhibidor y en la mayoría de los casos asociado al uso de trombina tópica o

fibrin glue debido a que esta sustancia contiene trombina y factor V bovinos que dan lugar a la aparición de anticuerpos contra la trombina bovina y/o factor V con reactividad cruzada frente a los respectivos factores humanos de la coagulación. Otras circunstancias en las que se ha constatado la presencia de un inhibidor son: pacientes con déficit congénito de factor V en tratamiento sustitutivo, tuberculosis pulmonar, tiroiditis de Hashimoto, cirrosis biliar primaria, glomerulonefritis membranosa, penfigoide bulloso, enfermedad por crioaglutininas, síndrome de Sjögren, lupus, dermatomiositis y sarcoma de Kaposi en paciente VIH positivo^{24,28-30}. Finalmente, hay casos idiopáticos, en los que no se descubre ninguna asociación. Hay que destacar la variabilidad clínica que presentan los pacientes con inhibidores frente al factor V. Este hecho tal vez se deba a que el factor V plaquetario podría inactivar en parte el inhibidor, protegiendo al paciente de una clínica hemorrágica y explicando por qué algunos pacientes con inhibidor frente al factor V y clínica hemorrágica dejan de sangrar al recibir una transfusión de plaquetas.

Déficit de factor II

Fármacos

Ya se ha comentado en el punto correspondiente a la síntesis de factores vitamina K dependientes que diversos fármacos anticonvulsivantes (valproato, fenitoína, carbamazepina y fenobarbital) conllevan un incremento de los PIVKA II y descenso de niveles totales de protrombina por interferencia en el proceso de carboxilación.

Infecciones

Se ha descrito un caso de hipoprotrombinemia adquirida asociada a un anticoagulante lúpico en el contexto de un proceso viral en una niña de 2 años, el déficit fue de presentación aguda y rápida recuperación³¹.

Síndrome nefrótico

Como se ha descrito previamente en el síndrome nefrótico puede existir un descenso de los niveles plasmáticos de factor II y un incremento en la excreción urinaria³².

Inhibidores

En el contexto de síndrome antifosfolípido es frecuente la presencia de anticuerpos frente a la protrombina generalmente en ausencia de hipoprotrombinemia. En los casos en los que se observa un descenso en los niveles de factor II parece deberse a un incremento en su aclaramiento a través de la formación de inmunocomplejos. Por otro lado se han descrito anticuerpos frente a la trombina en pacientes con antecedentes de enfermedades autoinmunes o sometidos a cirugía con el uso de trombina bovina o *fibrin glue*^{33,34}.

Bibliografía

1. Kerr R. New insights into haemostasis in liver failure. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003;14(Suppl 1):43-5.
2. Tacke F, Schoffski P, Trautwein C, Manns MP, Ganser A, von Depka M. Tissue factor and thrombomodulin levels are correlated with stage of cirrhosis in patients with liver disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001;12:539-45.
3. Deltcher SR. Interpretation of the international normalised ratio in patients with liver disease. *Lancet* 2002;359:47-8.
4. Kovacs M. International normalised ratio and liver impairment. *Lancet* 2002;359:1695.
5. Booth SL, Suttie JW. Dietary Intake and Adequacy of Vitamin K. *J Nutr* 1998;128:785-8.
6. Iber FL, Shamszad M, Miller PA, Jacob R. *Alcohol Clin Exp Res* 1986; 10:679-81.
7. O'Shaughnessy D, Allen C, Woodcock T, Pearce K, Harvey J, Shearer M. Echis time, under-carboxylated prothrombin and vitamin K status in intensive care patients. *Clin Lab Haematol* 2003;25:397-404.
8. Committee on Fetus and Newborn. Controversies Concerning Vitamin K and the Newborn. *Pediatrics* 2003;112:191-2.
9. Greer FR. ¿Are breast-feed infants vitamin K deficient? *Adv Exp Med Biol* 2001;501:391-5.
10. Krasinsky SD, Russell RM, Furie BC, Kruger SF, Jacques PF, Furie B. The prevalence of vitamin K deficiency in chronic gastrointestinal disorders. *Am J Clin Nutr* 1985;41:639-43.
11. Beker LT, Ahrens RA, Fink RJ, O'Brien ME, Davidson KW, Sokoll LJ, et al. Effect of vitamin K1 supplementation on vitamin K status in cystic fibrosis patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997;24:512-7.
12. Wood TC, Johnson KL, Naylor S, Weinshilboum RM. Cefazolin administration and 2-methyl-1,3,4-thiadiazole-5-thiol in human tissue: Possible relationship to hypoprothrombinemia. *Drug Metab Dispos* 2002; 30:1123-8.
13. Lipsky JJ, Gallego MO. Mechanism of thioamide antithyroid drug associated hypoprothrombinemia. *Drug Metabol Drug Interact* 1988;6: 317-26.
14. Davies VA, Rothberg AD, Argent AC, Atkinson PM, Staub H, Pienaar NL. Precursor prothrombin status in patients receiving anticonvulsant drugs. *Lancet* 1985;1:126-8.
15. Van Deventer SJH, Büller HR, ten Cate JW, Aarden LA, Hack CE, Sturk A. Experimental endotoxemia in humans: analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic, and complement pathways. *Blood* 1990; 76:2250-6.
16. Biemond BJ, Levi M, ten Cate H, Soule HR, Morris LD, Foster DL, et al. Complete inhibition of endotoxin-induced coagulation activation in chimpanzees with a monoclonal antibody to factor VII/VIIIa. *Thromb Haemost* 1995;73:15-20.
17. Taylor FB Jr, Chang A, Ruf W, Morrissey JH, Hinshaw L, Catlett, et al. Lethal *E. coli* septic shock is prevented by blocking tissue factor with monoclonal antibody. *Circ Shock* 1991;33:127-34.
18. De Jonge E, Dekkers PE, Creasey AA, Hack CE, Paulson SK, Karim A, et al. Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) dose-dependently inhibits coagulation activation without influencing the fibrinolytic and cytokine response during human endotoxemia. *Blood* 2000;95:1124-9.
19. Gando S, Kameue T, Morimoto Y, Matsuda M, Hayakawa M, Kemmotsu O. Tissue factor production not balanced by tissue factor pathway inhibitor in sepsis promotes poor prognosis. *Critical Care Medicine* 2002;30:1729-34.
20. Choufani EB, Sanchorawala V, Ernst T, Quillen K, Skinner M, Wright DG, et al. Acquired factor X deficiency in patients with amyloid light-chain amyloidosis: incidence, bleeding manifestations, and response to high-dose chemotherapy. *Blood* 2001;97:1885-7.
21. Vaziri ND, Toohey J, Paule P, Hung E, Darwish R, Barton CH, et al. Urinary excretion and deficiency of prothrombin in nephrotic syndrome. *Am J Med* 1984;77:433-6.
22. Schwarzingler I, Stain-Kos M, Bettelheim P, et al. Recurrent, isolated factor X deficiency in myeloma: repeated normalization of factor X levels after cytostatic chemotherapy followed by late treatment failure associated with the development of systemic amyloidosis. *Thromb Haemost* 1992;68:648-51.
23. Uprichard J, Perry DJ. Factor X deficiency. *Blood Rev* 2002;16:97-110.
24. Jiménez Yuste V, Villar A, Delgado J, Quintana M, Gago J, Hernández-Navarro F. Inhibidores adquiridos de la coagulación. *Haematologica* 2003;88 (Suppl 6):347-51.
25. Fischer M, Lechner K, Hinterberger W, Niessner H, Pabinger I, Dudczak R, et al. Deficiency of fibrinogen and factor VII following treatment of severe aplastic anaemia with anti-thymocyte globulin and high-dose methylprednisolone. *Scand J Haematol* 1985;34:312-6.
26. Ndimbie OK, Raman Bk, Saeed SM. Lupus anticoagulant associated with specific inhibition of factor VII in a patient with AIDS. *Am J Clin Pathol* 1989;91:491-3.
27. Aguilar C, Lucía JF, Hernández P. A case of an inhibitor autoantibody to coagulation FVII. *Haemophilia* 2003;9:119-20.
28. Takahashi H, Fuse I, Abe T, Yoshino N, Aizawa Y. Acquired factor V inhibitor complicated by Hashimoto's thyroiditis, primary biliary cirrhosis and membranous nephropathy. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003;14:87-93.
29. Ajzner E, Balogh I, Haramura G, Boda Z, Kalmar K, Pfliegler G, et al. Anti-factor V auto-antibody in the plasma and platelets of a patient with repeated gastrointestinal bleeding. *J Thromb Haemost* 2003;1:943-9.
30. Denis A, Baudeau C, Verdy E, Couderc R, Rondeau E, Sraer JD. Acquired circulating anticoagulant with anti-factor V activity in AIDS: first case report. *Nouv Rev Fr Hematol* 1995;37:165-9.
31. Houbouyan L, Armengaud D, Leroy B, Russi J, Gallet JP, Goguel A. Antiprothrombinase anticoagulant and acquired prothrombin deficiency in childhood viral pathology. Spontaneous recovery. *Arch Fr Pediatr* 1984;41:417-20.
32. Vaziri ND, Toohey J, Paule P, Hung E, Darwish R, Barton CH, et al. Urinary Excretion and deficiency of prothrombin in nephrotic syndrome. *Am J Med* 1984;77:433-6.
33. Bajaj SP, Rappaport SJ, Fierer DS, Herbst HCKD, Schwartz DB. A mechanism for the hypoprothrombinemia of the acquired hypoprothrombinemia-lupus anticoagulant syndrome. *Blood* 1983;61:684.
34. Flaherty MJ, Henderson R, Wener MH. Iatrogenic immunization with bovine thrombin: A mechanism for prolonged thrombin times after surgery. *Ann Intern Med* 1989;111:631-4.

PERSPECTIVAS ACTUALES EN EL TRATAMIENTO DE LA BETATALASEMIA MAIOR

COORDINADORA: A. VILLEGAS. *Falta centro??, Madrid*

Resumen del simposio

Las talasemias constituyen desórdenes de la hemoglobina que se caracterizan por una disminución o ausencia de síntesis de alguna cadena de hemoglobina, mientras que las hemoglobinopatías son alteraciones estructurales de la cadena de globina, que dan lugar a variantes de la hemoglobina normal.

Dentro de estos cuadros, la betatalasemia maior, la hemoglobinopatía SS o SC y las interacciones betatalasemia/hemoglobinopatía S, producen cuadros clínicos severos que requieren cuidados médicos especiales y tratamiento de sus complicaciones.

El tratamiento de la betatalasemia maior, ha contribuido de una manera notoria a lo largo de los últimos años, a mejorar el pronóstico, supervivencia y calidad de vida de estos pacientes, de tal modo que el 96% de los pacientes con betatalasemia severa superan en el momento actual la tercera década de la vida.

Las complicaciones fundamentalmente vienen derivadas de la terapéutica transfusional y de la sobrecarga del hierro del organismo, motivada en parte por las transfusiones, pero también por el aumento de la absorción de hierro.

En España el número de pacientes con talasemia maior es muy inferior al de otros países de la cuenca mediterránea, como India o Grecia; sin embargo, debido al éxito del régimen hipertransfusional, nos encontramos con un número cada vez mayor de pacientes en edad adulta, que requieren un adecuado manejo terapéutico.

En este simposio analizamos el tratamiento de la betatalasemia maior y de sus complicaciones.

En primer lugar la Dra. Domenica Capellini, con su dilatada experiencia, nos detalla el tratamiento convencional de la betatalasemia, señalando cómo a partir de 1975 los pacientes italianos con el régimen hipertransfusional, tienen una probabilidad de supervivencia a los 20 años superior al 96%. Comenta un aspecto realmente importante, como es en qué momento debe iniciarse la terapia transfusional. De acuerdo con su experiencia este inicio depende de varios factores como el tipo de defectos moleculares, la severidad de la anemia, el grado de eritropoyesis ineficaz, así como de otros criterios clínicos.

Comenta el papel de la esplenectomía y la terapia quelante con hierro y los resultados del trasplante de médula ósea.

Señala como más frecuentes, las complicaciones cardíacas, infecciosas o las disfunciones endocrinas. Dentro del capítulo de las infecciones comenta cómo, a pesar de suponerse una susceptibilidad mayor a padecer infecciones en los pacientes talasémicos con sobrecarga de hierro, en la práctica no parece evidente el aumento de infecciones bacterianas a excepción de la *Yersinia enterocolitica* en pacientes con sobrecarga férrica tratados con desferrioxamina.

Las anomalías endocrinas son otras de las complicaciones con retraso de la pubertad, alteraciones de la función hipotalámica, trastorno de la fertilidad u osteoporosis. Todas estas complicaciones ponen de manifiesto la necesidad de colaboración de un equipo multidisciplinario, compuesto por enfermeras entrenadas, hematólogos y médicos especialistas.

El diagnóstico y tratamiento de las complicaciones cardíacas de la sobrecarga de hierro en pacientes con betatalasemia, es analizado en mayor profundidad por el Dr. Vilacosta.

Señala cómo es la principal causa de muerte de los pacientes talasémicos, y cómo la disfunción ventricular depende, fundamentalmente, de la cantidad de hierro depositada en ambos ventrículos.

En el diagnóstico, resalta la utilidad de diferentes métodos diagnósticos, matizando cómo la técnica de elección para estudiar la función diastólica y sistólica es el ecocardiograma.

Finalmente, describe el tratamiento a utilizar cuando se produce insuficiencia cardíaca, cuyo pronóstico señala, incluso con tratamiento adecuado de diuréticos, betabloqueantes, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina o espirolactonas, es muy mala.

El manejo de los enfermos de talasemia maior con sobrecarga de hierro es analizado por el Dr. Renzo Galanello de la Universidad de Cagliari, que ha participado en varios protocolos multicéntricos con desferroxiamina y deferipona en pacientes con talasemia maior.

Comenta, en primer lugar, la probada eficacia de la desferroxiamina como un medicamento eficaz para disminuir los depósitos de hierro del organismo, aunque señala los problemas derivados de su empleo.

El quelante ideal de hierro, deberá cumplir las siguientes propiedades: tener una alta afinidad y especificidad, una alta eficacia *in vivo* para conseguir un balance negativo de hierro y la menor toxicidad posible. Otro factor importante es la posibilidad de administración por vía oral.

Analiza a continuación una serie de nuevos quelantes orales de hierro, unos con mayor experiencia como deferiprona y otros nuevos compuestos analizados en animales o en fases más avanzadas como desferri-thiocina bishidroxy-phenyl thiazole (ICL-670) y otros. Se han realizado estudios en fase I y II con ICL-670. Estudios preliminares indican que 20 mg/kg/día de ICL-670, pueden tener una eliminación similar de hierro que la desferroxiamina a dosis de 40 mg/kg/día.

En el momento actual, nuevas estrategias de quelación con desferroxiamina y dereriprona, mejoran la seguridad y eficacia de cada fármaco por separado y su efecto puede ser sinérgico y contribuir a eliminar mayor cantidad de hierro.

La última ponencia corre a cargo del Dr. Madero et al, y recoge la experiencia de los trasplantes de médula ósea en la betatalasemia maior.

En el registro Europeo de trasplantes de médula ósea EBMT, en abril de 2004 se recogen 2.312 trasplantes de pacientes con betatalasemia maior realizados en 112 centros, de ellos 1.003 han sido trasplantados por Guido Lucarelli en Italia. En todos ellos la fuente de progenitores fue la médula ósea de donantes familiares histocompatibles. Estos pacientes han sido estratificados en tres grupos, siendo los resultados óptimos para los niños y adultos jóvenes, en los grupos de riesgo 1 y 2.

Comentan las modificaciones que a partir del año 1997 se han realizado en los pacientes de riesgo 3 (pacientes con quelación irregular, hepatomegalia y fibrosis hepática), así como los resultados obtenidos con un nuevo protocolo de acondicionamiento, con una supervivencia global de 93% y una supervivencia libre de enfermedad de 85%. Por tanto, los resultados obtenidos con estas modificaciones en los pacientes de riesgo 3, son, en la actualidad, similares a los obtenidos previamente con los pacientes de los grupos 1 y 2.

Analizan posteriormente los resultados de trasplante de donantes no emparentados. Las series son cortas. La serie más amplia incluye 32 pacientes y los resultados no son concluyentes, dado que unos autores recomiendan realizarlo sólo en pacientes del grupo 3 y otros señalan que debe ser realizado en pacientes jóvenes y del grupo 1.

También puede realizarse el trasplante con otras fuentes de progenitores, como sangre periférica o sangre del cordón. Así el grupo Eurocord ha comunicado la realización de 37 trasplantes de cordón umbilical de donantes familiares idénticos en pacientes con betatalasemia maior, con una supervivencia libre de enfermedad del 80%.

Finalmente, analizan y comentan los acondicionamientos de intensidad reducida en dos series publicadas en la literatura médica de 7 y 13 pacientes, respectivamente.

En resumen, este simposio es una puesta al día del tratamiento de los pacientes betatalasémicos, que va a ser una gran ayuda para el manejo, día a día, de los enfermos.

TREATMENT OF BETATHALASSAEMIA MAJOR AND OF ITS COMPLICATIONS

M.D. CAPPELLINI, D.BIGNAMINI,

E. CASSINERIO AND L. ZANABONI

*Centro Anemie Congenite-Policlinico Hospital IRCCS.
University of Milan. Italia.*

Conventional treatment

Quality and duration of life of transfusion-dependent β -thalassaemia patients have been transformed over the last ten years with life expectancy increasing well into the third and fourth decades. Nevertheless, the life prolongation discloses several complications, partly due to the underlying disorder, partly related to the conventional treatment with blood transfusions and to iron overload. Moreover, we are starting to deal with complications aging related, in the contest of a multiorgans disease that requires for a proper management a team of hematologists or clinicians who have specific knowledge of thalassaemias, working together with different specialists and well trained nurses. A cooperative study involving seven Italian centres, reveals that today almost 80 % of the Italian patients are aged over 20 years. At follow-up evaluation, the probability of survival calculated by Kaplan-Meier method, at 25 years was 82 % for patients born in the years 1970-1974, up to 96 % probability of survival at 20 years for patients born in 1975-1979¹. The definition of the optimal transfusion and iron chelation regimen has been the most important advance in the management of the disorder with the primary objective to keep under control the ineffective erythropoiesis, its consequences and the iron burden. The optimal transfusion regimen involves regular blood transfusions, usually administered every two to five weeks, to maintain the pretransfusion haemoglobin level above 9-10.5g/dl. The decision to initiate lifelong transfusion therapy should be based on a definitive diagnosis of severe thalassaemia, taking into account the molecular defects, the severity of anaemia on repeated measurement, the level of ineffective erythropoiesis and clinical criteria such as failure to thrive or bone changes.

Many patients with thalassaemia major require splenectomy because of hypersplenism, however, optimal clinical management may delay or even exclude the need for splenectomy. Splenectomy should be considered for patients whose annual blood consumption increase progressively, responsible for significant increase of iron stores despite good chelation therapy or, in presence of symptoms due to spleen enlargement. Clinical problems related to leucopenia or thrombocytopenia due to hypersplenism could also be the reasons for considering splenectomy. The major complication of

splenectomy is severe and sometimes overwhelming infection. Because removal of the spleen may reduce the primary immune response to encapsulated organisms, it is advisable to delay splenectomy until patients are at least 5 years old or more^{2,3}. Unfortunately the mortality rate for postsplenectomy overwhelming infection in thalassaemia patients is approximately 50 % despite intensive supportive care, therefore it is mandatory to adopt preventive measures including immunoprophylaxis (vaccination against streptococcus pneumoniae, pneumococcus and meningococcus), chemoprophylaxis and parent and patient education to recognize and report febrile illnesses⁴.

Iron overload is an inevitable and serious complication of long-term blood transfusion therapy which requires adequate treatment in order to prevent early death mainly from iron-induced cardiac disease. It has been clearly shown that optimal chelation therapy extends complication-free survival. The gold standard of chelation therapy remains the use of desferrioxamine (DFO) because its long-term efficacy has been extensively documented in large multicenter trials in Italy and elsewhere^{5,6}. Unfortunately, compliance with the rigorous requirements of daily subcutaneous infusions is a serious limiting factor and in non-compliant patients life expectancy is not different from that in the pre-DFO era. This is the rationale behind the intensive effort to identify alternative, orally effective iron chelators. The most studied oral chelator is Deferiprone (DFP) that has a high rate of intestinal absorption. In Europe, according to the EMEA, treatment with DFP should be considered in patients unable to use DFO or patients with an unsatisfactory response to DFO as judged by serum ferritin levels and by liver iron concentration⁷. At a DFP dose of 75 mg/Kg/day, iron stores may decrease in some patients, remain stable in others and increase in some others⁸. Recent studies indicate that DFP may be more effective than DFO in protecting the heart from the accumulation of iron^{9,10}. A potential benefit of combined DFO/DFP therapy has been hypothesized. An additive effect of DFO and DFP has been proved in vitro and in vivo, whereas a synergistic effect is not yet well documented, however, at present, there are no consistent data on long-term safety and efficacy of DFO/DFP combination treatment. A new and promising orally effective iron chelator, ICL670 (Exjade) has been developed and it is in phase III study. Phase II results indicate that a single daily dose of 20 mg/Kg it may be as effective as sc DFO 40mg/Kg/day. Pharmacokinetic studies showed that ICL670 has a low rate of clearance from the circulation, and at a dose of 20-40 mg/Kg/day is able to induce a negative iron balance¹¹. Other oral iron-chelating agents are under investigation in pre-clinical or phase I trials, such as GT56-252, 40sD02, second-generation hydroxyridones.

Bone marrow transplantation

Marrow transplantation from HLA-identical siblings has been increasingly adopted for the cure of Thalassaemias. Since 1981 a large clinical experience has been gained with more than 2000 bone marrow transplants performed in many centres world wide. Three classes of patients have been identified on the basis of *a*) the inadequacy of iron chelation therapy, *b*) the presence of liver fibrosis and *c*) hepatomegaly. Patients in Class I have none of these characteristics, patients in Class II have one or two, and patients in Class III have all three characteristics. These risk factors have been found to significantly influence the post-transplant outcome. Among Class I thalassaemic children transplanted early in the course of the disease, the probabilities of survival and disease-free survival are 93 % and 91 %, with a 2 % risk of rejection and a risk of transplant-related mortality of 8 %. The outcome between centres that perform transplants in patients with broadly similar characteristics are comparable. The probabilities of survival, disease-free survival, rejection and non-rejection mortality are respectively 87 %, 83 %, 3 % and 15 % for Class II patients and 79 %, 58 %, 28 %, and 19 % respectively for Class III patients. In this last category of patients, the improvement of conditioning regimens resulted in a significant decrease of transplant-related mortality, but with a concomitant increased risk of graft rejection. Patients older than 16 years of age are classified as adults. In the adult group, the probability of surviving the transplant is 66 %, the probability of cure is 62 %, with a 35 % chance of transplant-related mortality and 5 % of returning to the pre-transplant thalassaemic condition¹². However, only 25-30 % of patients have an HLA-compatible sibling, thus a vast majority lack a suitable donor. Recently, the Italian cooperative group for bone marrow transplantation reported on 32 patients aged 2-28 years, transplanted with bone marrow cells from an unrelated donors. The results of this study indicate that BMT from unrelated donors may have results comparable with those obtained in transplants using HLA-identical family donors, particularly for patients with lesser iron overload, provided that stringent criteria of compatibilità are employed for donor selection¹³. An alternative source of haematopoietic stem cells could be the umbilical cord blood (CBT). A recent study from the Eurocord cooperative group, analysing the outcome of 44 patients with either thalassaemia or Sickle Cell Disease transplanted with cord blood cells from a sibling, has reported no deaths from transplant-related complications, suggesting that related CBT for thalassaemia is a safe procedure¹⁴.

Thalassaemia-related complications

The frequency and severity of many complications depend to a large extent on the way that patients are managed since childhood, particularly with respect

to their steady-state hemoglobin level and effectiveness of chelation therapy.

Cardiac complications

Cardiac complications remain the most important in determining the survival of β thalassaemia major patients^{5,6}. It should be emphasized that they are not restricted to the effect of anemia and iron loading although they are by far the most important factors. Myocarditis, pulmonary hypertension that can be related to iron overload but also follow recurrent small pulmonary emboli have been recently reported in adult patients. According to the "guidelines for the clinical management of thalassaemia"⁹, the basic cardiological assessment should periodically include: 12-lead electrocardiogram, chest X ray and echocardiogram. The therapeutic strategy to prevent or treat heart complications in patients with thalassaemia involves some general measures and specific cardiological interventions. As a general measures it is advisable in patients with heart disease: *a*) to maintain the pre-transfusional hemoglobin level close to 10-11 g/dl; *b*) to have a regular iron-chelation therapy and an aggressive (s.c. or i.v.) chelation in case of severe iron load *c*) to ensure a surveillance and adequate management of other causes of cardiomyopathies such as hypothyroidism, hypoparathyroidism, vitamin C deficiency etc. The treatment with specific medications has to be evaluated case by case¹⁵.

Infections

Thalassaemic patients have an increased risk of infections because of splenectomy, iron load and blood-borne infections, particularly viral. The role of iron load and iron chelation in susceptibility to infection has been questioned and it is not yet fully established. In a detailed review it was concluded that iron overload is not associated with an impressive increase in the incidence or severity of bacterial infections with one exception for *Yersinia enterocolitica*. Unlike most other bacteria, *Yersinia enterocolitica*, makes no siderophores of its own and therefore lives better in an iron-rich environment or by using the siderophores of other microorganisms to acquire iron. Desferrioxamine is the natural siderophore of *Streptomyces pilosus*, and *Yersinia* can use ferrioxamine for growth. As soon as *Yersinia enterocolitica* infection is suspected by clinical symptoms (fever, abdominal pain, diarrhoea and vomiting), iron chelation therapy *must be immediately stopped* and antibiotic treatment *must be immediately started*. Ciprofloxacin is the recommended first line treatment. Patients with *Yersinia*-induced septicemia have an increased risk of mortality and should therefore receive intravenous antibiotic therapy. Good responses have been reported with trimethoprim-sulfomethoxazole. Iron chelation should not be restarted until the symptoms have completely disappeared and the patient has re-

covered¹⁶. The blood-borne viral infections, particularly hepatitis B and C and more recently HIV, have relatively high frequency in transfusion-dependent β thalassemia patients. The management of post-transfusion hepatitis in these patients should be undertaken according to the updated indications¹⁷ taking into account a series of important issues that are peculiar for thalassaemic patients, such as iron overload, endocrine dysfunction, psychological status. Since there is increasing evidence that iron load of the liver increases the severity of viral hepatitis, it is very important to measure the liver iron concentration (LIC) on the liver biopsy that must be performed before starting any anti-viral treatment and, in case of severe iron overload, intensive chelation therapy has to be considered. The monitoring of antiviral treatment must be very rigorous and in collaboration with a specialist in liver disease.

Endocrine dysfunctions

Endocrine abnormalities are among the common complications of thalassaemia, despite good chelation therapy. Delayed puberty and defective function of the hypothalamic/pituitary axis occur in approximately 50% of both male and female patients. A proper treatment depends on factors such as age, severity of iron overload, chronic liver disease, thrombophilic status and the presence of psychological problems. All these issues must be discussed in collaboration between the doctor in charge for the patient's care, the endocrinologist and the patient himself. The hormones substitution, is usually started after pubertal assessment according to Tunner. Diabetes mellitus is also a relatively common complication in patients who have been inadequately iron chelated, although it has been observed also in adult well transfused and well chelated patients. The major problems dealing with in adult β thalassaemia patients are "fertility" and "osteoporosis". More and more adult thalassaemic patients in their second and third decade of life apparently well feeling, are asking for help with fertility. These patients have to be properly advised about any kind of risk by the primary physician and followed by a multidisciplinary team: induction of ovulation or of spermatogenesis must be performed under rigorous control and never prior a global evaluation of the patient including a detailed assessment of cardiac status, liver function, viral infection, endocrinopathies with particular emphasis on diabetes control and thrombophilic status.

Osteoporosis as a multifactorial complication is very common in adult thalassaemic patients of both sexes and requires an adequate management in order to prevent progressive disease and fractures. No guidelines are so far available, being several trials still ongoing with different compounds. Preliminary reports suggest that bisphosphonates improve the results of bone densitometry but the effect on bone strength remains uncertain¹⁸.

Acknowledgments

This work was supported by FIRB to MDC and by Policlinico Hospital IRCCS funds

References

- Borgna C, et al. Survival and complications in patients with thalassaemia major treated with transfusion and deferoxamine". *Haematologica*. In press.
- Olivieri NF, Nathan DG, MacMillan JH, et al. Survival in medically treated patients with homozygous beta-thalassaemia. *N Engl J Med* 1994; 331:574-8.
- Viens AM, Sharma S, Olivieri NF. Re-assessment of the value of splenectomy in thalassaemia major. *Blood* 1998;92:533a.
- Modell CB, Berdoukas VA. 1984. The clinical approach to thalassaemia. Grune and Stratton. New York.
- Brittenham GM, Griffith PM, Nienhuis AW, et al. Efficacy of deferoxamine in preventing complications of iron overload in patients with thalassaemia major. *N Engl J Med* 1994;331:567-72.
- Piga A, Longo F, Consolati A, et al. Mortality and morbidity in thalassaemia with conventional treatment. *Bone marrow transplant* 1997;19: 11-3.
- Hoffbrand AV, Cohen A, Hershko C. Role of deferiprone in chelation therapy for transfusional iron overload. *Blood* 2003;102:17-24.
- Ceci A, Baiardi P, Felisi MG, et al. The safety and effectiveness of deferiprone in a large scale, 3 year study in Italian patients. *Br J Haematol* 2002;118:330-5.
- Anderson LJ, Wonke B, Prescott E, et al. Comparison of effects of oral deferiprone and subcutaneous desferrioxamine on myocardial iron concentrations and ventricular function in beta-thalassaemia. *Lancet* 2002;360:516-20.
- Piga A, Gaglioti C, Fogliaccio E, Tricta F. Comparative effects of deferiprone and deferoxamine on survival and cardiac disease in patients with thalassaemia major: A retrospective analysis. *Haematologica* 2003;88:489-96.
- Cappellini MD. Clinical overview of ICL670. Podium presentation 33: Bioiron 2003. 16th International Conference of the International Bioiron Society. Bethesda May 4-9, 2003.
- Lucarelli G, Andreani M, Angelucci E. The cure of thalassaemia by bone marrow transplantation. *Blood Rev* 2002;16:81-5. Review.
- Locatelli F, De Stefano P. New insights into haematopoietic stem cell transplantation for patients with haemoglobinopathies. *Brit J Haematol* 2004;125:3-11.
- Locatelli F, Rocha F, Reed W, et al. Related umbilical cord blood transplantation in patients with thalassaemia and sickle cell disease. *Blood* 2003;101:2137-43.
- Guidelines for the Clinical Management of Thalassaemia. Eds: Cappellini MD, Cohen A, Eleftheriou A, Piga A, Porter J. Thalassaemia International Federation; 2000. Disponible en: <http://www.thalassaemia.org.cy>.
- Adamkiewicz TV, Berkovitch M, Krishnan C, Polsinelli K, Kermack D, Olivieri NF. Infection due to *Yersinia enterocolitica* in a series of patients with beta-thalassaemia: incidence and predisposing factors. *Clin Infect Dis* 1998;27:1362-6.
- Shad JA, McHutchinson JG. Current and future therapies of hepatitis C. *Clin Liver Dis* 2001;2:335-59.
- Italian Working Group on Endocrine Complications in Non-endocrine Disease. Multicentre study on prevalence of endocrine complications in thalassaemia major. *Clin Endocrinol* 1995;42:581-6.

DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LAS COMPLICACIONES CARDÍACAS DE LA SOBRECARGA FÉRRICA EN PACIENTES CON BETATALASEMIA MAIOR

I. VILACOSTA

Instituto Cardiovascular. Hospital Universitario de San Carlos. Madrid.

Las complicaciones cardíacas son la causa más frecuente de muerte en los pacientes con betatalasemia maior¹⁻³. En los niños con talasemia, la insuficiencia cardíaca y las arritmias son las causas más

frecuentes de muerte. En esta enfermedad, los eventos cardíacos son en parte secundarios a la presencia de una anemia crónica; pero además, y a diferencia de lo que ocurre en otras anemias crónicas, en la talasemia la hemosiderosis cardíaca es un problema importante.

En la betatalasemia maior la sobrecarga de hierro es el resultado de una combinación de hemólisis extravascular, transfusiones frecuentes y un aumento inapropiado de la absorción de hierro intestinal. Aunque la anemia de por sí contribuye, sin duda, a la cardiomegalia, la sobrecarga de hierro cardíaca tiene un impacto muy importante sobre la función diastólica y sistólica del ventrículo izquierdo y es la causa más frecuente de disfunción ventricular en estos pacientes.

En 1982, Economidou⁴ encontró que la mortalidad de 441 pacientes griegos con talasemia maior e intermedia era similar a la de la población general hasta los 6 años. A partir de ahí, la mortalidad aumentaba gradualmente de tal manera que a los 28 años tan sólo el 24% estaban vivos. Zurlo et al⁵ estudiaron la supervivencia y causas de muerte en 1.087 pacientes italianos con talasemia maior que nacieron después del 1 de enero de 1960. De los pacientes nacidos entre 1970 y 1974, el 97,4 y el 94,4% estaban vivos a los 10 y 15 años, respectivamente. Las causas más frecuentes de muerte fueron las cardiopatías seguidas de las infecciones, hepatopatías y neoplasias. La esperanza de vida de estos pacientes ha mejorado notablemente en los últimos años debido, fundamentalmente, a una disminución de la mortalidad de origen cardíaco; no obstante, las cardiopatías siguen siendo la causa más frecuente de muerte en estos pacientes^{1-3,6}.

Si no se inicia un tratamiento quelante (desferroxamina) intensivo durante los primeros 10 años de vida, en la segunda década de la vida aparecen manifestaciones clínicas de afectación cardíaca (insuficiencia cardíaca) y estos pacientes fallecen bien por insuficiencia cardíaca progresiva u ocasionalmente de muerte súbita secundaria a una arritmia³.

En la necropsia, se puede observar una acumulación importante de hierro en todas las vísceras. Se trata de un corazón que está aumentado de peso, hipertrófico y dilatado. Adquiere un tono pardusco por la gran cantidad de hierro acumulado en los cardiomiocitos que se puede demostrar tiñendo las preparaciones histológicas con azul de Prusia o con la tinción de Pearl. En el análisis histológico, el nodo sinusal puede ser normal, mientras que el nodo auriculoventricular está habitualmente afectado.

La disfunción ventricular depende fundamentalmente de la cantidad de hierro depositada en los ventrículos. Algunos autores creen que la lesión miocárdica es el resultado de la liberación de hidrolasas ácidas por los lisosomas, inducida por el hierro³. Otros han relacionado los depósitos férricos con la probabilidad de presentar un infarto. El incremento

de hierro podría aumentar el estrés oxidativo endotelial generado por los radicales libres catalizados por el metal. En la literatura especializada se han descrito infartos en pacientes con talasemia maior⁷. El ventrículo derecho tampoco se libra de la afectación cardíaca en esta enfermedad⁸.

En el diagnóstico de la miocardiopatía de estos pacientes podemos utilizar distintas herramientas diagnósticas; la radiografía de tórax, el electrocardiograma, los estudios isotópicos y el cateterismo pueden ser útiles. Sin embargo, la técnica de elección para evaluar la función sistólica y diastólica de estos pacientes es la ecocardiografía.

La radiografía de tórax puede demostrar la existencia de cardiomegalia y otros signos clásicos de insuficiencia cardíaca. En el electrocardiograma se observan datos de hipertrofia ventricular izquierda, cambios inespecíficos de la repolarización ventricular (alteraciones del segmento ST y de la onda T), extrasistolia supraventricular o ventricular y bloqueo auriculoventricular de primer y segundo grado. El hisiograma puede demostrar la existencia de una prolongación del intervalo PR como reflejo de una conducción anormal en el nodo auriculoventricular. El descenso del segmento ST constituye un signo específico de lesión miocárdica.

En el ecocardiograma Doppler color se puede observar un aumento de los diámetros del ventrículo izquierdo, aurícula izquierda y aorta, y también, un incremento del grosor de la pared ventricular. Utilizando la técnica Doppler se puede valorar bien la función diastólica, tanto por el patrón de Doppler pulsado (ondas de llenado ventricular izquierdo) como por el patrón de Doppler tisular en el anillo auriculoventricular. Con el modo-M color podemos ahora estudiar la velocidad de propagación de la sangre durante el llenado ventricular. También con el Doppler tisular se puede interrogar el patrón de velocidades de los diferentes segmentos miocárdicos y, todo ello, ayuda a la realización de un diagnóstico precoz. Algunos autores han demostrado que las alteraciones del llenado ventricular (patrón de llenado restrictivo) y de la función diastólica se producen en una etapa precoz (pre-clínica) de la enfermedad, cuando la función sistólica es normal⁹. Mediante la ecocardiografía de estrés con dobutamina a dosis bajas, se puede documentar una reducción de la reserva contráctil del ventrículo izquierdo en pacientes asintomáticos, lo que de nuevo permite identificar precozmente a estos individuos¹⁰.

En el cateterismo podemos observar elevación de la presión telediastólica del ventrículo izquierdo, aumento de los volúmenes ventriculares y disminución de la fracción de eyección.

La mitad de los pacientes con talasemia tienen algún episodio de pericarditis seca (pericarditis estéril) que se atribuye a la hemosiderosis. Los enfermos presentan dolor precordial, fiebre y los típicos trastornos electrocardiográficos de la pericarditis. El de-

rrame pericárdico es frecuente y, en ocasiones, es necesario realizar una ventana pericárdica.

El tratamiento de la betatalasemia mayor consiste principalmente en un programa de transfusión adecuado con "hipertransfusión", esplenectomía y tratamiento precoz de las infecciones. La hemoglobina se debe mantener por encima de 12 g/dl. El uso de agentes quelantes (desferroxamina) para el tratamiento y prevención de la sobrecarga de hierro es absolutamente necesario. Este tratamiento debe iniciarse precozmente para prevenir la lesión de los órganos, puesto que cuando la sobrecarga de hierro de los tejidos es ya importante es difícil extraer el hierro. Los criterios de tratamiento quelante en la talasemia mayor se han definido con claridad¹¹. La desferroxamina debe ser administrada por vía parenteral con infusiones de 8 a 15 h y de manera periódica (3-7 veces por semana). El ácido ascórbico puede facilitar la extracción de hierro por la desferroxamina. Si el paciente llega a desarrollar insuficiencia cardíaca su pronóstico es malo. En esta situación, el tratamiento óptimo de la insuficiencia cardíaca (diuréticos, betabloqueantes, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina y espirolactona) con o sin fármacos antiarrítmicos no cambia mucho la historia natural del paciente. Sin embargo, se han descrito pacientes en los que la función ventricular ha revertido parcial o completamente con el tratamiento intensivo con quelantes del hierro¹²⁻¹⁴. Puede aparecer fibrilación auricular, flúter, taquicardia supraventricular o arritmias ventriculares que pueden deprimir aún más la disfunción sistólica del ventrículo izquierdo y empeorar la situación funcional del paciente. En estos casos el tratamiento debe ser individualizado.

Bibliografía

- Kremastinos DT. Heart failure in beta-thalassemia. *Congest Heart Fail* 2001;7:312-4.
- Aessopos A, Farmakis D, Karagiorga M, et al. Cardiac involvement in thalassemia intermedia: a multicenter study. *Blood* 2001;97:3411-6.
- Kremastinos DT, Tsetsos GA, Tsiapras DP, Karavolias GK, Ladis VA, Kattamis CA. Heart failure in beta-thalassemia: A 5-year follow-up study. *Am J Med* 2001;111:349-54.
- Economidou J. Problems related to treatment of beta-thalassemia major. *Paediatrician* 1982;11:157-77.
- Zurlo MG, De Stefano P, Borgna-Pignatti C, et al. Survival and causes of death in thalassemia major. *Lancet* 1989;2:27-30.
- Ehlers LH, Levin AR, Klein AA, et al. The cardiac manifestations of thalassemia major: Natural history, noninvasive cardiac diagnostic studies, and results of cardiac catheterization. En: Engle MA, editor. *Pediatric Cardiovascular Disease*. Cardiovascular Clinics II. Philadelphia: Davis, 1981; p. 171-86.
- Fridlender ZG, Rund D. Myocardial infarction in a patient with beta-thalassemia major: first report. *Am J Hematol* 2004;75:52-5.
- Hahalis G, Manolis AS, Apostolopoulos D, Alexopoulos D, Vagenakis AG, Zoumbos NC. Right ventricular cardiomyopathy in beta-thalassemia major. *Eur Heart J* 2002;23:147-56.
- Spirito P, Lupi G, Melevendi C, Vecchio C. Restrictive diastolic abnormalities identified by Doppler echocardiography in patients with thalassemia major. *Circulation* 1990;82:88-94.
- Mariotti E, Agostini A, Angelucci E, Lucarelli G, Sgarbi E, Picano E. Reduced left ventricular contractile reserve identified by low dose dobutamine echocardiography as an early marker of cardiac involvement in asymptomatic patients with thalassemia major. *Echocardiography* 1996;13:463-72.
- Olivieri NF, Brittenham GM. Iron-chelating therapy and the treatment of thalassemia. *Blood* 1997;89:739-61.
- Wacker P, Halperin DS, Balmer-Ruedin D, Oberhansli I, Wyss M. Regression of cardiac insufficiency after ambulatory intravenous deferoxamine in thalassemia major. *Chest* 1993;103:1276-8.
- Miskin H, Yaniv I, Berant M, Hershko C, Tamary H. Reversal of cardiac complications in thalassemia major by long-term intermittent daily intensive iron chelation. *Eur J Haematol* 2003;70:398-403.
- Wu KH, Chang JS, Tsai CH, Peng CT. Combined therapy with deferoxamine and desferrioxamine successfully regresses severe heart failure in patients with beta-thalassemia major. *Ann Hematol* 2004;83:471-3.

MANAGEMENT OF IRON OVERLOAD IN PATIENTS WITH BETA-THALASSEMIA MAJOR. ORAL IRON CHELATING AGENTS

R. GALANELLO

Spedale Regionale Microcitemie ASL8. Dip.Scienze Biomediche e Biotecnologie. Università di Cagliari.

Over the past 30 years it has been clearly established that effective iron chelation therapy with desferrioxamine can correct and prevent the consequences of iron overload in patients with thalassemia, improving their survival. However, in spite of the proven efficacy of desferrioxamine, it is difficult to obtain an effective treatment in all patients because the use of desferrioxamine is cumbersome and unpleasant, resulting in low compliance. Moreover, in some countries the high cost of the drug and of supplies for its administration are significant obstacles for an effective treatment. Therefore, the need for orally active iron chelators has been recognized for a long time and over the last two decades, great research efforts have been devoted to the development of new iron chelators. Moreover, at same time consistent advances have been made in the knowledge and understanding of pathophysiology and consequences of iron overload, tissue iron damage and of methods of measuring excess iron in patients. While hundreds of iron chelators have been identified as candidate compounds and evaluated in animal models, only a few have been studied in humans, since the separation of the pharmacological from toxic effects has been difficult to achieve.

A range of physicochemical and biological properties are required for an ideal iron chelator, including oral availability, high affinity and specificity for iron, high chelating efficiency *in vivo* to achieve negative iron balance, and low toxicity profile. Difficulties in the development of iron chelators arise also from the lack of universal animal models and, even more important, from differences in the iron metabolism among different animal species and animals and man. Efficacy and toxic effects are not always reproducible; in different species; appropriate clinical studies in iron overloaded individuals are to be undertaken to obtain the proper judgement on the compound.

Deferiprone (DFP) is the only oral chelator available at present for clinical use. It was synthesized in

1982, and after several controversies, it has first been licensed in India in 1995, and then in Europe in 1999 but with restricted indication under the "exceptional circumstances" policy, that requires further studies. Completed these studies DFP achieved full marketing authorization in April 2004.

At the most used DFP dose of 75 mg/Kg/day iron stores may decrease in some patients, remain stable in others and increase in some others. The most serious adverse effect reported is agranulocytosis which occurs with an incidence of 0.6 per 100 patients-years¹. Other less significant adverse events are gastro-intestinal symptoms, arthralgia, zinc-deficiency and fluctuating liver function tests, especially in anti-HCV positive patients. Preliminary evidences from retrospective studies have indicated a possible cardioprotective role of DFP^{2,3}.

Several other iron-chelating compounds are in or near clinical trial, including desferriethiocin (DFT), bishydroxy-phenyl-thiazole (ICL-670), GT56-252, HBED and 40SD02. Others, such the second generation hydroxypyridones, are in preclinical development⁴.

DFT is a siderophore isolated from *Streptomyces antibioticus* and then produced by chemical synthesis. DFT is a tridentate iron chelator orally available. Unfortunately, the Fe (III) complex ferrithiocin is nephrotoxic. Therefore a number of DFT analogs have been synthesized and tested in animals. One of this analogs, 4-OH-desazadesmethyldesferriethiocin has been evaluated in animals, without evidence of adverse effects at the doses to be used clinically and is now ready for phase I studies in humans^{5,6}.

ICL-670 is a tridentate ligand, orally active, which has emerged as the best candidate for further development from the screening of 44 compounds of a new class of iron chelators, the triazole derivatives⁷. The basic structure of this completely new chemical class of iron chelators was developed on the basis of computer modelling by Novartis. ICL-670 has undergone extensive pre-clinical studies in animals, which have given the following results: ICL-670 promotes iron excretion mainly (90%) through the fecal route; the effective dose is around 20 mg/kg/day; it seems more potent than desferrioxamine and deferiprone; it is highly selective for iron. Nephrotoxicity observed in non-iron loaded animals, was significantly reduced in iron overloaded animals. Phase I and II studies with ICL-670 have been performed, to evaluate safety, tolerability and effects on liver iron concentration⁸⁻¹⁰. The compound is suitable for once daily administration and there is a close correlation between dose, pharmacokinetics and fecal iron excretion. Preliminary data have shown that ICL670 at a dose of 20 mg/kg/day produces a fall in liver iron concentration similar to desferrioxamine at 40 mg/kg/day. ICL670 has been generally well tolerated and not relevant toxic effects have been reported. These data support the long term use of

ICL670 and additional safety and efficacy data are currently being generated at higher doses.

GT56-252 is a tridentate novel orally available iron chelator under development by Genzyme¹¹. Pharmacokinetics and toxicology studies have been conducted in animals as part of a pre-clinical program to support phase I clinical studies. Iron excretion is rapid and more than 80% of the administered dose is eliminated in 24 hours with the feces.

HBED is an hexadentate chelator, first synthesized more than 30 years ago. Initial results in rodents showed activity after oral administration, but further evaluation in both iron loaded primates and humans revealed that the oral activity was too small to be of some utility in the treatment of iron overload¹². HBED has been re-examined as a parenteral chelator since the level of iron excretion in iron-loaded primates was more than twice that produced by an equimolar dose of desferrioxamine¹³.

Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) and its derivatives deserve a specific note. PIH, a tridentate oral chelator, was introduced by Ponka et al more than 20 years ago but, despite some promising result, the progress in the development has been very slow, mainly because being a not patentable agent the attractiveness for drug industry is seriously restricted¹⁴. Moreover, the therapeutic potential of PIH and its derivatives needs further evaluation.

Besides the new compounds under evaluation, a future perspective for iron chelation is represented by the combined use of two chelators. New strategies of chelation are being explored with desferrioxamine and deferiprone to improve the inadequacies of these chelators with respect to their safety and efficacy as single drugs. DFO and DFP seem to chelate iron from different pools and organs and their combined use may result in additive or synergistic effects in iron removal^{15,16}.

Conclusions

The clinical experience with DFO and DFP has shown that there is a wide variation among patients in response to different iron chelators, depending on the drug metabolism, mechanism of action and preferential site of removal. It is well known that the amount of iron excreted per given dose of a chelating agent may be different for each patient. We expect in the future, from having several chelators, that individual tailoring of chelation with appropriate dosages and schedule of administration, will result not only in more effective therapeutic protocols, but will have positive effects on compliance and quality of life of patients with thalassemia.

References

1. Cohen AR, Galanello R, Piga A, Dipalma A, Vullo C, Tricta F. Safety profile of the oral iron chelator deferiprone: a multicenter study. *Br J Haematol* 2000;108:305-12.

2. Anderson LJ, Wonke B, Prescott E, Holden S, Walker JM, Pennell D. Comparison of effects of oral deferiprone and subcutaneous desferrioxamine on myocardial iron concentrations and ventricular function in beta-thalassemia. *Lancet* 2002;360:516-20.
3. Piga A, Caglioti C, Fogliacco E, Tricta F. Comparative effects of deferiprone and deferoxamine on survival and cardiac disease in patients with thalassemia major: A retrospective analysis. *Haematologica* 2003; 88:489-96.
4. Tam TF, Leung-Toung R, Li W, et al. Iron Chelator Research: Past, Present and Future. *Current Medic Chem* 2003;10:1015-27.
5. Bergeron RJ, Wiegand J, Weimar WR, et al. Desazadesmethyl-desferri-thiocin analogues as orally effective iron chelators. *J Med Chem* 1999; 42:95-108.
6. Brittenham GM. Iron chelators and iron toxicity. *Alcohol* 2003;30: 151-8.
7. Nick H, Acklin P, Lattmann R, et al. Development of Tridentate Iron Chelators: From Desferri-thiocin to ICL670. *Current Medic Chem* 2003; 10:1065-76.
8. Capellini MD, Galanello R, Piga A, et al. Update on the effects of ICL670, a novel tridentate oral iron chelator, on liver iron concentration in patients with transfusion dependent iron overload. 7th EHA Conference, Florence, 2002.
9. Galanello R, Piga A, Alberti D, et al. Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of ICL670, a New Orally Active Iron-Chelating Agent in Patients with Transfusion-Dependent Iron Overload Due to β -Thalassemia: Pharmacokinetics and Drug Disposition. *J Clin Pharmacol* 2003;43:565-72.
10. Nisbet-Brown E, Olivieri NF, Giardina PJ, et al. Effectiveness and safety of ICL670 in iron-loaded patients with thalassaemia: A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Lancet* 2003; 361:1597-602.
11. Marquis JK, Aoude-Dagher R, Bree M, et al. Pharmacokinetics of GT56-252, a novel orally available iron chelator in rat, dog and cynomolgus monkey. 13th International conference on oral chelation in the treatment of thalassaemia and other diseases, Prague, 2003.
12. Grady RW, Salbe AD, Hilgartner MW, et al. Results from a phase I clinical trial of HBED. *Adv Exp Med Biol* 1994;356:351-9.
13. Bergeron RJ, Wiegand J, Brittenham GM. HBED ligand: preclinical studies of a potential alternative to deferoxamine for treatment of chronic iron overload and acute iron poisoning. *Blood* 2002;99: 3019-25.
14. Richardson DR, Ponka P. Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and its analogs: Potential orally effective iron-chelating agents for the treatment of iron overload disease. *J Lab Clin Med* 1998;131:306-14.
15. Giardina PJ, Grady RW. Chelation therapy in beta-thalassemia: an optimistic update. *Semin Hematol* 2001;38:360-6.
16. Link G, Konijn AM, Breuer W, et al. Exploring the "iron shuttle" hypothesis in chelation therapy: Effects of combined deferoxamine and deferiprone treatment in hypertransfused rats with labelled iron stores and in iron-loaded rat heart cells in culture. *Lab. Clin Med* 2001;138:130-8.

TRASPLANTE HEMATOPOYÉTICO EN TALASEMIA

J. SEVILLA, S. FERNÁNDEZ-PLAZA Y L. MADERO
Servicio Oncohematología Pediátrica. Hospital Infantil Universitario Niño Jesús. Madrid.

Betatalasemia y drepanocitosis son las enfermedades con base genética de mayor prevalencia. El soporte transfusional crónico con medidas para quelar la sobrecarga férrica es el único tratamiento indicado en la talasemia grave que ha demostrado una mejoría clínica de los pacientes y una mayor supervivencia. Sin embargo el único tratamiento curativo de la enfermedad hasta este momento es el trasplante hematopoyético. La supervivencia con esta medida terapéutica ha mejorado en los últimos años en base a la reducción de la mortalidad relacionada con el procedimiento y una menor frecuencia del fallo de injerto.

Hasta abril de este año, en el registro internacional del EBMT (European group for Blood and Marrow Transplantation) había constancia de 2.312 pacientes trasplantados por talasemia. Estos casos perte-

Tabla 1. Grupos de riesgo según Lucarelli et al (NEJM 1990)

	<i>Quelación</i>	<i>Hepatomegalia</i>	<i>Fibrosis hepática</i>
Grupo de riesgo 1	Regular	No	No
Grupo de riesgo 2 ^a	Regular/irregular	No/Sí	No/Sí
Grupo de riesgo 3	Irregular	Sí	Sí

^a Debe cumplir dos de los tres criterios.

Tabla 2. Resultados con acondicionamiento ciclofosfamida (200 mg/kg dosis total) y busulfán (14-16 mg/kg dosis total) de acuerdo a los grupos de riesgo

<i>Grupo de clasificación de Pesaro</i>	<i>Grupo de riesgo 1 (%)</i>	<i>Grupo de riesgo 2 (%)</i>	<i>Grupo de riesgo 3 (%)</i>
Supervivencia global	94	80	61
Supervivencia libre de eventos	94	77	53
Recaída	0	9	16

neían a 112 centros, siendo el centro con mayor experiencia el de Pesaro (Italia). La mayor parte de los trasplantes se realizaron a partir de donantes familiares idénticos (90%) y empleando como fuente de progenitores la médula ósea (90%) (Angelucci, comunicación personal).

El doctor Guido Lucarelli y su grupo de Pesaro, comenzaron a emplear este tipo de terapéutica en pacientes diagnosticados de talasemia en 1981. En los últimos 20 años se han trasplantado en su unidad 1.003 pacientes. En todos ellos la fuente de progenitores fue la médula ósea de donantes familiares compatibles. Por este motivo, los avances relacionados con este tratamiento en pacientes con talasemia han sido en su mayor parte descritos por estos investigadores. El protocolo inicialmente empleado para el acondicionamiento consistía en ciclofosfamida 200 mg/kg dosis total y busulfán 14-16 mg/kg dosis total. Este protocolo se sigue empleando sin modificaciones en la mayor parte de los pacientes en la actualidad. La experiencia con este tipo de acondicionamiento permitió en el año 1990 dividir los pacientes talasémicos menores de 17 años en 3 grupos de riesgo, de acuerdo a la afectación hepática que presentaban (tabla 1)¹. Los resultados variaban de acuerdo a estos grupos de riesgo (tabla 2). Los pacientes incluidos en la clase 3 tenían una supervivencia libre de eventos más baja, fundamentalmente, en base a una mayor mortalidad asociada con el procedimiento. Por este motivo, la primera modificación propuesta al protocolo fue la reducción de la dosis de ciclofosfamida a 120-160 mg. Tras esta modifica-

ción la supervivencia global aumentó hasta un 74%, pero la probabilidad de fallo del injerto aumentó hasta un 35%². De este modo, la supervivencia libre de enfermedad apenas se vio modificada (53% frente a 49%)². Los pacientes mayores de 16 años pertenecientes a los grupos de riesgo 2 y 3 también se trataron con dosis reducidas de ciclofosfamida alcanzando sólo un 65% de supervivencia global (62% de supervivencia libre de enfermedad)³. La última actualización de estos datos demostró una mortalidad relacionada con el trasplante del 36% en pacientes adultos, mientras que era de un 18% en los pacientes menores de 16 años⁴. Por tanto, en los pacientes adultos, los fallos de este tratamiento se deben con mayor frecuencia a toxicidad del trasplante. Por otro lado, en todos estos estudios ha quedado demostrado que el mayor problema en los sujetos jóvenes pertenecientes al grupo de riesgo 3, se relaciona con el fallo de injerto^{2,4}. La probabilidad de fallo de injerto se sitúa en este grupo en un 30%⁴.

De todo lo anterior se puede concluir que los resultados son óptimos para los niños y adultos jóvenes pertenecientes a los grupos de riesgo 1 y 2. El objetivo ha sido en los últimos años mejorar los resultados en los pacientes adultos y aquellos pertenecientes al tercer grupo de riesgo.

El protocolo inicial se modificó en año 1997 para los pacientes englobados en el grupo 3 de riesgo. En nuevo protocolo consiste en un régimen de hipertransfusión y quelación previo al trasplante. Además desde el día -45 al -11 se realiza tratamiento con azatioprina 3 mg/kg/día e hidroxiurea 30 mg/kg/día. Con estas medidas se trata de disminuir la expansión de la serie roja inmadura en la médula ósea y disminuir la carga de hierro que el régimen hipertransfusional produce. Desde el día -17 al -13 se realiza tratamiento con fludarabina a dosis de 20 mg/m²/día por sus propiedades mielosupresoras e inmunosupresoras. Finalmente el acondicionamiento propiamente dicho consiste en busulfán 1 mg/kg/dosis 3 dosis al día durante 5 días (-10 a -6, dosis total 14 mg/kg); y ciclofosfamida 40 mg/kg/día (-5 a -2, dosis total 160 mg/kg). La profilaxis de la enfermedad injerto contra huésped se realiza con ciclofosfamida 7,5 mg/kg el día 1; metotrexato 10 mg/m² intravenoso los días 3 y 6; ciclosporina a 5 mg/kg del día -2 hasta el +5 reduciéndose después a 3 mg/kg hasta su administración oral; y prednisona 0,5 mg/kg del -1 al +25. Este nuevo acondicionamiento ha conseguido que la supervivencia global sea del 93% y la libre de enfermedad alcance el 85%⁵. Además, la probabilidad de fallo de injerto se ha reducido hasta un 8%, y la mortalidad tóxica hasta el 6%. Con este protocolo, por tanto, los resultados obtenidos por el trasplante de médula ósea en los pacientes pertenecientes al grupo de riesgo 3 son similares a los obtenidos en los pacientes de grupo 1 y 2 con el protocolo inicial. En los adultos también se emplea un protocolo modificado similar a éste, aun-

que la dosis total de ciclofosfamida se ha reducido hasta 90 mg/kg. Los resultados de este nuevo protocolo para adultos aún no han sido hechos públicos.

Con todo esto parece que los retos del pasado, consistentes en reducir toxicidades y mejorar las tasas de injerto, han sido alcanzados. En este momento, los objetivos futuros se centran en conseguir soluciones para aquellos pacientes que no poseen un donante familiar compatible.

Trasplantes no relacionados

El primer trasplante realizado a partir de un donante no emparentado fue publicado en 1994 por Contu et al⁶. Sin embargo, los resultados de la única serie que engloba un cierto número de pacientes ha sido publicados recientemente. La Nasa et al⁷ presentan en este trabajo los resultados obtenidos tras trasplante de médula ósea usando donantes no relacionados pero con una cuidada selección de los donantes en base a un tipaje HLA (antígeno de histocompatibilidad) amplio. La serie incluye 32 pacientes y es hasta el momento la mayor publicada. Cuatro pacientes pertenecían al grupo de riesgo 1, 11 al 2 y 17 al 3. El acondicionamiento se realizó en los cuatro primeros pacientes con ciclofosfamida 200-160 mg/kg dosis total y busulfán 14 mg/kg dosis total. Debido al fallo de injerto de dos de estos 4 pacientes, se añadió al tratamiento tiotepa 10 mg/kg. En los últimos pacientes mayores de 16 años, incluidos en esta serie, se redujo la ciclofosfamida hasta 120 mg/kg dosis total. La supervivencia estimada por el método de Kaplan-Meier era del 79%, y de supervivencia libre de talasemia del 66%. De los 22 pacientes con un donante óptimo según el criterio empleado por los autores, 19 se encontraban vivos y 17 de ellos no precisaban soporte transfusional. Desde el empleo de tiotepa en el protocolo, sólo 2 pacientes tuvieron un fallo de injerto. Seis pacientes fallecieron como consecuencia del procedimiento, y aunque no alcanzaba significación estadística, es importante señalar que cinco de ellos pertenecían al tercer grupo de riesgo.

En la última reunión del EBMT Addari et al⁸ han presentado también su experiencia en el trasplante de médula ósea con donantes no familiares idénticos. La serie incluía 17 pacientes, 14 de ellos pertenecientes al grupo de riesgo 3. El acondicionamiento se realizó en 10 casos con busulfán-ciclofosfamida, añadiéndose tiotepa en 6 pacientes, y en un caso se empleó un acondicionamiento con fludarabina-busulfán. La profilaxis de la enfermedad injerto contra huésped (EICH) se hizo con ciclosporina y metotrexato en la mayor parte de los casos. Se diagnosticó EICH aguda en el 30% de los casos y crónica en el 27%. En 3 casos se produjo un fallo de injerto (uno primario y dos secundarios). La supervivencia libre de talasemia es del 70%. Los autores de este estudio dan varias consideraciones de interés. La primera es que la selección de donantes debe ser cuidadosa y tras estudios de alta resolución para el tipaje

HLA. La segunda es que los pacientes de los grupos de riesgo 1 y 2, sólo deben ser trasplantados a partir de un donante familiar HLA idéntico. Y la tercera es que los pacientes adultos y del grupo de riesgo 3 presentan complicaciones más graves, y tienen una mortalidad relacionada con el trasplante más alta.

Una nueva serie que incluye 11 pacientes se ha publicado en los últimos meses⁹. A los pacientes se les realizó un trasplante de médula ósea tras acondicionamiento con ciclofosfamida 200 mg/kg dosis total y busulfán 16 mg/kg dosis total. En este caso se añadió globulina antilinfocítica 40 mg/kg dosis total. Ocho pacientes se incluían en el grupo de riesgo 1 y 2 en el grupo 3. Diez donantes eran idénticos a nivel molecular para HLA-A, -B, y -DRB1. Sólo un paciente era distinto a nivel molecular para HLA-DRB1. La profilaxis de la EICH se realizó con metotrexato y ciclosporina. No hubo ningún fallo de injerto y todos los pacientes sobrevivieron al procedimiento. Tres pacientes (27%) fueron diagnosticados de EICH crónica limitada. Los autores sugieren que este tipo de procedimiento debería ser evaluado en pacientes jóvenes y mayoritariamente pertenecientes al grupo de riesgo 1. Su recomendación se basa en que, al igual que en otras patologías, el empleo del trasplante de médula ósea, aún con donantes no relacionados, en pacientes con menor afectación sistémica puede tener mejores resultados que cuando se emplea en estadios avanzados de la enfermedad.

Trasplante a partir de otras fuentes de progenitores

El empleo de células progenitoras obtenidas de sangre periférica para el trasplante hematopoyético está cada vez más extendido tanto en las enfermedades congénitas como en las adquiridas. La mayor frecuencia y gravedad de la EICH crónica, que parece provocar esta fuente de progenitores, ha hecho que su empleo sea más aceptado en aquellas enfermedades en que su empleo ha demostrado una mayor supervivencia tras el procedimiento. En otras patologías en que esta supervivencia no se ha demostrado, y además el efecto injerto contra leucemia no es necesario, se prefiere el empleo de médula ósea. En la última reunión del EBMT se ha presentado una serie de 31 pacientes trasplantados a partir de células progenitoras de sangre periférica (Mamoud HK). El acondicionamiento empleado fue busulfán 20 mg/kg dosis total, ciclofosfamida 120 mg/kg dosis total y globulina antitumoral 110 mg/kg dosis total. La profilaxis de la EICH se basó en ciclosporina y metotrexato. Sólo en un 6% de los casos se produjo fallo de injerto. La incidencia de EICH aguda fue de un 3% y la crónica de un 13%. La supervivencia libre de enfermedad ha sido superior al 90% y todos los pacientes se encuentran vivos.

Los progenitores hematopoyéticos obtenidos de sangre de cordón umbilical también están siendo

cada vez más empleados en diversas patologías. Recientemente, Eurocord ha publicado su experiencia con esta fuente de progenitores para el trasplante de pacientes diagnosticados de talasemia y drepanocitosis¹⁰. Cuarenta y cuatro pacientes fueron trasplantados con progenitores hematopoyéticos obtenidos desde la sangre de cordones umbilicales de donantes familiares idénticos. Treinta y tres pacientes eran talasémicos (20 pertenecientes al grupo de riesgo 1, y 13 al grupo de riesgo 2), y en 11 casos el diagnóstico era de drepanocitosis. La probabilidad de injerto era del 89% y la de supervivencia libre de enfermedad fue para los pacientes talasémicos del 80% y para los diagnosticados de anemia drepanocítica era del 90%. La probabilidad de injerto contra huésped agudo era del 8% y de crónico del 6%. Es importante señalar cómo en esta serie el uso de metotrexato como profilaxis de la EICH se relacionó con una menor supervivencia libre de eventos (55% frente al 90%). Se observó también cómo los pacientes talasémicos pertenecientes al grupo de riesgo 1, y el acondicionamiento distinto de busulfán-ciclofosfamida se relacionó con una supervivencia libre de eventos mayor, aunque estas diferencias no alcanzaron significación estadística. La supervivencia global de la serie fue del 100%.

Acondicionamientos de intensidad reducida

Existe poca información en relación con el uso de acondicionamientos de intensidad reducida en el trasplante hematopoyético para pacientes diagnosticados de hemoglobinopatías. Se ha probado la combinación de fludarabina con dosis bajas de busulfán o irradiación corporal total (200 cGy) aunque ninguna de estas combinaciones ha demostrado posibilitar el injerto en un alto porcentaje de pacientes.

En una reciente serie publicada tras acondicionamiento con fludarabina y 200 cGy de irradiación corporal total, ninguno de los pacientes (siete) consiguió un injerto estable y duradero¹¹. Seis pacientes consiguieron un quimerismo mixto, para más tarde experimentar recuperación autóloga, y un paciente tuvo un fallo primario de injerto. Ghavamzadeh et al¹², también recientemente, han comunicado una incidencia de fallo de injerto del 77% en su serie de 13 pacientes acondicionados con fludarabina 150 mg/m² dosis total, busulfán 8 mg/kg dosis total y globulina antitumoral 40 mg/kg dosis total, en pacientes talasémicos pertenecientes al grupo de riesgo 3.

Bibliografía

1. Lucarelli G, Galimberti M, Polchi P, et al. Bone marrow transplantation in patients with thalasemia. *N Engl J Med* 1990;322:417-21.
2. Lucarelli G, Reginald AC, Galimberti M, et al. Marrow transplantation for patients with thalasemia: results in class 3 patients. *Blood* 1996; 87:2082-8.
3. Lucarelli G, Clift RA, Galimberti M, et al. Bone marrow transplantation in adult thalasemia patients. *Blood* 1999;93:1164-7.
4. Lucarelli G, Andreani M, Angelucci E. The cure of thalassemia by bone marrow transplantation. *Blood Reviews* 2002;16:81-5.

5. Sodani P, Gaziev D, Polchi P, et al. A new approach for bone marrow transplantation in class 3 thalassemic patients aged less than 17 years. DOI 10.1182/blood-2003-08-2800.
6. Contu L, La Nasa G, Arras M, et al. Successful unrelated bone marrow transplantation in thalassemia. *Bone Marrow Transplant* 1994;13:329-31.
7. La Nasa G, Giardini C, Argioli F, et al. Unrelated donor bone marrow transplantation for thalassemia: The effect of extended haplotypes. *Blood* 2002;99:4350-6.
8. Addari MC, Orofino MG, Sanna MA, et al. Unrelated bone marrow transplantation for thalassaemia: A single-centre experience. *Bone Marrow Transplant* 2004;33(Suppl 1):63.
9. Hongeng S, Pakakasama S, Chaisiripoomkere W, et al. Outcome of transplantation with unrelated donor bone marrow in children with severe thalassaemia. *Bone Marrow Transplant* 2004;33:377-9.
10. Locatelli F, Rocha V, Reed W, et al. Related umbilical cord blood transplant in patients with thalassemia and sickle cell disease. *Blood* 2003;101:2137-43.
11. Iannone R, Casella JF, Fuchs EJ, et al. Results of minimally toxic non-myeloablative transplantation in patients with sickle cell anemia and beta-thalassemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003;9:519-28.
12. Ghavamzadeh A, Mousavi A, Iravani M, et al. Non-myeloablative stem cell transplantation in beta thalassaemia major patients. *Bone Marrow Transplant* 2004;33(Suppl 1):107.

NUEVAS DIANAS MOLECULARES TERAPÉUTICAS EN LAS NEOPLASIAS MALIGNAS

COORDINADOR: J.M. HERNÁNDEZ RIVAS. *Falta centro??, Salamanca*

Resumen del simposio

En los últimos años hemos asistido al desarrollo de nuevas moléculas que actúan frente a dianas terapéuticas específicas. Este campo de la investigación ha aportado soluciones a los enfermos diagnosticados de hemopatías malignas y es evidente que continuará progresando. Al tratamiento con ATRA de la leucemia aguda promielocítica se ha añadido el uso del mesilato de imatinib en la terapia de la leucemia mieloide crónica y de los síndromes mieloproliferativos con afectación de genes con actividad tirosinquinasa (PDGFR alfa y beta, entre ellos) y un cada vez mayor número de anticuerpos monoclonales, que han demostrado su utilidad en el tratamiento de los linfomas. Por ello, hemos organizado este simposio en el que hemos pretendido aunar la actividad de la investigación básica y de la aplicada y contemplar el uso de estos fármacos frente a síndromes mielo y linfoproliferativos. El Dr. Faustino Mollinedo es investigador del Centro de Investigación del Cáncer de la Universidad de Salamanca-CSIC y ha desarrollado una importante labor en el estudio del mecanismo de acción de nuevos fármacos antitumorales, con especial énfasis en su actividad reguladora de la apoptosis. Su ponencia se centra en el análisis de las cualidades que debe tener un fármaco para poder ser usado en la práctica clínica como antineoplásico a la vez que analiza con una visión integradora los avances y la complementariedad de las nuevas técnicas genómicas, bioinformáticas y de análisis funcional. La Prof. Melo, trabaja en el Hospital Hammersmith de Londres y ha realizado importantes avances en la investigación del uso del mesilato de imatinib en la leucemia mieloide crónica. Su trabajo versará sobre la definición de nuevas dianas terapéuticas en el tratamiento de las hemopatías mieloides. El Dr. Caligiuri pertenece a la División de Hematología del Hospital de Ohio y presentará los datos relativos uso de nuevas moléculas para el tratamiento de los síndromes linfoproliferativos asociados con infección por virus de Epstein-Barr, cada vez más frecuentes en enfermos inmunodeprimidos. En su trabajo el uso de la inmunoterapia como complemento de la retirada de la inmunosupresión ofrece posibilidades esperanzadoras en el tratamiento de los linfomas postrasplante. Finalmente el Dr. Cortés, del MD Anderson de Houston explicará cuáles pueden ser las soluciones en los casos de resistencia al mesilato de imatinib. Con estas cuatro aportaciones de especialistas de primer nivel en el campo de los tratamientos diseñados frente a dianas específicas se afianzará nuestro conocimiento de esta auténtica revolución en la terapia neoplásica.

INTEGRATION OF BIOLOGICAL CONCEPTS, GENOMICS AND HIGH-THROUGHPUT TECHNOLOGIES IN CANCER DRUG DISCOVERY

F. MOLLINEDO

Centro de Investigación del Cáncer. Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Universidad de Salamanca. Campus Miguel de Unamuno. Salamanca.

Abstract

Advances in high-throughput molecular technologies, including genomics, proteomics and microarrayed compound screenings, have led to a dramatic change in the way of how drugs are discovered. These technology breakthroughs together with our growing understanding of the molecular aspects of cancer development and treatment are leading to the advent of novel therapeutic strategies and to the generation of new drugs to fight against cancer. In addition new frameworks are being set up in the pursuit of more specific and selective anticancer drugs. Likewise, the use of genomic-scale approaches is leading to a more complete knowledge and definition of cancer at the molecular level, and this will entail to classify and characterize new distinct cancer subtypes as well as to target them more specifically. Furthermore, our current understanding of apoptosis as well as its implication in cancer development and treatment should facilitate the design of new therapies. These apoptotic-targeted approaches, hopefully, may improve the clinical outcome of cancer therapy, especially for those tumours with a low growth capacity.

Conceptual basis and molecular targets for cancer therapies

There are several strategies for identifying new chemical entities, either synthesized chemicals or natural compounds extracted or derived from plant, microbial, or marine sources. The history of cancer drug discovery reflects an evolution from highly empiric approaches, based on testing of randomly selected compounds against rapidly proliferating murine leukaemia, to the current, more focused testing of natural products, rationally synthesized agents, and biologic products against well-characterized tumour cell lines or molecular targets. In addition, the advent of novel high-throughput molecular and biologic technologies, including genomics and proteomics, together with microarrayed compound screening (μ ARCSTM) technologies, have led to a dramatic change in the way of how drugs are discovered and to speed up the pace in finding a particular drug for a specific target.

Throughout history drug discovery has been largely influenced by the prevailing ideas and paradigms of each period of time (table 1). Thus the predominant paradigms of the 1950s to 1970s considered that: a) tumours were composed of rapidly dividing cells; b) tumour cells lost the normal growth control that regulate progression through cell cycle, leading to the notion that cancer cells are continuously cycling and dividing, and c) cancer cells became somehow immunologically "foreign" or dedifferentiated so as to present cancer-specific antigens that could be exploitable via immunological mechanisms. Later, in the 1980s to 1990s the knowledge of the molecular changes in oncogenes, tumour suppressor genes, and the diverse set of genes that control senescence, angiogenesis, and apoptosis during tumour formation led to define new targets for cancer drug discovery. In this regard, gain-of-function mutations in oncogenes (Ras, Abl, Myc, epidermal growth factor receptor -EGFR-) led to the development of small-molecule inhibitors of the corresponding signalling events (e.g., farnesyltransferase inhibitors to block Ras activation). On the other hand, loss-of-function mutations or deletions in tumour suppressor genes (Rb, p53) led to gene therapy approaches trying to restore the mutated key cellular sensor. In addition, a number of evidences showed that tumour cells exhibit telomerase activity, adding new telomeric DNA to the ends of chromosomes replacing the sequences lost during repeated rounds of cell division, and thereby the development of telomerase inhibitors could eventually block tumour proliferation. In the late 1990s an indirect and ingenious way to target cancer relied on the fact that tumour cells induce neovascularization of tumours (angiogenesis), as they require new blood supplies to maintain viability. The synthesis of a number of key molecules, including vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor (FGF) and integrins, resulted essential for this process, and therefore a series of angiogenesis inhibitors (TNP-470, suramin) started to be developed. Furthermore, it also became clear that tumour cells possess defects in their DNA repair process, resulting in increased frequency of random mutations. This leads to the hypermutability or plasticity of some cancer phenotypes that ultimately contributes to the acquired drug resistance phenotype. This genetic instability is a major problem in the successful treatment of cancer.

Genomic-scale approaches and pharmacogenomics

With the beginning of the twenty first century a burst in high-throughput technologies have allowed us to improve and speed up our way to identify novel targets and to generate new target-specific drugs. The advent of DNA microarray technology as well as other high-throughput techniques have revolutionized both the way to face drug discovery as well

Table 1. Conceptual Basis and Molecular Targets for Cancer Therapeutics

<i>Biologic concept</i>	<i>Molecular targets</i>	<i>Therapeutics</i>
Rapidly dividing cells, loss of cell growth control	Nucleic acids, proliferative machinery, DNA synthesis, microtubules, mitotic spindle apparatus	Alkylating agents (cyclophosphamide, busulfan); Topoisomerase inhibitors (etoposide, doxorubicin); Antibiotics (mitomycin C, actinomycin D) Antimetabolites (cytosine arabinoside, mercaptopurine, methotrexate, fludarabine, fluorouracil); Microtubule-interfering agents (vincristine, vinblastine, vinorelbine, paclitaxel, docetaxel)
Immunologically "foreign" or dedifferentiated cells	Tumor selective antigens Nuclear receptors	Cytotoxic immune cells (LAK, TIL cells); Monoclonal antibodies; Cytokines (IL-2, IFN); Nuclear receptor ligands (vitamin D3, retinoids)
Activated oncogenes and critical protein kinases	Ras GTP binding proteins ErbB-2 kinase Abl kinase Src kinase EGFR PDGFR c-Kit VEGFR Raf kinase Cyclin-dependent kinases	Farnesyl transferase inhibitors; Tyrosine kinase inhibitors (Gleevec™ -STI571-, Iressa™ -ZD1839-, leflunomide -SU101-, Tyrphostins, Lavendustins, Anilinoquinazolines); Serine/threonine kinase inhibitors (olomoucine, staurosporine, butyrolactone)
Loss of tumor suppressor genes	Retinoblastoma protein, p53, AT, MCC, APC, von Hippel-Lindau protein	Gene therapy to restore normal suppressor gene function
Abnormal DNA repair mechanisms	DNA mismatch repair enzymes-MSH2, MLH1, PMS1, PMS2	Gene therapy to restore normal enzyme activity; Checkpoint inhibitors to promote susceptibility to DNA damaging agents
Senescence	Telomerase	Telomerase enzyme inhibitors
Angiogenesis	FGF, VEGF Integrin receptors	Endostatin, TNP-470; Suramin; $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ antagonists
Epigenetic inactivation of genes	DNA methylation, histone deacetylases	DNA methyltransferase (DNMT) inhibitors (5-azacytidine and 2'-deoxy-5-azacytidine -Decitabine-); Histone deacetylase (HDAC) inhibitors (suberoylanilide hydroxamic acid -SAHA-)

as to classify disease, which will translate, very likely, into a new way to treat patients. All marketed drugs so far target about 500 gene products^{1,2}. Thus, it is expected that a great number of the 30,000-40,000 protein-coding genes in the human genome, will offer immense new opportunities for the identification of new potential targets.

The development of cancer is accompanied by genetic alterations of multiple genes, especially oncogenes and tumour suppressor genes. Before the genomic onset, the standard techniques of molecular biology have been used to identify a limited number of genes in the cancer development process. Howev-

er, these methods are highly focused, targeting one or few genes at a time, and do not provide broad insight into global changes in gene expression patterns. With the advent of DNA microarrays, it is possible to survey the level of expression of thousands of genes at a time, leading to unforeseen data involving unexpected genes in the drug discovery process. Thus, DNA microarray is a promising tool for monitoring complex gene expression patterns required to be analysed in complex diseases, like cancer, that involve the participation of a rather wide number of genes.

The combination of genomics, bioinformatics and biological testing have led to a new field, pharma-

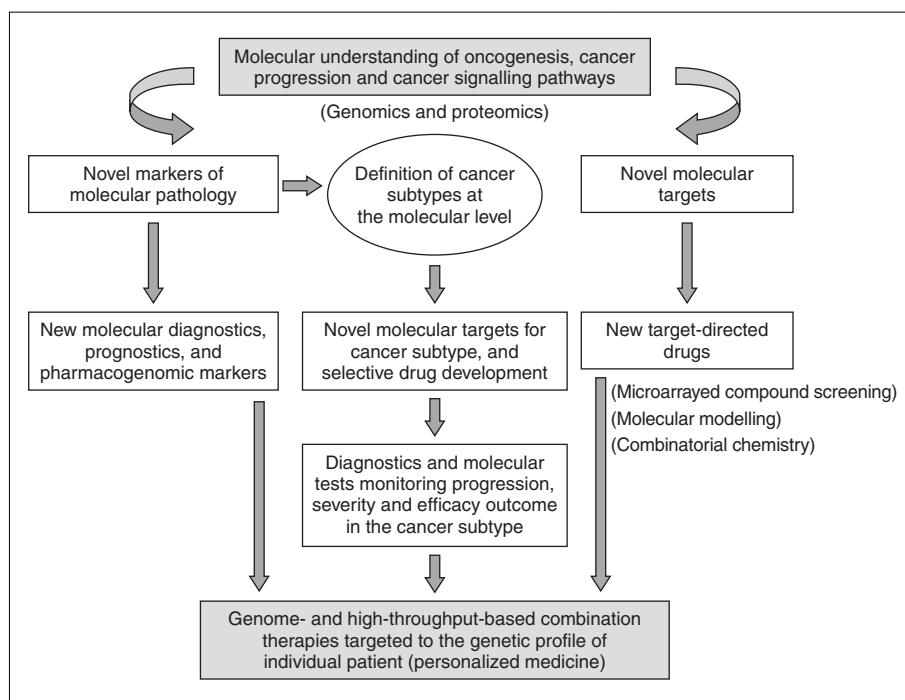


Figure 1. Genomic-scale and high-throughput technologies in drug discovery and molecular cancer definition.

cogenomics, that holds the promise of improving dramatically the efficacy and reducing the risk of drug treatment by identifying markers that predict an individual's response to a drug. A major goal of pharmacogenomics is to elucidate the association between genetic variation of an individual and drug response, thereby identifying genetic markers that predict response to drugs in the clinic³. This involves the identification of the level of expression of genes responsible for drug absorption and metabolism as well as target genes for a particular drug in each individual together with the expression level of those genes involved in the signalling pathways mediating the drug effect. Pharmacogenomic markers also include both indicators of DNA differences between individuals (e. g., SNPs) as well as quantitative differences between gene expression levels of normal and tumour tissues. Altogether, implementation of these techniques will lead to what is called "personalized medicine", in which the association of drug response with molecular markers will open new opportunities for drug discovery in non-responding patients and, more important, distinguish the sort of most convenient drug for each individual because of a higher confidence in expected efficacy and safety (fig. 1).

In addition, the use of genomics in pharmaceutical research will help to elucidate the mechanism of action of anticancer drugs⁴, to provide novel high-quality targets as well as to reduce the percentages of pre-clinical and clinical failures⁵. Nevertheless, most of these failures are due to the fact that the current *in vitro* and *in vivo* models used to evaluate antitumor activity are faulty and lack predictability⁵, and hence

the generation of novel more reliable models for anti-tumor activity is much needed.

Our increased understanding of the genomics and molecular pathology of cancer provides us with an intellectual framework for devising innovative and ingenious strategies to strive it (fig. 1). Thus, identification of new targets driving the molecular pathology and progression of human cancer will provide a framework for discovering new target-directed drugs with a putative improved efficacy and selectivity. This is much needed due to the lack of selectivity of the current antitumor agents, which is another major problem in cancer chemotherapy, and leads to compounds with a rather poor therapeutic index, defined as the ratio of maximum tolerated dose/minimum effective dose. Medically useful drugs should ideally have a high therapeutic index. The combination and implementation of new technologies such as genomics, proteomics, high-throughput screening (HTS), combinatorial chemistry, structural biology and computational modelling, are largely contributing to accelerate the pace and efficiency of drug discovery (fig. 1).

New targets must be validated in order to assure its importance in cancer development and/or treatment. Target validation includes several factors, although not all of them must be met to get on a drug discovery program: *a*) assessment of the frequency of genetic or epigenetic deregulation of the target or signalling pathway in human cancer; *b*) demonstration in model systems, both *in vitro* and *in vivo*, that the target contributes to the malignant phenotype; *c*) evidence for the reversal of the malignant pheno-

type blocking or silencing the target gene; and *d*) feasibility of designing a drug for the specific target. Both over-expression and gene-deletion technologies are useful in assessing target validation. However, because most small-molecule drugs achieve antagonism rather than agonism of an effector, gene deletion technology is favoured. Thus, mammalian gene-silencing and knockout technologies including antisense oligonucleotides, small interference RNAs (siRNA) and knock-out in mice are widely used. Finally, as mentioned above, the target must be feasible for drug development. In this regard enzymes are generally more tractable than are most protein-protein interactions.

In addition, the analysis of thousands of genes at a time during oncogenesis, drug resistance and drug treatment is leading to the development of diagnostic, prognostic and pharmacogenomic biomarkers to enable the targeting of individualized treatments to those patients most likely to benefit. This is leading to a new concept in cancer therapy, redefining and reclassifying cancer in a number of increasing cancer subtypes.

Targeted treatment in specific disease subtypes

Most drugs work, at best, for 60% of the patients for whom they are prescribed, and drugs that work well for some patients make others ill. This is largely due to individual variations in metabolism and/or to a deficient definition of different disease subtypes. Use of genomic and proteomic techniques will allow to characterize different disease pathologies and molecular mechanisms in particular malady subtypes, leading to redefine diseases with greater accuracy at the molecular level and classify diseases, select patients for specific treatments, and develop tests for diagnosis and prognosis. In fact, the term cancer includes more than 200 distinct entities.

Molecular approaches (DNA microarrays and proteomics) are being widely used to define and classify disease subtypes more accurately, such as cancer^{6,7}, separating in this way diseases that are currently clustered together as if they were the same disease, and treat them as clinically defined subtypes within a disease family. Thus, genomics and proteomics are expected to lead to: *a*) development of tests to identify people with specific metabolic variations and disease subtypes; *b*) identification of suitable targets, and subsequent validation; and *c*) development of diagnostics and monitoring tests based on the molecular markers of the disease subtypes to evaluate progression, severity and efficacy outcome. In addition, redefining cancer subtypes with great accuracy at the molecular level will make it considerably easier to validate a target. For instance, overexpression of the HER2/neu (*erbB2*) gene occurs in various cancers, including 20% of breast cancers, has led to define a cancer subtype and to develop a drug specifically

designed for these patients, Herceptin™ (Genentech). A number of spin-offs have subsequently come out, such as a test to identify patients who over-express the HER2/neu protein.

It is now expected that more than three decades of research on molecular aspects of cancer development and treatment may finally pay off in a new generation of more specific, less toxic, cancer drugs.

Gleevec as a drug discovery paradigm for a specific type of cancer

Gleevec™ (also named Glivec, imatinib mesylate, and STI571, formerly CGP57148), manufactured by Novartis (Basel, Switzerland), exemplifies the successful development of a rationally designed, molecularly targeted therapy for the treatment of a specific cancer, the chronic myelogenous leukaemia (CML). This disease is a clonal hematopoietic stem cell disorder associated, in more than 95% of cases, with the t(9;22) chromosomal translocation that involves the long arms of both chromosomes, thereby generating the known Philadelphia (Ph) chromosome, a hallmark of this disease, joining the *bcr* gene in chromosome 22 to the *abl* gene from chromosome 9. The molecular consequence of this event is the generation of a chimeric *bcr-abl* gene that codes for a 210-kDa protein, which is seen in 95% of patients with CML. *Abl* is a tyrosine kinase involved in cell signalling and once the chimeric protein, consisting of the N-terminal fragment of *Bcr* fused to the C-terminal of *Abl*, is formed the tyrosine kinase activity is constitutively hyperactive, so that it stimulates proliferation of the Ph leukaemia cells and inhibits these cells from dying by apoptosis, leading to excessive numbers of white cells that are released into the bloodstream, producing leukaemia. Transduction of p210 *Bcr-Abl* into murine hematopoietic stem cells, causes a CML-like syndrome^{8,9}. Therefore, the chimeric *Bcr-Abl* protein became an obvious target for therapeutic attack. Thus, after being well known that the tyrosine kinase activity of the *Bcr-Abl* quimeric protein was the cause of CML, Brian J. Druker and Ciba Geigy (now Novartis) in 1990 conducted a series of assays searching for a compound able to inhibit specifically this activity. Of the several compounds generated Gleevec emerged as the lead compound for clinical development based on its high *in vitro* selectivity against CML cells. In the summer of 1998 a phase I study was initiated and 54 patients that had failed therapy with interferon α were treated with Gleevec. The results were surprising, 53 out of 54 patients achieved a complete haematological response^{10,11}. The excellent results obtained with this drug in CML treatment has turned this drug as a new paradigm in drug discovery.

On the other hand, Gleevec is also known to inhibit two additional tyrosine kinases, namely the platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) and stem-cell factor receptor (c-Kit), which are be-

lieved to play important roles in maintaining bone marrow stroma-progenitor cell interactions, and thereby the inhibition of these kinases could also account for some of the compelling clinical activity of Gleevec in CML. Interestingly, c-Kit-activating mutations are associated with gastrointestinal stromal tumour (GIST), a highly chemotherapy refractory malignancy. In this regard, promising and interesting data are being obtained in ongoing clinical trials of GIST patients with Gleevec¹². In addition, glioblastoma the most common brain tumour and a highly chemotherapy- and radiation-resistant tumour, is associated with an autocrine growth loop involving PDGF and its receptor, and thereby Gleevec could have a potential as a therapy for this currently incurable disease¹³.

One-target drug affecting multiple cancer gene targets

Unfortunately, in solid tumours, the disease is more complex than CML due to the underlying involvement of several deregulated pathways. Thus, a potential peril in dealing with diseases caused by multiple genetic abnormalities, as cancer, is that the more finely tuned our molecular therapies become, the less they will be able to confront the inherent genetic instability of cancer cells. Because of the genetic plasticity of cancer cells, they are very efficient at adapting to a noxious environment leading to therapy resistance and relapsing. An approach might be to target the machinery that allows cancer cells to adapt so successfully to environmental stress. Cells respond to stress by increasing synthesis of molecular chaperones (Heat shock proteins, Hsps), required for the stability and function of multiple signalling molecules that promote growth and survival of cancer cells. One of the most abundant Hsps is Hsp90. By the early 1990s, several observations showed that Hsps in general, and Hsp90 in particular, were over-expressed in a wide variety of cancer cells and in virally transformed cells¹⁴. Hsp90 client proteins include mutated p53, Bcr-Abl, Akt, ErbB2, and is constitutively expressed at 2-10-fold higher levels in tumour cells compared with their normal counterparts¹⁵. Thus, targeting Hsp90 is expected to affect a number of gene products important for cancer cell survival. Geldanamycin and the benzoquinone ansamycin 17-allylaminogeldanamycin (17AAG) are potent Hsp90 inhibitors with potential antitumor activity¹⁶.

A hallmark of cancer cells is the epigenetic inactivation of genes that are crucial for the control of normal cell growth (Rb, p16, APC, caspase-8, DNA repair genes, etc). Epigenetic transcriptional repression of genes include DNA methylation and histone deacetylation and methylation. In unmethylated nucleosomal DNA, histone acetylation leads to active transcription of genes by RNA polymerase II, however methylation of CpG islands in DNA near to gene promoters is associated with chromatin changes such as

deacetylation and methylation of core histones, leading to exclusion of transcription factors and subsequently to gene silencing. Histone deacetylases (HDAC) inhibitors (butyrates, trapoxin A, apicidin, benzamides, and hydroxamic acids, such as trichostatin, oxamflatin and suberoylanilide hydroxamic acid -SAHA-) and DNA methyltransferase (DNMT) inhibitors (5-azacytidine, 2'-deoxy-5-azacytidine, also known as Decitabine) restore expression of genes silenced by methylation in cancer cells, promoting growth arrest, cell differentiation and apoptosis¹⁷.

Another target that controls ultimately the expression of plenty of survival regulators is the proteasome. The 26S proteasome degrades proteins that have been marked by the addition of multiple ubiquitin molecules, a process called ubiquitination, to short (3-22 residue) polypeptides. Thus, targeting proteasome could have a potential for the treatment of cancer due to the decrease in the level of survival gene products. The first compounds identified as proteasome inhibitors included the natural inhibitor lactacystin and synthetic peptide aldehydes related to calpain inhibitor I. Further modifications in the structure of these latter compounds, and the differential effect that proteasome inhibition exerts on malignant cells, have led to the development of the dipeptidyl boronic proteasome inhibitors, including PS-341¹⁸. PS-341 (bortezomib, Velcade) proteasome inhibitor shows promising anticancer activity in both haematological, especially multiple myeloma, and solid tumour malignancies.

Apoptosis as a major cancer therapeutic target

The only modest progress in cancer chemotherapy over the past sixty years suggests that some of the frameworks used for targeting the cancer cell are wrong. Perception of the malignant cell as having only an uncontrolled proliferation is one of such frameworks. The rather modest impact of antiproliferative drugs in clinic is not surprising since many tumours have a low growth capacity. In contrast, increasing evidence is leading to the conception of a tumour cell as a cell mainly defective in triggering its own death by apoptosis. In addition, it is becoming clear that malignant tumours are comprised of both cancer stem cell, with a high proliferative potential, and more differentiated cancer cells, with limited proliferative potential¹⁹. A number of cancer stem cells have been identified that have the potential to self-renew, to transfer disease and to form tumours following transplantation¹⁹. Stem cancer cells can be envisioned to be rather resistant to apoptosis. Thus, this could explain the frequent failure of chemotherapy in curing cancers. More differentiated cancer cells could be killed by chemotherapy leading to tumour shrinkage, but if cancer stem cells survive, these latter will continue the process of tumour growth and progression. Thus, new approaches should be developed in order

to efficiently promote killing of stem cancer cells or differentiation into a more drug-sensitive cell or a benign tumour, exhausting the pool of cancer stem cells.

Anticancer agents with diverse primary targets, including microtubule-active agents, topoisomerase II inhibitors, DNA-alkylating agents, antibiotics and folate antagonists, trigger signalling pathways leading ultimately to apoptosis in a rather indirect way²⁰⁻²² (fig. 2). Conversely, because drugs with different targets induce apoptosis through similar ultimate apoptotic mechanisms, mutations in apoptotic programs lead to multidrug resistance and treatment failure. Thus, the effectiveness of anticancer drugs reflects the cell's ability to detect and respond to the perturbation induced by the drug²¹. The majority of anticancer drugs target DNA synthesis, whereas others affect cellular metabolism and cell division. In this regard, induction of apoptosis by these drugs is rather indirect because effects on cell cycle or cell metabolism must be sensed by the cells as signals that, after reaching a certain threshold, trigger an apoptotic response²¹. Thus, cells sense this drug-induced damage or cellular perturbation through the presence of "sensors", calibrate these lesions and mount a response to these aggressions, reacting according to their phenotype²³. When this drug-induced metabolic, biochemical or DNA damage is excessive or difficult to be repaired, the cell decides to self-destruct by apoptosis avoiding in this way to threaten adjoining cells and tissues. The failure of some tumour cells to die following a chemotherapeutic treatment may be due to either their inability to sense the drug-promoted harm or their resistance to engage apoptosis. This implies the existence of an "apoptosis threshold", in response to damage that is set differently in distinct cell types²¹. Mutations in sensors involved in triggering an apoptotic response hamper the onset of apoptosis, and it is well-known that cancer cells try to get rid of sensors that can lead to cell death enhancing their "apoptosis threshold"²¹. In this regard, the tumour suppressor gene p53, involved in cell-cycle control, apoptosis, and in the maintenance of genetic stability, is mutated in about half of all human cancers. In order to avoid putative mutations in the sensors linking cell damage to a cell death response that could hinder or frustrate the use of anti-cancer therapies, a direct activation of the apoptotic machinery should be more appropriate to kill rapidly and efficiently the tumour cell²¹. The idea of developing drugs able to target and induce apoptosis in tumour cells constitutes an attractive and promising approach in cancer treatment. Direct activation of the cell death machinery could circumvent the action of cellular sensors and checkpoints, which are frequently mutated or altered in cancer, and therefore their mutant state should be largely irrelevant to this therapeutic approach (fig. 2).

Three major components of the cell death machinery include: death receptors, regulators (Bcl-2 family

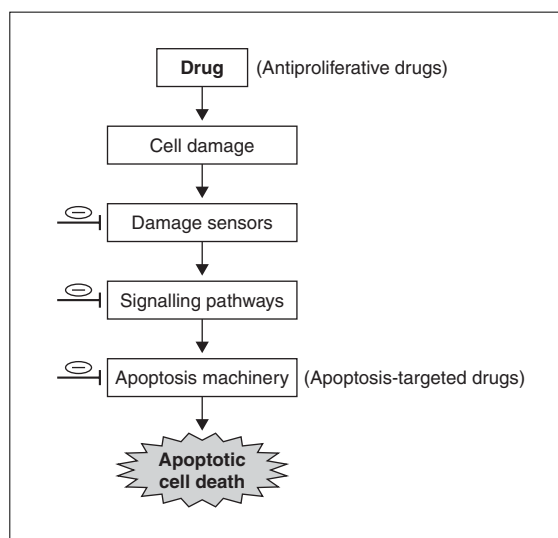


Figure 2. Induction of apoptosis in current cancer chemotherapy involves a multi-step pathway. Antiproliferative drugs induce a cell damage into the cancer cell that is sensed through damage sensors. These latter activate a number of signalling routes, some of those eventually trigger apoptosis. Mutation or deletion of damage sensors in tumours precludes or hampers the triggering of downstream signalling events. A direct activation of the apoptotic signalling could hypothetically circumvent these obstacles and lead to rapid demise of cancer cells.

members), and executors (caspases). Likewise two major signalling pathways play critical roles in the triggering of apoptosis, namely the extrinsic pathway (death receptor-mediated route) and the intrinsic pathway (mitochondria-mediated route), leading to the formation of two major apoptotic complexes: DISC (death-inducing signalling complex), made up of Fas, Fas-associated death domain protein (FADD) and procaspase-8²⁴, and apoptosome, made up of cytochrome c, Apaf-1 and procaspase-9²⁵. A number of new drugs and biological substances are being developed to promote killing of cancer cells in a rather direct way, namely by promoting oligomerization of Apaf-1 into the apoptosome through indolone compounds²⁶ or by antagonizing the antiapoptotic function of Bcl-2 or Bcl-xL with the low molecular weight organic compound HA14-1, discovered using a computer screening strategy, or the natural products Tetrocarcin A and Antimycin A²⁷. In addition, our recent demonstration of the translocation and capping of the death receptor Fas (also known as APO-1 or CD95) into membrane rafts in Fas-mediated apoptosis²⁸, subsequently confirmed by other investigators^{29,30}, has led to another new efficient way to trigger apoptosis in tumour cells^{31,32}. Thus, cytotoxic drugs can be used in chemotherapy via enhancement of raft-dependent killing of tumour cells³¹. Such as a notion has found experimental support in our recent studies in which the antitumour ether lipid ET-18-OCH₃ induces apoptosis in tumour cells via

cocapping of Fas-containing raft membrane microdomains^{28,32}. This cocapping presumably amplifies raft-dependent Fas signalling, likely through structural reorganization of raft membrane microdomains. Our data also indicate that rafts represent a potential target for therapeutic intervention in cancer.

Outlook

Advances in elucidating the molecular mechanisms involved in cancer development and treatment, greatly facilitated by the outbreak of novel high-throughput technologies, will lead to an outburst in the choices of drug discovery targets in the future. With the aid of genomics and proteomics, it is expected that cancer will be more precisely subdivided into different disease subtypes with remarkable and specific molecular features. Some of these molecular peculiarities or hallmarks might become major therapeutic targets that, in turn, could result in the development of new more specific and selective drugs for each cancer subtype. Redefining cancer subtypes with greater accuracy at the molecular level makes it considerably easier to validate a target, and putatively increases the efficacy outcome of a target-directed therapy. In addition, direct activation of the apoptotic machinery in cancer cells opens a new framework in drug discovery, averting the deleterious effect of a great number of mutated sensors, inherent to the genetic instability of cancer cells, that frequently hampers the use of DNA-targeted and antiproliferative drugs.

References

- Drews J. Genomic sciences and the medicine of tomorrow. *Nat Biotechnol* 1996;14:1516-8.
- Drews J. Drug discovery: A historical perspective. *Science* 2000;287:1960-4.
- Scherf U, Ross DT, Waltham M, Smith LH, Lee JK, Tanabe L, et al. A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat Genet* 2000;24:236-44.
- Gajate C, An F, Mollinedo F. Differential Cytostatic and Apoptotic Effects of Ecteinascidin-743 in Cancer Cells. Transcription-dependent cell cycle arrest and transcription-independent JNK and mitochondrial mediated apoptosis. *J Biol Chem* 2002;277:41580-9.
- Gura T. Systems for identifying new drugs are often faulty. *Science* 1997;278:1041-2.
- Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, et al. Molecular classification of cancer: Class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999;286:531-7.
- Ross DT, Scherf U, Eisen MB, Perou CM, Rees C, Spellman P, et al. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet* 2000;24:227-35.
- Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 1990;247:824-30.
- Kelliher MA, McLaughlin J, Witte ON, Rosenberg N. Induction of a chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with v-abl and BCR/ABL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:6649-53.
- Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001;344:1031-7.
- Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM, 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.
- Joensuu H, Roberts PJ, Sarlomo-Rikala M, Andersson LC, Tervahartiala P, Tuveson D, et al. Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *N Engl J Med* 2001;344:1052-6.
- Kilic T, Alberta JA, Zdunek PR, Acar M, Iannarelli P, O'Reilly T, et al. Intracranial inhibition of platelet-derived growth factor-mediated glioblastoma cell growth by an orally active kinase inhibitor of the 2-phenylaminopyrimidine class. *Cancer Res* 2000;60:5143-50.
- Yufu Y, Nishimura J, Nawata H. High constitutive expression of heat shock protein 90 alpha in human acute leukemia cells. *Leuk Res* 1992;16:597-605.
- Ferrarini M, Heltai S, Zocchi MR, Rugarli C. Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumor cells. *Int J Cancer* 1992;51:613-9.
- Neckers L. Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents. *Trends Mol Med* 2002;8:S55-61.
- Brown R, Strathdee G. Epigenomics and epigenetic therapy of cancer. *Trends Mol Med* 2002;8:S43-48.
- Adams J. Proteasome inhibition: a novel approach to cancer therapy. *Trends Mol Med* 2002;8:S49-54.
- Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:895-902.
- Gajate C, Barasoain I, Andreu JM, Mollinedo F. Induction of apoptosis in leukemic cells by the reversible microtubule-disrupting agent 2-methoxy-5-(2',3',4'-trimethoxyphenyl)-2,4,6-cycloheptatrien-1-one: protection by Bcl-2 and Bcl-X(L) and cell cycle arrest. *Cancer Res* 2000;60:2651-9.
- Gajate C, Mollinedo F. Biological Activities, Mechanisms of Action and Biomedical Prospect of the Antitumor Ether Phospholipid ET-18-OCH(3) (Edelfosine), A Proapoptotic Agent in Tumor Cells. *Curr Drug Metab* 2002;3:491-525.
- Mollinedo F, Gajate C. Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis. *Apoptosis* 2003;8:413-50.
- Chresta CM, Arriola EL, Hickman JA. Apoptosis and cancer chemotherapy. *Behring Inst Mitt* 1996:232-40.
- Peter ME, Krammer PH. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol* 1998;10:545-51.
- Adams JM, Cory S. Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14:715-20.
- Nguyen JT, Wells JA. Direct activation of the apoptosis machinery as a mechanism to target cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:7533-8.
- Huang Z. Bcl-2 family proteins as targets for anticancer drug design. *Oncogene* 2000;19:6627-31.
- Gajate C, Mollinedo F. The antitumor ether lipid ET-18-OCH(3) induces apoptosis through translocation and capping of Fas/CD95 into membrane rafts in human leukemic cells. *Blood* 2001;98:3860-3.
- Hueber AO, Bernard AM, Herincs Z, Couzinet A, He HT. An essential role for membrane rafts in the initiation of Fas/CD95-triggered cell death in mouse thymocytes. *EMBO Rep* 2002;3:190-6.
- Scheel-Toellner D, Wang K, Singh R, Majeed S, Raza K, Cumow SJ, et al. The death-inducing signalling complex is recruited to lipid rafts in Fas-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;297:876-9.
- Mollinedo F, Gajate C. FasL-independent activation of Fas. In "Fas Signaling". Edited by Wajant H. Georgetown, TX, Landes Bioscience 2004; pp Chapter 3: p. 1-15.
- Gajate C, del Canto-Jañez E, Acuña AU, Amat-Guerri F, Geijo E, Santos-Beneit AM, et al. Intracellular triggering of Fas aggregation and recruitment of apoptotic molecules into Fas-enriched rafts in selective tumor cell apoptosis. *J Exp Med* 2004;200:353-65.

NEW TARGETS FOR TREATMENT OF EPSTEIN-BARR VIRUS-ASSOCIATED LYMPHOPROLIFERATIVE DISORDERS

P. PORCU^{3,4,5}, R.A. BAIOCCHI^{3,4,5}, S. ROYCHOWDHURY², C.F. EISENBEIS^{3,4,5} AND M.A. CALIGIURI^{1,3,4,5}

Department of Molecular Virology, Immunology, and ¹Medical Genetics, ²Medical Scientist Program, ³Department of Internal Medicine, ⁴Division of Hematology/Oncology, ⁵The Comprehensive Cancer Center, The Ohio State University, Columbus, Ohio.

Introduction

The Epstein-Barr virus (EBV) is a ubiquitous lymphotropic human gamma-herpes virus that infects resting human B cells and epithelial cells. EBV gains

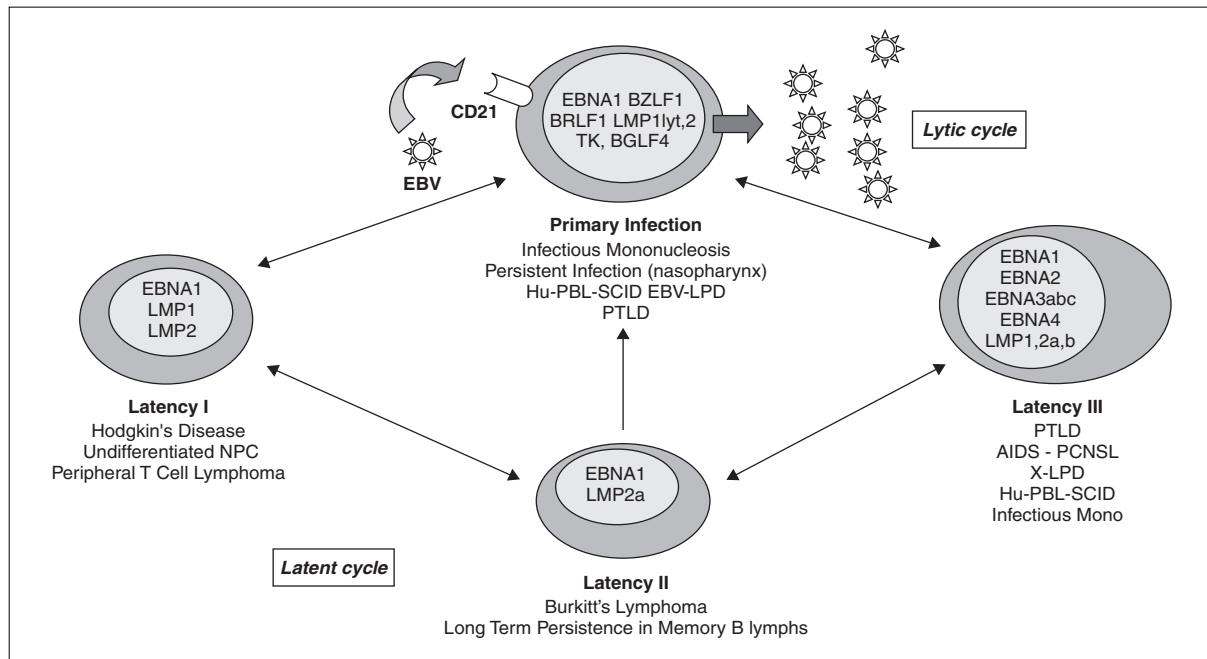


Figure 1. Latent and lytic cycle of EBV. Each form of latency is associated with a specific type of EBV⁺ malignancy. Each form of latency is capable of spontaneous or induced viral reactivation and induction of the lytic gene program.

access to the human host via primary infection of the epithelial cells of the nasopharynx. Here, activation of an EBV lytic gene program results in local virion production and infiltration of submucosal lymphoid tissue where naïve/resting B lymphocytes are infected. It is primarily within this resting B-cell compartment that EBV establishes a persistent, subclinical infection. This is achieved via a highly coordinated EBV latent gene expression program which down regulates the expression of immunogenic EBV peptides in response to an efficient T-cell mediated immune response to the virus. EBV is associated with a variety of neoplastic diseases including lymphoproliferative disorders (LPD) that arise in patients with congenital (X-linked-LPD), acquired (AIDS-lymphoma), or iatrogenic (post transplant lymphoproliferative disorder, PTLD) immune deficiency, Burkitt's lymphoma (BL), Hodgkin's disease (HD), a subset of T/NK-cell lymphomas (T/NK-cell lymphoma nasal-type), and lymphoepithelioid carcinomas of the gastric¹ and nasopharyngeal mucosa².

Each EBV-associated malignancy is characterized by a specific pattern of EBV gene expression. Three major latent gene programs have been described (fig. 1). EBV⁺ resting B cells and Burkitt Lymphoma (BL) cells display a *Latency I* gene expression profile restricted to the expression of the EBV nuclear antigen 1 (EBNA1) and Latent Membrane Protein-2 (LMP-2). Hodgkin's disease (HD), T/NK-cell lymphomas and Nasopharyngeal Carcinomas (NPC) express a *Latency II* gene expression profile restricted to expression of EBNA1, LMP-2 and

LMP-1. Finally, LPD associated with immune deficiency and EBV-transformed human B-cells capable of proliferating indefinitely in-vitro (Lymphoblastoid Cell Lines, LCL), display a less restricted *Latency III* profile and express EBNA1, EBNA-2, EBNA 3a, 3b, 3c, EBNA-4, LP, LMP-1 LMP2a and LMP2b³. The specific role of EBV in inducing and/or maintaining the neoplastic phenotype of the infected cells in each of these malignancies is not completely understood, although it is known that several of the latent EBV gene products (LMP-1, EBNA-2) are required for B-cell transformation in vitro. LMP-1 leads to constitutive activation of NFκB and upregulation of cellular Bcl-2 in EBV-infected B-cells and thus represents an attractive target for therapeutic intervention. Conversely, lytic EBV gene products have generally been considered to have very limited or no role in B-cell transformation and their expression in clinical specimens of EBV-LPD has not been systematically studied, although drugs inhibiting viral replication (acyclovir, ganciclovir) are frequently used empirically in immunosuppressed patients with EBV-LPD. As the burden of morbidity and mortality due to EBV-LPD is substantial, the identification of novel treatment strategies capable of specifically targeting the EBV-transformed cell is highly desirable.

Over the last several years, we have focused on devising unique strategies to specifically target EBV-LPD, particularly in the context of immunosuppression (IS). Our work thus far has identified several treatment regimens that have produced encouraging results in preclinical animal models⁴⁻⁸ and in a

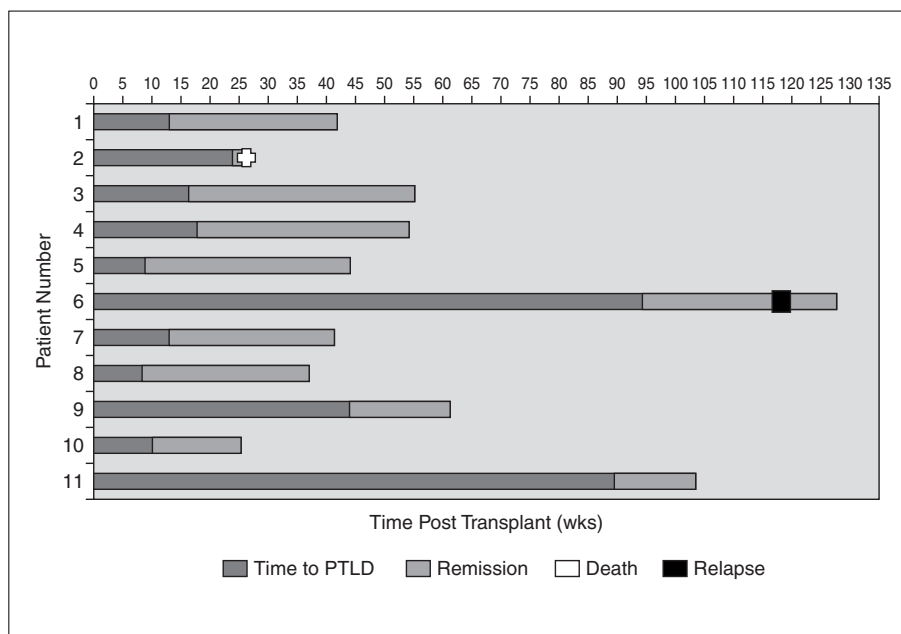
limited number of patients with EBV-LPD^{7,9,10}. This work has shown that EBV-specific cytotoxic (CD8+) T-cells spontaneously expand *in vivo* following reduction of IS and that the monitoring of these T-cells over time is helpful to predict outcome in patients with PTLD after kidney transplantation¹⁰. The observation that a substantial fraction of the expanded CD8+ T-cells was specific for lytic EBV antigens and that most PTLD specimens expressed lytic antigens, such as early lytic gene product viral thymidine kinase (vTK), suggests that, at least in PTLD, lytic EBV antigens may represent a valid therapeutic target, both immunologically and biochemically.

EBV-positive Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders (PTLD) respond to reduction of immunosuppression and antiviral therapy

PTLD is a serious complication of allogeneic solid organ and hematopoietic stem cell transplantation that is due to iatrogenic IS and is associated with mortality as high as 70-80%. PTLT is usually EBV-positive, of B-cell lineage, and typically develops in the first 12-18 months after transplantation. More rarely, PTLT may develop late after transplantation (5-10 years), in which case it is more likely to be EBV negative and of T/NK-cell lineage. The incidence of PTLT varies according to the type of allograft, the intensity of IS, and the EBV status of the recipient (EBV seronegative patients having the highest risk). Following solid organ transplantation the incidence ranges from 1-2 percent (kidney transplantation) to 8-10 percent (small bowel transplantation). No standard therapeutic approach exists and the efficacy of reduction of IS and antiviral drugs as front-line thera-

py for PTLT has remained unclear. We initiated a prospective study looking at a standardized and uniform approach consisting of rapid IS taper and antiviral therapy in patients with EBV-positive PTLT following kidney transplantation, with the goal of determining the response rate to this approach and the immunological basis of response. Immediately after review of the diagnostic biopsy sample and confirmation of the presence of EBV (by EBER1, and 2 or LMP-1 expression), azathioprine or mycophenolic acid were discontinued, the dose of cyclosporin A or tacrolimus was reduced by 50%, and prednisone was quickly tapered to 5-10 mg/day. Patients were simultaneously started on high-dose intravenous acyclovir (10 mg/kg every 8 hours) for 4 weeks, followed by maintenance oral acyclovir (800 mg three times a day) for a total of 12 months. Peripheral blood T-cell subpopulations were measured at baseline and every 4-6 weeks afterwards; peripheral blood mononuclear cells were serially procured to quantitate and analyze EBV-specific T-cells, via HLA-tetramer-peptide analysis. Eleven patients were treated with this approach over 3 years, all with EBV-positive PTLT of diffuse large B-cell lymphoma histology. In all patients examined, CD8+ T-cells expanded rapidly in the peripheral blood after IS taper, with a peak at approximately 10-12 weeks and an increase that ranged from 2.5-fold to 38.2-fold. In most cases the CD8+ T-cell expansion, compared to baseline, was sustained to the time of last follow up. Ten patients achieved a complete response (CR) within a median time of 16 weeks (range 7-26). Of these, nine are in continuous CR, whereas one had a recurrence and was treated with second line therapy (rituximab) (fig. 2). Notably, this patient had a very modest in-

Figure 2. Clinical outcome in 11 renal transplantation patients with PTLT treated with decreasing immunosuppression and acyclovir. The blue bar represents the time from kidney transplantation to the diagnosis of PTLT. The purple bar represents the time from initiation of therapy to last follow-up, death, or relapse (progression-free survival). Patient no. 2 died of sepsis 4 weeks after diagnosis of PTLT without a documented response. Patient no. 6 relapsed after a 25-month CR with IS taper and acyclovir. A second CR was achieved after withdrawal of IS and institution of rituximab therapy. A second relapse was then treated with high-dose antiviral therapy (zidovudine and ganciclovir), which led to a third CR (clinical, radiologic, and virologic).



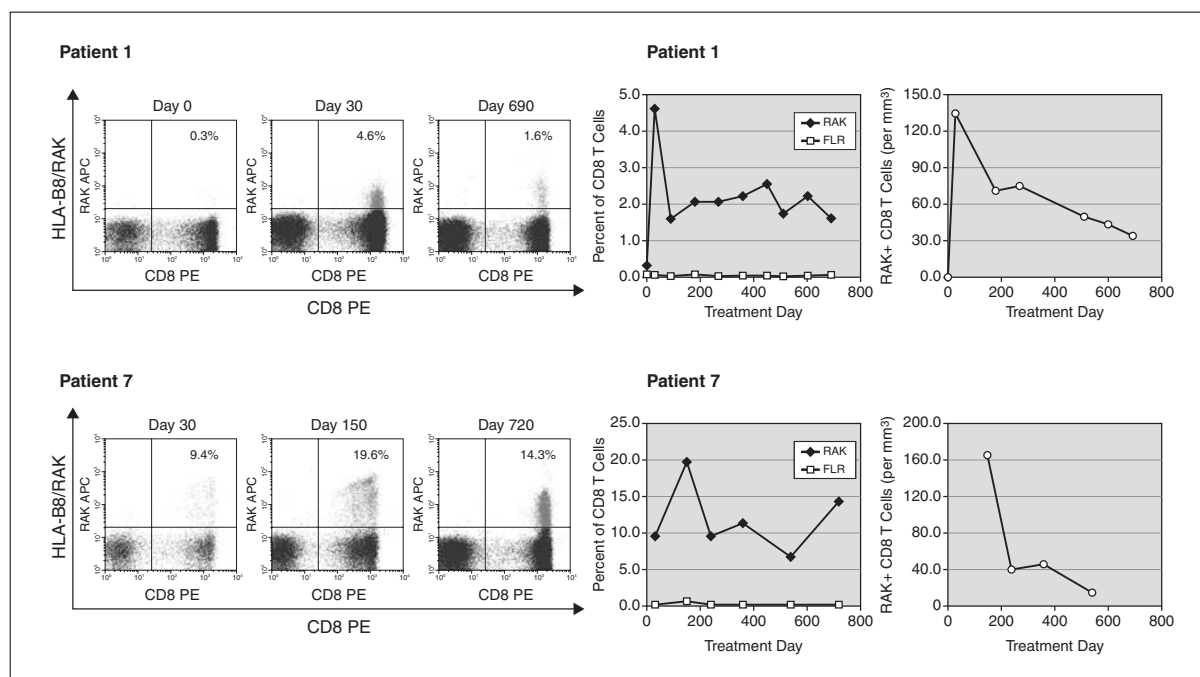


Figure 3. Quantification of EBV-specific T cells in 2 HLA-B8⁺ patients with HLA tetramers. Serial PBMC samples from 2 HLA-B8⁺ patients were analyzed by flow cytometry with APC-conjugated MHC/peptide tetramers. Representative results obtained at 3 time points with the HLA-B8 tetramer containing the RAKFKQLL peptide (HLA-B8/RAK) from the EBV immediate early gene BZLF-1 are shown in panel A. CD3⁺ events occurring in a lymphocyte gate are shown in blue. The percentage of CD8⁺ HLA-B8/RAK⁺ events is indicated in the upper right quadrant of each plot. (B) The serial analysis of RAK⁺ CD8⁺ cells in each patient, with RAK-specific CD8⁺ T cells represented as the percentage of CD8⁺ T cells (left) and as the absolute number (per microliter) in peripheral blood, calculated from the absolute CD8⁺ T-cell number determined by flow cytometry of fresh peripheral blood when available (right). Treatment day 0 is defined as the day when reduction of immunosuppression was initiated. Analysis with the additional tetramer reagent, HLA-B8/FLR (FLRGRAYGL; from the EBV latent gene EBNA-3A), is also shown.

crease of CD8⁺ T-cells and was one of the two in whom the expansion following IS taper was not sustained. In patients carrying HLA-class I alleles compatible with available HLA-tetramers for EBV, this technique was used to measure changes in peripheral blood CD8⁺ T-cells specific for two immunodominant EBV peptides RAK and FLR. RAK and FLR are immunodominant peptides for the early antigen BZLF1 and for the latent gene EBNA-3A, respectively. As shown in figure 3, a population of RAK-specific CD8⁺ T-cells expanded remarkably after IS taper in these patients, as they proceeded to clear their PTLD and achieve a CR. FLR-specific CD8⁺ T-cells did not change (fig. 3B). Interestingly, evidence of lytic EBV activity was found in the majority of PTLD specimens, by in-situ-RT-PCR for the viral gene thymidine kinase. This study demonstrates that kidney transplant patients have a profound suppression of T-cell mediated immunity at the time of development of PTLD and that controlled IS taper results in a remarkable recovery of the number of CD8⁺ T-cells within 10-12 weeks. This recovery appears to be associated with a high number of complete clinical responses, even in patients with histologically malignant PTLD (DLBCL), where the efficacy of a conservative therapeutic approach has typically been

judged very low. The specificity of the expanding CD8⁺ T-cell population in our study was predominantly directed at the lytic EBV antigen BZLF1. This is interesting given the close relationship between elevated peripheral blood viral DNA load and emergence of PTLD¹¹. Although the significance of this observation from the standpoint of clinical response remains unclear, it may be an indication that EBV viral replication in PTLD occurs more frequently than previously recognized and provides an additional rationale to further study the role of virus-directed therapies in this disease (see section C).

Animal models of EBV-LPD and preclinical development of novel therapies

A major focus of our laboratory involves the study of the pathogenesis, prevention and treatment of EBV-LPD in animal models^{4-6,8}. Much of this work has utilized a xenogeneic (human-murine) preclinical, in vivo model where severe combined immune deficient (SCID) mice are engrafted with human peripheral blood leukocytes (hu-PBL) from healthy human donors who are seropositive for EBV. Following engraftment of hu-PBL (determined by human Ig levels), animals spontaneously develop human EBV-LPD which allows us to examine the pathogenesis of

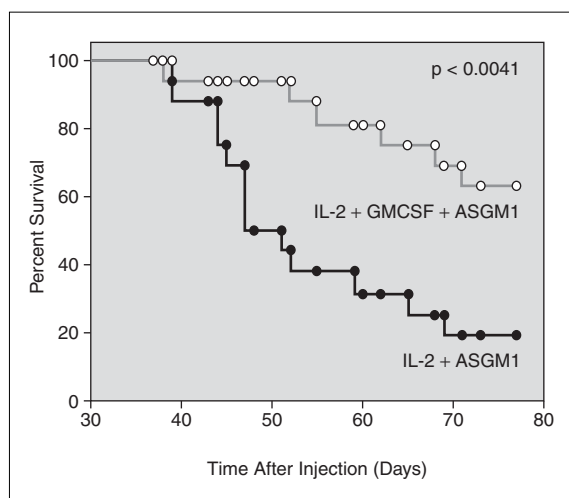


Figure 4. Kaplan Mier plot depicting survival of hu-PBL-SCID mice treated with combination GM-CSF/IL2 or IL2 alone. All mice were treated with anti-asialo GM1 antisera to deplete murine NK cells.

EBV-LPD as well as test the efficacy of various experimental therapeutic strategies *in vivo*. These tumors may be monoclonal, oligoclonal, or polyclonal in nature, display a latency III EBV gene profile, and have a surface phenotype and karyotype which most closely resemble B cell tumors that arise in patients with immune deficiency^{12,13}. Given the multiple similarities that exist between EBV-associated malignancies in immune compromised patients and EBV-LPD in the hu-PBL-SCID mouse, this model provides a unique opportunity for preclinical exploration of the treatment of EBV positive tumors *in vivo*.

Cytokine Immunotherapy in hu-PBL-SCID mice

Earlier efforts in our laboratory explored cytokine-based strategies to enhance human immune effector functions to prevent EBV-associated LPD in hu-PBL-SCID mice^{4,8}. Tary-Lehman et al demonstrated that human T cells from hu-PBL-SCID mice were not responsive to T cell receptor (TCR)-stimulation *in vitro* (anergic)¹⁴. Since human T lymphocytes derived from hu-PBL-SCID mice fail to produce IL-2 in TCR-dependent fashion, we hypothesized that provision of interleukin-2 (IL-2) could rescue these T cells from anergy and facilitate a human immune response against EBV-LPD and prolong survival of these mice. We randomized hu-PBL-SCID mice to receive treatment with daily subcutaneous injections of low dose human IL-2 (500 IU) or vehicle control. We were able to show that low dose IL-2 is capable of preventing EBV-LPD in the hu-PBL-SCID mouse model and that the protective effect was provided early after engraftment (4-8wks) by murine natural killer (NK) cells and later (8-14wks) by human CD3+/CD8+ T lymphocytes.

We hypothesized that the inability of PEG-IL-2 to provide adequate protection from EBV-LPD in the absence of murine NK cells was due to inefficient reactivation of human memory EBV-antigen specific T cells and that expansion of antigen specific T cells could be enhanced in the presence of human antigen-presenting cells (APCs). In order to promote engraftment or differentiation of human APCs *in vivo*, we treated mice with human Granulocyte-Monocyte Colony-Stimulating-Factor (GM-CSF), a cytokine that promotes differentiation and maintenance of dendritic cells. We hypothesized that treatment of hu-PBL-SCID mice with GM-CSF and low dose IL-2 would promote the outgrowth of human EBV-specific T cells and improve survival. Hu-PBL-SCID mice were randomized to either receive PEG-IL-2, GM-CSF, placebo, or combined GM-CSF and PEG-IL-2 therapy. All mice were depleted of murine natural killer cells with weekly injections of asialo-GM-1 anti-sera. Figure 4 shows a survival curve illustrating the significant improvement in survival of mice receiving combined GM-CSF and low dose IL-2 compared to low dose IL-2 alone ($p < 0.0041$). There were no significant differences in survival between animals receiving GM-CSF alone, placebo, or PEG-IL-2 alone. Subsequent lymphocyte depletion experiments were performed that identified human NK cells, CD3+/CD8+ T cells and human monocytes as essential mononuclear subsets required for the protective effect of combined GM-CSF and IL-2 therapy.

To further our understanding of events taking place *in vivo*, we performed flow cytometric studies to evaluate for the presence of human lymphocyte subsets engrafted in hu-PBL-SCID mice at week 5. Figure 5 demonstrates the T cell and B cell immunophenotypes using flow cytometric analysis of spleens from these mice. Mice receiving low dose IL-2 had a high percentage of human B cells (Top panel, CD19+) compared to mice receiving GM-CSF and IL-2 (lower panel, CD45+/CD19+). PEG-IL-2-treated mice also exhibited lower numbers of human T cells (Top panel CD3+/CD8+) compared to mice receiving GM-CSF and IL-2 (lower panel, CD3+/CD8+).

To determine the specificity of engrafted human T cells for EBV, we utilized MHC Class I tetramers loaded with EBV peptides. We identified EBV-specific T cells in animals treated with combined GM-CSF and IL-2 but not in animals treated with IL-2 alone (fig. 6). T cells identified were labeled with MHC Class I tetramers (HLA-B8) folded with either FLRGRAYGL or RAKFKQLL immunodominant peptides from the EBV genes products EBNA-3A and BZLF-1 respectively. Remarkably, a large fraction of EBV-specific T cells recognized the RAKFKQLL (RAK) peptide derived from the lytic gene product BZLF-1 (fig. 6). These data demonstrated that both lytic and latent gene products contribute key immunodominant peptides that are recognized by EBV-specific T cells for tumor immunity.

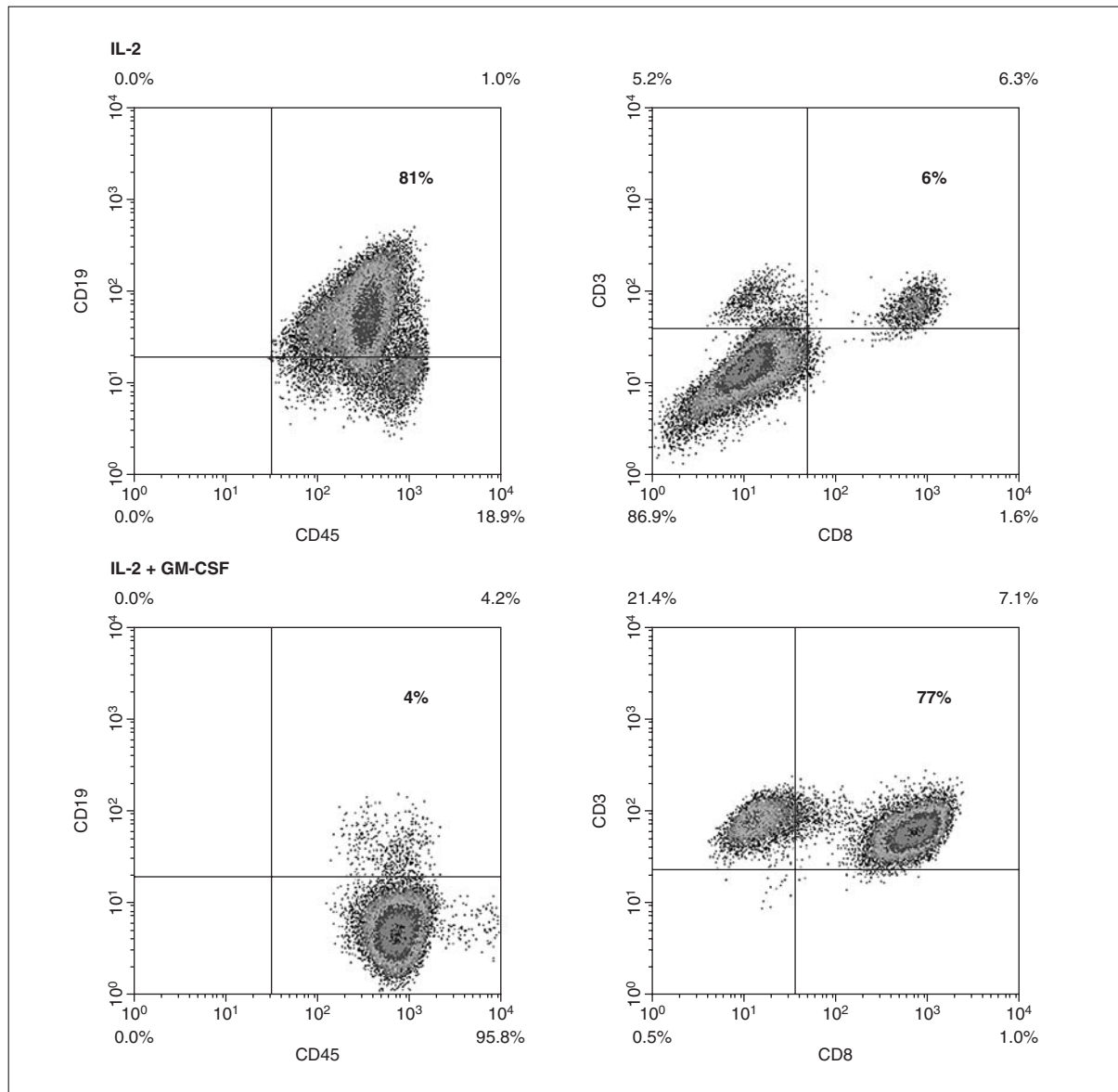


Figure 5. hu-PBL-SCID mice treated with IL-2 therapy demonstrate distinctly different populations of isolated human leukocytes in their spleens at week 5 compared with hu-PBL-SCID mice treated with GM-CSF and IL-2. Flow cytometric analysis of splenocytes from SCID mice 5 weeks after engraftment demonstrates a significant human B (CD19⁺) cell population in mice receiving IL-2 only (Upper left panel) compared to the B cells in mice receiving GM-CSF and IL-2 (lower left panel). In contrast, IL-2-treated animals displayed a smaller T cell (CD3⁺/CD8⁺) population (upper right panel) than the combined GM-CSF and IL-2 treatment group (lower right panel).

Targeting viral kinase gene products with nucleoside analogues

Immune deficient patients with EBV⁺ primary central nervous system lymphomas (PCNSL) face a poor prognosis with median survival times of 2-12 months despite aggressive management with radiation therapy. We have developed a pre-clinical model of EBV⁺ PCNSL to explore strategies that specifically target EBV-infected B lymphoblasts *in vivo*⁷. Stereotactic implantation of EBV-transformed human lymphoblastoid B cell lines (LCL) into the caudate nucleus of the nude rat resulted in lethal CNS tumor burden

manifested by the onset of focal neurological symptoms within 21 days. Radiation (1600 cGy) of LCLs resulted in upregulation of the EBV thymidine kinase transcript and sensitization of these cells to drug-induced apoptosis using the nucleoside analogs AZT and ganciclovir (GCV). *In vivo* trials using the nude rat PCNSL model demonstrated significantly improved mean survival time (MST) with single fraction whole-brain radiotherapy (WBRT) and AZT/GCV (MST 41.3 ± 3.3 days, p = 0.05), compared to AZT/GCV (MST 32.1 ± 1.1 days) or WBRT alone (MST 22 ± 0.8 days). We discovered constitutive and

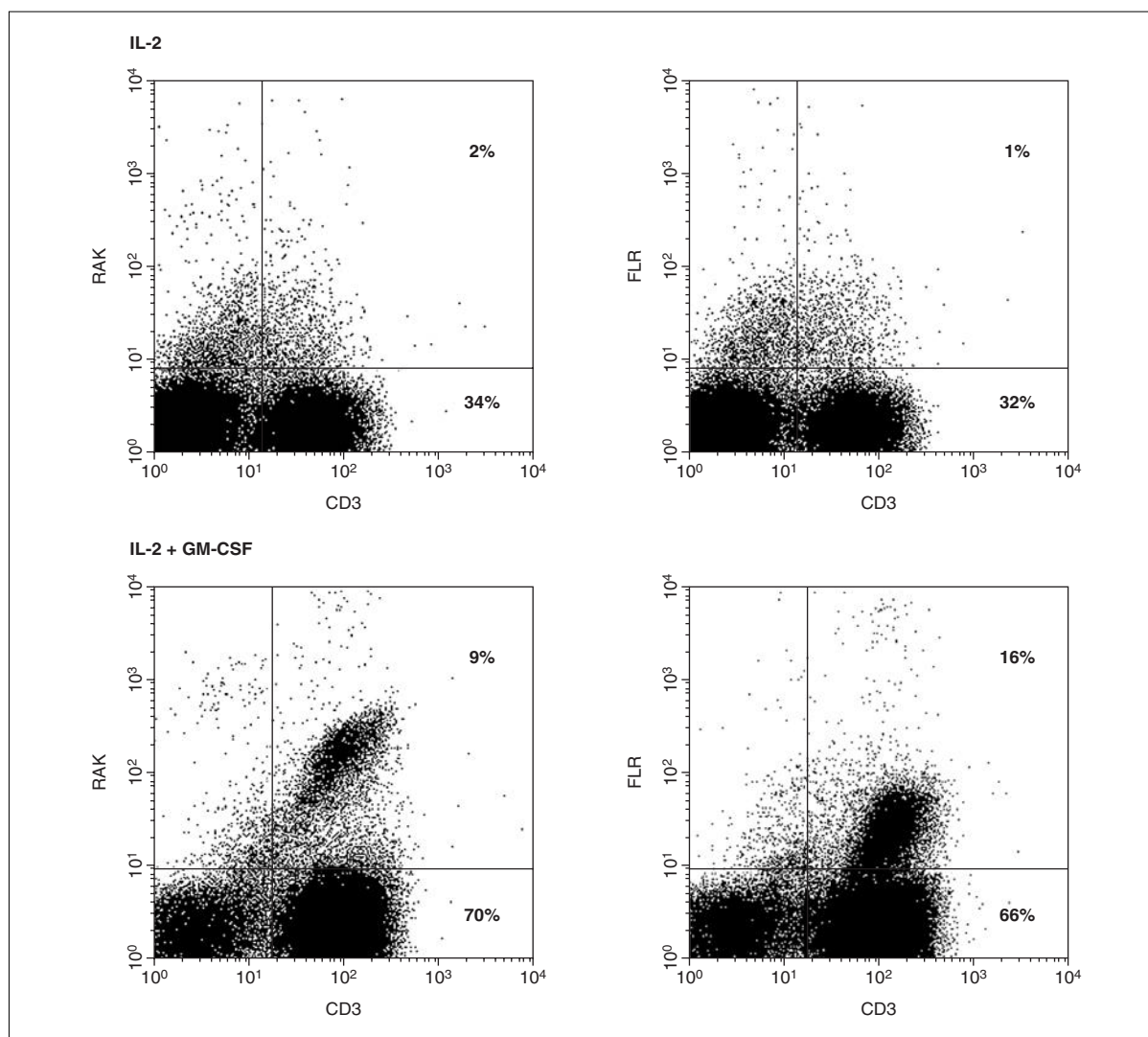


Figure 6. HLAB.8 tetramer analysis of splenocytes collected from mice treated with either combination IL2/GMCSF or IL2 alone. Animals treated with combination therapy demonstrated marked expansion of CD3⁺/CD8⁺ T cells that recognized immunodominant peptides derived from both lytic (RAK) and latent EBV gene products.

abundant EBV-TK mRNA expression in a stereotactic core biopsy specimen from a solid organ transplant patient with EBV⁺ PCNSL (fig. 7). Withdrawal of immunosuppression did not result in disease regression. This patient achieved a complete response after therapy with high dose AZT and GCV in the absence of WBRT (fig. 7), and remains in remission on oral maintenance AZT/GCV therapy 3 years after diagnosis⁷. These results suggest that anti-viral therapies can be effectively explored in vivo using a pre-clinical animal model of human EBV⁺ PCNSL, with subsequent translation to patients with EBV⁺ PCNSL.

Conclusions

EBV-related malignancies remain an exciting and fruitful area of basic and translational investigation. These disorders affect very large and heterogeneous

groups of patients worldwide and basic discoveries about mechanisms of disease and therapeutic targets are likely to have major public health impact. One of the current challenges is the definition of the cellular interactions and signaling pathways that are unique to EBV-positive malignancies and are critical to induce and sustain the malignant phenotype. The specific road to various EBV-induced malignancies in different patient populations is likely to depend, among other things, on genetic background, immune status, coexisting viral pathogens, and carcinogenic triggers. However, the presence of EBV in the tumor cells provides in principle a unique "Achille's heel". Future research should increasingly focus on the identification of pharmacologically and/or immunologically relevant targets to be exploited for therapy across the spectrum of EBV-induced malignancies.

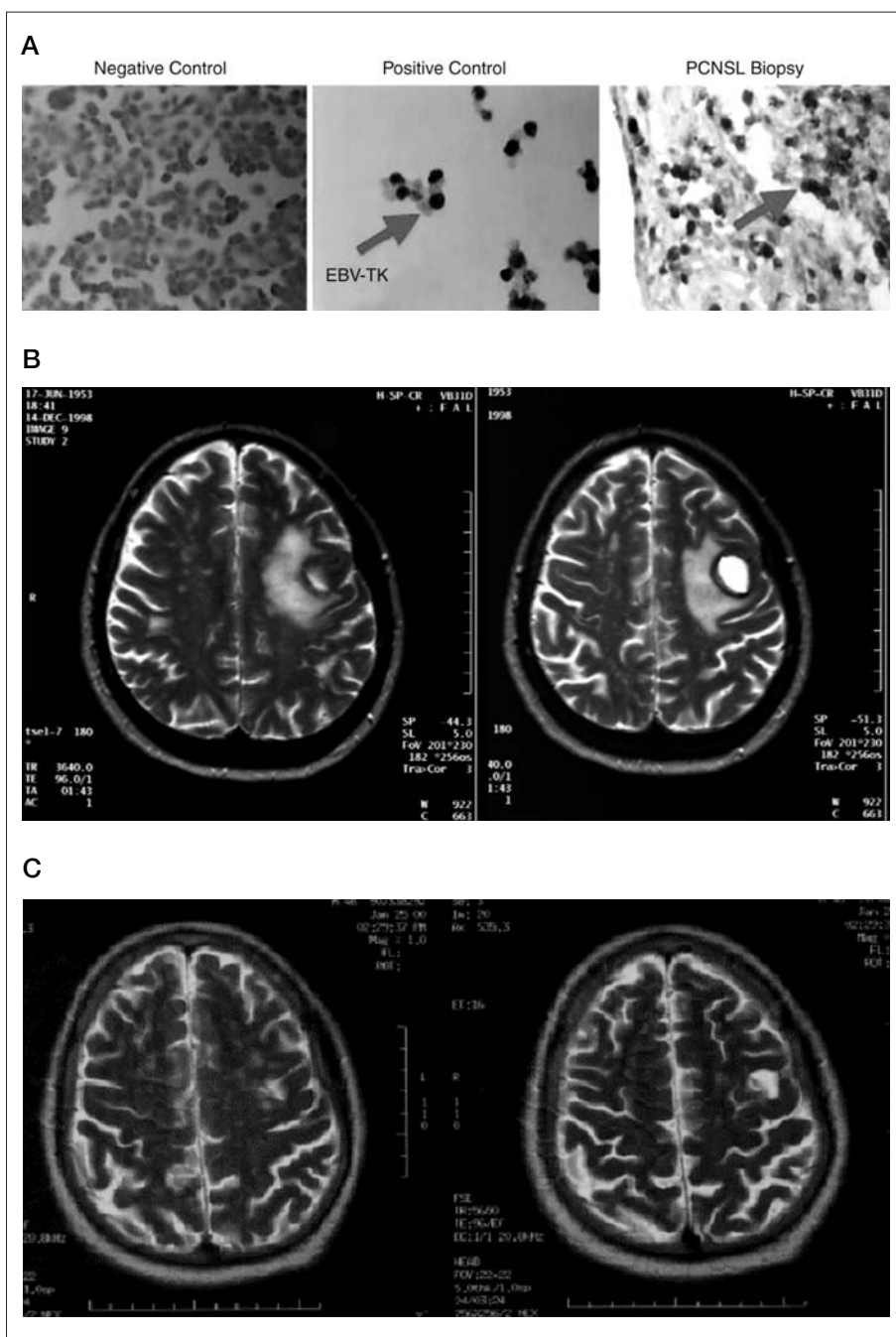


Figure 7. A) Stereotactic core biopsy from primary CNS lymphoma demonstrated EBV⁺ B-cell lymphoma with evidence of EBV-TK gene expression by in situ RT-PCR. B) Brain MRI from patient at diagnosis and C) after therapy with combination AZT/GCV.

References

!!!Completar bibliografía!!!

1. Shibata D, Weiss LM. Am J Pathol 1992;140:769-74.
2. Rickinson AB, Kieff E. Epstein-Barr virus., 3rd ed. En: Fields BN, K, DM, Howley PM, editors. Fields virology. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996.
3. Kieff E, Rickinson AB. En: Knipe DM, Howley PM, editors. Fields virology. Vol. 2. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1996; p. 2511-74.
4. Baiocchi RA, Caligiuri MA. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:5577-81.
5. Baiocchi RA, Ward JS, Carrodegus L, Eisenbeis CF, Peng R, Roychowdhury S, et al. J Clin Invest 2001;108:887-94.
6. Baiocchi RA, Roychowdhury S, Vourganti S, Bhatt D, Blaser B, Freud AG, et al. J Nat Cancer Institute 2004; In Press.

7. Roychowdhury S, Peng R, Baiocchi RA, Bhatt D, Vourganti S, Grecula J, et al. Cancer Res 2003;63:965-71.
8. Eisenbeis CF, Grainger A, Fischer B, Baiocchi RA, Carrodegus L, Roychowdhury S, et al. Clinical Cancer Research In Press. 2004.
9. Khatri VP, Baiocchi RA, Herzig GP, Oberkircher AR, Caligiuri MA. J Immunol 1997;163:500-6.
10. Porcu P, Eisenbeis CF, Pelletier RP, Davies EA, Baiocchi RA, Roychowdhury S, et al. Blood 2002;100:2341-8.
11. Hoshino Y, Kimura H, Kuzushima K, Tsurumi T, Nemoto K, kikuta A, et al. Bone Marrow Transplant 2000;26:199-201.
12. Rowe M, Young LS, Crocker J, Stokes H, Henderson S, Rickinson AB. J Exp Med 1991;173:147-58.
13. Purtilo DT, Falk F, Pirruccello SJ, Nakamine H, Kleveland K, Davis JR, et al. Int J Cancer 1991;47:510-7.
14. Tary-Lehmann M, Lehmann PV, Schols D, Roncarolo MG, and Saxon A. J Exp Med 1994;180:1817-27.

LINFOMAS EXTRAGANGLIONARES

COORDINADOR: C. MONTALBÁN. *Hospital Ramón y Cajal. Madrid.*

Resumen simposio

Hasta hace pocos años los linfomas extraganglionares se han considerado como una rareza y se les ha prestado poca atención. Este panorama ha cambiado radicalmente por múltiples motivos, el primero de ellos la evolución del propio concepto de linfoma extraganglionar. Aunque cualquier estructura no ganglionar se puede afectar en la diseminación de cualquier linfoma nodal, no cabe duda que en estas áreas aparecen linfomas de manera primaria. En muchas ocasiones no se han reconocido como linfomas, utilizando diagnósticos de pseudolinfoma o síndromes linfoproliferativos no bien definidos. Hoy día hay instrumentos que permiten delimitar muchas de estas situaciones como verdaderos linfomas primarios. Ha sido determinante la identificación del tejido linfoide asociado a las mucosa (MALT) y de los linfomas que aparecen en este sistema. Por otra parte el concepto de linfoma primario extraganglionar se aceptaba cuando el linfoma se encontraba exclusivamente en un órgano extranodal, pero esto es sólo una parte de la historia, ya que estos linfomas aunque tienden a estar durante largo tiempo localizados y a manifestarse como enfermedad local, a lo largo de su evolución se diseminan y se comportan como los linfomas nodales. Los linfomas del MALT, considerados conceptualmente como enfermedad localizada, se ha demostrado que en una primera fase se diseminan a otras áreas del MALT, y posteriormente a áreas linfáticas y médula ósea. En algunos de ellos la leucemización y la afectación medular pueden ya detectarse en el momento del diagnóstico. El reconocimiento de la historia natural de estos linfomas y el estudio de su incidencia en comunidades en las que existen registros fiables, ha permitido reconocer la verdadera frecuencia de los linfomas extraganglionares, que constituye alrededor de un tercio de todos los linfomas. Otro aspecto fundamental ha sido el conocimiento de algunos de los mecanismos etiopatogénicos que ocurren en estos linfomas. El concepto del MALT y de los linfomas derivados del MALT ha permitido saber que estímulos locales específicos en algunas áreas extraganglionares pueden poner en marcha una cadena de acontecimientos que condicionan expansión policlonal de linfocitos B, selección clonal y cambios moleculares que conducen al linfoma y a su diseminación y transformación. Se han reconocido varios estímulos inductores de la aparición de linfomas MALT extraganglionares, bacterias, parásitos, virus y alteraciones inmunológicas primarias. El caso mejor conocido es el del *Helicobacter pylori* en la aparición del linfoma MALT del estómago, pero también los de *Campylobacter jejuni* en la enfermedad inmunoproliferativa intestinal (que es una forma de linfoma MALT), *Borrelia burgdorferi* en los linfomas MALT cutáneos y *Chlamydia psittaci* en los linfomas MALT de la conjuntiva y anejos oculares. Menos clara es la relación de parásitos, como anisakis y fasciola, con el linfoma intravascular. Los virus también tienen un papel, ya que en algunas áreas geográficas algunos linfomas gástricos pueden estar inducidos por virus de Epstein-Barr (VEB) o virus de la hepatitis C (VHC). El VEB está presente en los linfomas T nasales, en los linfomas extraganglionares postrasplante y en los cerebrales de los inmunodeprimidos y está relacionado, junto a HHV8, con los linfomas primarios de cavidades. El VHC también está relacionado con algunos linfomas de la zona marginal esplénica, y con linfomas linfoplasmocitarios en otras áreas (hígado) o sistémicos. Situaciones autoinmunes como tiroiditis de Hashimoto y Sjögren inducen la aparición de linfomas MALT tiroideos y de glándulas salivales y la enteropatía por gluten la de linfomas T intestinales. El reconocimiento del linfoma extraganglionar como enfermedad local ha permitido curar a una parte de esos pacientes en las fases iniciales (localizadas) de la enfermedad utilizando tratamientos locales (cirugía o radioterapia) y sobre todo demostrar que en algunas situaciones la eliminación del desencadenante puede interrumpir la secuencia de acontecimientos y conseguir la desaparición del linfoma e incluso su curación, como en el caso del *H. pylori* y el linfoma gástrico. Si esto sucede en unas áreas extraganglionares es razonable que también ocurra en otras, aunque por el momento no se conozcan los antígenos desencadenantes. También sería razonable que estímulos locales o sistémicos (virales, bacterianos o inmunológicos) y mecanismos similares tengan lugar en los linfomas nodales. Los ejemplos arriba citados en relación

con virus son buena prueba de ello. Persisten algunas cuestiones para los que no tenemos todavía respuesta: ¿por qué aparecen linfomas MALT primarios en el hígado, la mama o la dura? ¿Cuáles pueden ser los mecanismos de la aparición de linfomas no MALT extraganglionares? ¿Cuáles son los mecanismos que subyacen en localizaciones tan específicas como los linfomas del sistema nervioso central (SNC)? ¿Cuál es mejor tratamiento de los linfomas del SNC? No está claro cuál es el tratamiento adecuado para los linfomas extraganglionares una vez que se han diseminado, aunque la evidencia indica que su comportamiento similar a los linfomas nodales requiere idéntico tratamiento.

Algunos de estos interesantes problemas se van a discutir en esta sesión. La Dra. Rouskone-Fourmestraux discutirá los aspectos etiológicos y el manejo de los linfomas MALT gástricos (la estrella de los linfomas MALT) y de los intestinales y el Dr. Raderer los linfomas MALT de otras áreas extraganglionares y su aproximación diagnóstica y terapéutica. Los Dres. Graus y Ferreri discutirán diferentes aspectos de los linfomas cerebrales, sus manifestaciones clínicas y problemas diagnósticos, su tratamiento y las incógnitas que plantean algunos linfomas raros del SNC, cuyo comportamiento puede darnos indicaciones sobre sus mecanismos de aparición. La Dra. Tracey discutirá cómo la tecnología actual puede delimitar los linfomas extranodales y separarlos de otras situaciones que no son linfomas y permitir conocer sus mecanismos moleculares subyacentes. Utilizando las micosis fungoides como modelo comentará cómo el estudio del perfil génico de estos linfomas es un instrumento que permite contestar algunas cuestiones básicas, que podrá aplicarse a otros tipos de linfoma extraganglionar.

PRIMARY GASTRIC AND INTESTINAL LYMPHOMA MALT-DERIVED AND OTHER LYMPHOMA TYPES

A. RUSKONE-FOURMESTRAUX

*Groupe d'Etude des Lymphomes Digestifs (GELD).
Servicio de Gastroenterología. Hôtel Dieu. París.*

Introduction

The incidence rate of NHL, especially extranodal disease, has been increasing steadily for the past two decades. Whether this represents a real increase or results from improved diagnosis and more efficient case registration is as yet unclear. This increased rate was evaluated at between 3-5 % per annum in the gastro-intestinal lymphomas (GIL). From cancer registry data from 14 countries, the calculated incidence rate was 0.21, 0.16, and 0.08 per 100.000 for gastric, small intestinal and colonic NHL, respectively¹.

Primary GIL comprise a group of distinct clinico-pathological entities of B-and T-cell types [3]. In occidental countries, B-cell lymphomas are more frequent (over 80 %) while in Southern Japan T-cell lymphomas predominate (> 75 %, intestinal cases). In the Western world B-cell lymphomas of MALT-type (mucosae associated lymphoid tissue-type) are the more common. Most of these lymphomas arise in the stomach²⁻⁴. They may present as typical low-grade (small B-cell) lymphomas or with partial or complete transformation into high-grade (large B-cell) tumours⁵. In the Middle Eastern and Mediter-

anean populations there was a relatively high incidence of small bowel NHL referred as immunoproliferative small intestinal disease (IPSID) comprising alpha-chain disease (α -CD), a special form of MALT intestinal lymphoma, they are not considered in this chapter. Other B-cell lymphomas of the GI tract include mantle-cell lymphoma, which presents as intestinal lymphomatous polyposis, follicular lymphoma, Burkitt's lymphoma and immunoblastic B-cell lymphoma associated with immunodeficiency states. All these types also occur either in nodal or extranodal sites. Finally enteropathy (coeliac disease)-associated T-cell lymphoma (EATL) shows distinct features and represents 10 % of the GIL.

Gastric lymphomas (GL) of MALT-type

The group of lymphomas called as low-grade MALT-type lymphomas include a number of extranodal lymphomas composed mostly of small cells, that share similar clinical, pathological and molecular features⁵. The term MALT-type lymphoma was first used by Isaacson because their histological characteristics recapitulating features of MALT as exemplified by the Peyer's patches. These tumours initially consist of mucosal small cleaved cell or centrocytic-like cell proliferation colonising the follicular germinal centers with a tendency to invade and destroy glandular epithelium, forming the characteristic lymphoepithelial lesions. With respect to their normal counterpart cells, these lymphomas are defined as extranodal marginal zone B-cell lymphomas of MALT in the last world Health Organization (WHO) Classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and lymphoid tissue⁶. These extranodal lymphomas may arise

from normal native MALT physiologically present in the gut or acquired MALT developed in sites of chronic inflammation in response to either infection or autoimmune phenomena. In the stomach, acquired MALT provides the background for lymphoma development. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is the only well established chronic antigenic stimulus that causes the development of gastric MALT. The link between *H. pylori* gastritis and low-grade GL of MALT-type has been shown by data in case control and epidemiological studies⁷ and by the regression of the majority of low-grade GL by eradication of *H. pylori*⁸⁻¹⁶. These prolonged lymphoid reactive proliferations favour the emergence of a pathological clone, which can progressively replace the normal lymphoid population giving rise to a MALT-type lymphoma. As in nodal NHL, low-grade MALT-lymphoma may progress to high-grade lymphoma. The stomach is the more frequently involved site of these low-grade GIL.

Clinicopathological presentation and diagnosis

Low-grade GL typically occurs in the fifth decade while high-grade GL are diagnosed later: 57.6 compared to 65.5 years in one recent study. This observation suggests that the progression of low-grade to high-grade GL takes about one decade. The presenting symptoms are generally non-specific dyspepsia or symptoms suggestive of peptic ulcer disease, sometimes revealed by complications such as anemia or gastrointestinal bleeding. The presence of an abdominal mass is a rare phenomenon at presentation. The endoscopic features may range from non-specific macroscopic gastritis or thickened folds to ulcerative or infiltrating lesions in low-grade tumours, whereas high-grade lymphomas generally present as large ulcers or more protruding tumours¹⁷. Multiple biopsies are generally required for histological diagnosis because of the multifocal nature of the disease and to exclude focal high-grade transformation. Combination with endoscopic ultrasonography allows evaluation of locoregional extension especially in case of parietal tumour infiltration and nodal involvement¹³. Most of early stage low-grade GL are confined to the mucosal and submucosal layer and when invasion to deeper layers are found, high-grade transformation should be suspected. Lymph node involvement is generally locoregional and depends on parietal involvement of the tumour. It is generally believed that low-grade GL remains localised to the site of origin for prolonged period. However, recent studies have suggested the possibility of dissemination to the small intestine, other MALT organ or even bone marrow. At diagnosis these potential dissemination must be carefully excluded by using a thorough staging procedure including the recording of patients' physical examination; ileocolonoscopy together with upper gastrointestinal tract endoscopy, small bowel and chest radiography, abdominal computed tomography (CT scan), Waldeyer's ring examination

with endoscopy and biopsies or CT scan, and bone marrow biopsy.

The pathological findings of low-grade GL of the marginal zone of MALT include: typical morphology with small B-cells or centrocytic-like cells, lymphoepithelial lesions and clonality defined by using either immunochemistry or molecular techniques. Associated *H. pylori* chronic gastritis can render the diagnosis difficult. The presence of scattered clusters of large transformed blastic cells must be considered as a progression to high-grade MALT lymphoma^{18,19}. Coexistence of low-grade MALT and high-grade components in the same tumour is frequent and the observation of identical immunoglobulin gene sequences in both components confirms their clonal identity. A low-grade component is not always detected in high-grade lymphoma especially on small endoscopic biopsies. However, it has been shown that there is no difference in clinical behaviour between high-grade cases with or without low-grade component and should therefore be categorised of MALT-type.

H. pylori chronic infection induces and sustains an actively proliferating B-cell population at risk of developing genetic abnormalities²⁰. A limited number of genetic studies have provided important information of histogenesis of MALT lymphomas. Allele imbalance of tumour-suppressor genes (DDC and APC) was found in some cases of MALT lymphoma in the transition from chronic gastritis to low-grade and high-grade GL. Thus, genetic instability in proliferating B-cells provides the potential for induced chromosomal abnormalities. Indeed, trisomy 3 was detected in 60 % of low-grade MALT lymphomas arising in various organs. Recent studies are now focusing on additional genetic abnormalities, such as the t(11;18) and t(1;14). Translocation t(11;18) has been reported in 30 % of low-grade MALT GL and one study suggested that it was only present in more advanced low-grade GL, non responding to *H. pylori* eradication and thus appears to be related to *H. pylori* independent survival/growth²¹. Another cytogenetic abnormality, t(1;14), less frequently detected in MALT lymphomas, has also been suspected to confer *H. pylori* independent growth of tumour cells. Finally, further genetic events such as complete inactivation of the tumour suppressor genes P53 and P16, possibly activation of c-myc oncogenes by translocation and other undetermined abnormalities have been suggested to result in high-grade transformation. Routine detection of these translocations could not only lead to much more precise definition of this lymphoma but help the interpretation of therapeutic results and then guide therapeutic strategy.

Treatment

As *H. pylori* is now recognised to be the major inducer of low-grade GL, its eradication could be the first step of the treatment.

Currently, the best treatment protocol includes proton pump inhibitor combined with two antibiotics (as clarithromycin or metronidazole and amoxicillin) two weeks, which results in *H. pylori* eradication in more than 90% of infected patients¹³. As long as the eradication of the bacterium is effective, it has been demonstrated that more than 70% of low-grade MALT GL regress at early stage. Histological complete remission may be achieved between two and 18 months after *H. pylori* eradication. We reported that in *H. pylori* positive status patients with localised GL, in the absence of lymph node involvement carefully assessed by endoscopic ultrasonography, a complete remission rate of lymphoma is expected in 79% of cases¹³. Moreover, a significant difference in response rate was observed in lymphoma restricted to the mucosa and more deeply seated lesions. Monoclonal expansion remained detected at distance from eradication in some cases been judged histologically in remission^{10,14}. A recent series of six patients followed for 8 years demonstrated that histological and molecular relapses could occur in a transient fashion²². These findings suggest that *H. pylori* eradication removes a growth stimulus from MALT GL without necessarily eliminating the B-cell clone. In the absence of *H. pylori* reinfection the presence of such a clone does not appear to be deleterious and may be self-limiting, however, more prolonged follow-up is mandatory.

Patients after antibiotic failure and persisting tumour and those with *H. pylori* negative status could benefit of regional approach, such as radiotherapy or radical surgical resection with curative intent. Despite the appearance of one dominant lesion, the disease may be multifocal in the stomach, and total gastrectomy was mandatory to cure GL²³. In case of large tumours surgery has the added advantage of documenting a potential high-grade associated proliferation. Nowadays surgery is much less indicated and low-dose- (30 greys) radiotherapy seems to give good results and is evaluated in different European protocols^{24,25}. Others have also used chemotherapy and a variety of regimens have been administered, often with results consistent with responses seen in other low-grade NHL^{26,27}. A complete or near complete response is achieved in more than half of the patients followed by relapse in some of them sometimes years after the initial treatment. The wait and see strategy advocated by some authors, could be conceivable only in older patients, owing the risk of high-grade transformation.

In high-grade lymphomas despite anecdotal cases regressing after antibiotics, chemotherapy including anthracyclin and now Rituximab, sometimes associated with surgery, is the main treatment for these tumours^{28,29}. Our results including surgery and CHOP led to an overall five-year survival rate of 100% in case of localised tumour³. However, chemotherapy alone is now more often given but in addition it is

recommended to eradicate *H. pylori* to eliminate a residual or relapse low-grade component.

B-Primary intestinal B-cell lymphomas

Among gastrointestinal lymphomas, those arising primarily in the intestine have been less extensively reported. We studied the clinicopathological features and outcome of a large series of primary B-cell intestinal lymphomas (IL). They accounted for 99 (28%) of the 361 cases of gastrointestinal lymphomas enrolled in the successive french GELD studies³⁰. Ninety-two of them (93%) were of B-cell phenotype, including 38 diffuse large cell lymphomas, 36 mantle-cell lymphomas (lymphomatous polyposis), 11 follicular lymphomas, 5 low-grade marginal zone lymphomas of MALT-type, and 2 Burkitt's lymphomas. Clinical presentations differed according to histological subtype: younger age in Burkitt's lymphomas and older in low-grade MALT-type, obstruction with surgical emergency mainly observed in diffuse large cell lymphomas, endoscopic extensive nodular and polypoid pattern in mantle-cell and follicular subtypes as well as advanced stage, poorer outcome in mantle-cell lymphomas with 44% overall survival at 5 years, prolonged survival in follicular and MALT subtypes despite failure to achieve true complete remission after treatment.

C-Enteropathy-associated T-cell lymphoma

The term enteropathy-associated T-cell lymphoma (EATL) largely refers to T-cell -mainly small intestinal- lymphomas associated with the characteristic pathological features of celiac disease (CD) or of non-specific ulcerative jejunoileitis. EATL is a high-grade intestinal T-cell lymphoma of poor prognosis, deriving from an extensive low-grade epithelial T-cell proliferation that occurs in patients with chronic and often-silent CD after prolonged gluten exposure. Patients with overt CD should be convinced to strictly adhere to a gluten free diet, even if their disease is mild.

EATL often presents as a surgical emergency with intestinal obstruction or perforation³¹. The disease may also be revealed in patients with known CD unresponsive to gluten-free diet (GFD), known as refractory sprue. Macroscopically the findings of one or several, ulcerated tumours, mainly jejunal, are most frequently observed, sometimes associated with benign-appearing ulcers. Histologically, EATL are largely high-grade lymphomas showing varying degrees of polymorphism. Large tumoral cells very probably derive from a subset of intraepithelial lymphocytes as suggested by their capability to invade crypt epithelium and by their peculiar phenotypes, usually CD3+, CD4-, CD8-, CD103+ or occasionally CD3+, CD4-, CD8+ and CD56+, CD103+ (cells expressing the markers of activated cytotoxic T cells). Cells are arrested in varying stages of activation from one tumour to another. Moreover, clonal T-cell receptors (TCR) γ gene rearrangement is found³².

Strict adherence to GFD is the single means of prevention the occurrence of EATL. Prognosis is poorer than for B-cell lymphoma. Intensive chemotherapy is the main treatment. Even exclusive total parenteral nutrition does not seem to be effective on reversing mucosa abnormalities, but may be used for nutritional purposes. Surgery is sometimes mandatory for diagnosis or complication.

References

- Gurney KA, Cartwright RA, Gilman EA. Descriptive epidemiology of gastrointestinal non-Hodgkin's lymphoma in a population-based registry. *Br J Cancer* 1999;79:1929-34.
- Montalban C, Castrillo JM, Abreira V, et al. Gastric B-cell mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. Clinicopathological study and evaluation of the prognostic factors in 143 patients. *Ann Oncol* 1995;6:355-62.
- Ruskone-Fourmesttraux A, Aegerter P, Delmer A, Brousse N, Galian A, Rambaud JC. Primary digestive tract lymphoma: a prospective multicentric study of 91 patients. Groupe d'Etude des Lymphomes Digestifs. *Gastroenterology* 1993;105:1662-71.
- Zucca E, Cavalli F. Extranodal lymphomas. *Ann Oncol* 2000;11:219-22.
- Isaacson PG. Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Semin Hematol* 1999;36:139-47.
- Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. World Health Organization Classification of tumours. En: Kleinhuus P, Sobin LH, editors. Pathology and genetics of the haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC press, 2001.
- Parsonnet J, Hansen S, Rodríguez L, et al. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med* 1994;330:1267-71.
- Alpen B, Neubauer A, Dierlamm J, et al. Translocation t(11;18) absent in early gastric marginal zone B-cell lymphoma of MALT type responding to eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Blood* 2000;95:4014-5.
- Montalban C, Manzanal A, Boixeda D, et al. *Helicobacter pylori* eradication for the treatment of low-grade gastric MALT lymphoma: follow-up together with sequential molecular studies. *Ann Oncol* 1997; 8:37-9.
- Morgner A, Thiede C, Bayerdorffer E, et al. Long-term Follow-up of Gastric MALT Lymphoma After *H. pylori* Eradication. *Curr Gastroenterol Rep* 2001;3:516-22.
- Neubauer A, Thiede C, Morgner A, et al. Cure of *Helicobacter pylori* infection and duration of remission of low- grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1350-5.
- Nobre-Leitao C, Lage P, Cravo M, et al. Treatment of gastric MALT lymphoma by *Helicobacter pylori* eradication: a study controlled by endoscopic ultrasonography. *Am J Gastroenterol* 1998;93:732-6.
- Ruskone-Fourmesttraux A, Lavergne A, Aegerter PH, et al. Predictive factors for regression of gastric MALT lymphoma after anti- *Helicobacter pylori* treatment. *Gut* 2001;48:297-303.
- Thiede C, Wundisch T, Neubauer B, et al. Eradication of *Helicobacter pylori* and stability of remissions in low- grade gastric B-cell lymphomas of the mucosa-associated lymphoid tissue: results of an ongoing multicenter trial. *Recent Results Cancer Res* 2000;156:125-33.
- Wotherspoon AC, Dogliani C, Diss TC, et al. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa- associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1993;342: 575-7.
- Steinbach G, Ford R, Gloor G, et al. Antibiotic treatment of gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. An uncontrolled trial. *Ann Intern Med* 1999;131:88-95.
- Kolve ME, Fischbach W, Wilhelm M. Primary gastric non-Hodgkin's lymphoma: requirements for diagnosis and staging. *Recent Results Cancer Res* 2000;156:63-8.
- Genta RM, Franceschi F. Treating biopsies to cure patients: the management of histological findings in mucosa-associated lymphoid tissue (MALT). *J Clin Gastroenterol* 1999;29:116-7.
- De Jong D, Boot H, Taal B. Histological grading with clinical relevance in gastric mucosa- associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. *Recent Results Cancer Res* 2000;156:27-32.
- Du MQ. Molecular Biology of Gastric MALT Lymphoma: Application in Clinical Management. *Hematology* 2002;7:339-44.
- Liu H, Ye H, Ruskone-Fourmesttraux A, et al. T(11;18) is a marker for all stage gastric MALT lymphomas that will not respond to *H. pylori* eradication. *Gastroenterology* 2002;122:1286-94.
- Isaacson PG, Diss TC, Wotherspoon AC, Barbazza R, De Boni M, Dogliani C. Long-term follow-up of gastric MALT lymphoma treated by eradication of *H. pylori* with antibodies. *Gastroenterology* 1999;117:750-1.
- Vaillant JC, Ruskone-Fourmesttraux A, Aegerter P, et al. Management and long-term results of surgery for localized gastric lymphomas. *Am J Surg* 2000;179:216-22.
- Tsang RW, Gospodarowicz MK, Pintilie M, et al. Stage I and II MALT lymphoma: results of treatment with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;50:1258-64.
- Schechter NR, Yahalom J. Low-grade MALT lymphoma of the stomach: a review of treatment options. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;46: 1093-103.
- Hammel P, Haioun C, Chaumette MT, et al. Efficacy of single-agent chemotherapy in low-grade B-cell mucosa- associated lymphoid tissue lymphoma with prominent gastric expression. *J Clin Oncol* 1995;13: 2524-9.
- Montalban C, Santon A, Boixeda D, et al. Treatment of low grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma in stage I with *Helicobacter pylori* eradication. Long-term results after sequential histologic and molecular follow-up. *Haematologica* 2001;86:609-17.
- Raderer M, Chott A, Drach J, et al. Chemotherapy for management of localised high-grade gastric B-cell lymphoma: how much is necessary? *Ann Oncol* 2002;13:1094-8.
- Coiffier B, Lepage E, Briere J, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002;346:235-42.
- Ruskone-Fourmesttraux A, Lavergne-Slove A, Delmer A. Synopsis: gastrointestinal lymphomas. *Gastroenterol Clin Biol* 2002;26:233-41.
- Chott A, Vesely M, Simonitsch I, Mosberger I, Hanak H. Classification of intestinal T-cell neoplasms and their differential diagnosis. *Am J Clin Pathol* 1999;111:568-74.
- Cellier C, Delabesse E, Helmer C, et al. Refractory sprue, coeliac disease, and enteropathy-associated T-cell lymphoma. French Coeliac Disease Study Group. *Lancet* 2000;356:203-8.

EXTRAGASTROINTESTINAL MALT LYMPHOMAS

M. RADERER

Department of Medicine I. Division of Oncology.
University of Vienna. Vienna. Austria.

Summary

Extragastrintestinal MALT lymphoma may arise in a variety of organs, and has been associated with autoimmune conditions such as Sjogren's syndrome or Hashimoto's thyroiditis or infection with *Borrelia burgdorferi* (cutaneous MALT lymphoma) or *Chlamydia psittaci* (orbital MALT lymphoma). While characterized by an indolent clinical course in analogy to gastric MALT lymphoma, such patients nevertheless have a high rate of multiorgan involvement (up to 50%) upon diagnosis and exact staging is mandatory. Consequently, local treatment such as radiation –while resulting in excellent local control– is associated with a high rate of systemic relapses. Thus, the evaluation of systemic approaches appears reasonable, and has given excellent results also in localized disease. Further studies on this issue with a prolonged follow-up are needed in view of the indolent nature of the disease.

Introduction

Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of the mucosa associated lymphoid tissue (MALT lymphoma) accounts for 7% of all lymphoma cases, and thus is among the more common types of lymphoma¹. Initially defined by Isaacson and Wright in 1983, the structure of the lymphoma resembles the features of mucosa associated lymphoid tissue (as exemplified by the Peyer's patch) rather than mimicking the structure of lymph nodes². The postulated cell of origin of MALT-lymphoma is the marginal zone (MZ) B-cell, which corresponds to a post germinal-center B-cell with rearranged and mutated immunoglobulin heavy and light chain genes. These cells are thought to capture, process and present

antigens and to deliver co-stimulatory signals to T-cells. In addition, MZ B-cells apparently display the capacity to differentiate into plasma cells and most early antibody-secreting cells are thought to originate from MZ B-cell precursors. Of interest is the fact that physiological MALT usually does not give rise to MALT lymphoma, which usually develops in acquired mucosal lymphoid tissue. According to this concept, it is not surprising that MALT lymphoma of the gut –which contains the largest accumulation of lymphoid tissue in the human body– is relatively rare, while the stomach, which is normally devoid of lymphoid tissue, is the most common site of origin for MALT lymphoma^{1,2}.

This high rate of gastric MALT lymphomas, which comprise about 70 % of all MALT lymphoma cases, has led to the erroneous notion that “MALT lymphoma” may be used as a synonym for gastric lymphoma. However, MALT lymphomas can be found throughout the whole body in organs able to acquire MALT in the course of chronic inflammatory/antigenic stimulation, and they have even been reported in non-mucosal sites such as the dura. To the current knowledge, the most common sites of presentation for MALT lymphoma apart from the stomach are the lung (14 %), head and neck area including the salivary glands (14 %), ocular adnexa (12 %) and skin (11 %), while MALT lymphoma of the thyroid (4 %) and the breast (4 %) are relatively rare¹.

Predisposing factors for the development of MALT lymphoma

Pioneering work performed by Peter Isaacson and co-workers has suggested MALT lymphoma to be an antigen-driven disease (for summary see 2, 3). In fact, the discovery of a causative role of *Helicobacter pylori* (HP) and later also of *Helicobacter Heilmannii* in the development of gastric MALT lymphoma and the consecutive demonstration of responsiveness of early stage disease to antibiotic eradication of HP has revolutionized current treatment approaches. Given the histopathological similarity between gastric MALT lymphoma and those diagnosed in other localizations, it is tempting to speculate that these might also be antigen-driven.

As opposed to the gastric environment, which is suitable only for highly specialized infective agents such as HP and therefore allows for their relatively easy identification, the search for other antimicrobial causes of MALT lymphoma has been more difficult. Regression of non-gastrointestinal MALT lymphomas has anecdotally been reported following eradication of *H. pylori*, but the results beg the question whether these findings do reflect unspecific antimicrobial action of the regimen against as yet undetermined bacteria rather than an association with *H. pylori*.

One of the longest known associations is between infection with *Borrelia burgdorferi* and cutaneous MALT lymphoma⁴. More recently, data on a causative

role of *Chlamydia psittaci* in the development of ocular MALT lymphoma have been published. In a study reported by Ferreri and coworkers⁵, 40 samples from patients with ocular adnexal lymphomas (including 24 cases with MALT lymphoma) were assessed for the presence of DNA from *C. psittaci*, *trachomatis* and *pneumoniae* using PCR. Twenty-one out of these 24 MALT lymphoma patients were positive for *C. psittaci* (87.5 %) in the lymphoma samples, whereas none were positive for *C. trachomatis* and *C. pneumoniae*. A causative role of the agent was also shown by objective response of the lymphoma in 2/4 patients undergoing antibiotic therapy with doxycycline including one patient with MALT lymphoma. In view of this, further studies are needed to assess the impact of anti-chlamydial therapy in patients with ocular adnexal MALT lymphomas.

In addition to infectious agents, the high risk of patients suffering from various autoimmune conditions for the development of lymphomas has been noted. Especially in case of autoimmune thyroiditis and Sjögren's syndrome (SS), a high risk for the development of MALT lymphomas in the primarily affected organs has been demonstrated. Accordingly, a 70 fold increased risk for thyroid MALT lymphoma and a 44 fold increased risk for parotid lymphoma is being attributed to autoimmune thyroiditis and SS^{6,7}, respectively. This is again in keeping with the MALT lymphoma concept formulated by Isaacson, that acquired MALT developing in the context of chronic infection or antigenic stimulation may give rise to MALT lymphoma following accumulation of various genetic events. In terms of treatment, however, this association currently does not have an impact on clinical management of the lymphoma, as both conditions are virtually intractable apart from symptomatic management of patients and thus do not allow permanent removal of the immunologic stimuli as opposed to eradication of antibiotic agents. Nevertheless, the high risk of developing MALT lymphomas should be kept in mind in such patients.

Clinical aspects and treatment of non-gastrointestinal MALT lymphoma

In addition to the similar pathological features of gastric MALT lymphoma and MALT lymphomas of non GI-origin, both appear to be characterized by a relatively indolent clinical course. In an analysis of 108 patients, Thieblemont and coworkers⁸ found a similar median overall survival for gastric vs non-GI MALT lymphomas, but a significantly shorter time to progression (4.9. years vs 8.9 years) in the latter. Nevertheless, the pattern of dissemination appears to be different, and recent data have suggested that this shorter time to progression reflects the higher rate of dissemination, which might be clinically inapparent upon diagnosis or simply may have been overlooked without vigorous and extensive staging. Data from our own institution have demonstra-

ted multiorgan involvement in about 50 % of non GI-MALT lymphomas as opposed to 30 % in gastric MALT lymphoma⁹. Similar figures have been reported by Thieblemont et al¹⁰, who have also found dissemination of nongastric MALT lymphoma in 48 % of patients. As a consequence, patients should undergo staging including imaging of the salivary and lacrimal glands, ear-nose and throat investigation, gastroscopy/endosonography with multiple biopsies, CT-scan of thorax and abdomen, colonoscopy and bone marrow biopsy in order to correctly assess the clinical stage before initiation of treatment⁹.

In non-GI MALT lymphoma, non-surgical management has been more widely applied for initial management as opposed to gastric lymphoma, where surgery has been a mainstay of treatment before application of antibiotic treatment or radiation³. Again, prospective data are lacking, but in a large retrospective series on extraintestinal MALT-type lymphoma, Zinzani and coworkers have analysed 75 patients undergoing different forms of therapy including radiation, local application of interferon- α and chemotherapy, while only four patients were treated with resection alone¹¹. The reported response rate was 100% (79% complete and 21% partial remission), and all except two patients, who died of unrelated causes, were alive after a median follow-up time of 47 months. In an analysis of primary ocular adnexa lymphomas, 11/19 patients were found to have MALT-type lymphoma¹², 8 of whom were treated with radiation only, while two were only resected and one was given chemotherapy. Both surgically treated patients, however, relapsed after 54 and 62 months, respectively, while the other patients remain in complete remission after a follow-up time between 24-140 months.

Taken together, radiotherapy has been the most widely applied form of treatment for patients with localized MALT lymphoma of extragastrointestinal origin. Apparently, this practice results in excellent local control of the disease, as has consistently been shown by Tsang and coworkers¹³. Data from our own institution, however, have shown a high rate of systemic relapse in patients with MALT lymphoma of the head-and-neck area following local therapy, with 39% of patients relapsing after a median follow-up of 46 months.

In view of the common mucosal immunity and the high rate of relapses (sometimes even after decades), systemic approaches including application of the monoclonal antibody rituximab or chemotherapy are being investigated at the moment. In a recent report, application of fludarabine containing regimens has resulted in complete remission in all 31 patients with nongastrointestinal MALT lymphomas in stage I. While these findings are encouraging, a note of caution should be added due to the relatively short median follow-up time of 3 years. Nevertheless, systemic approaches should further be investigated as front-line management of this disease.

References

1. Isaacson PG, Müller-Hermelink HK, Piris MA, Berger F, Nathwani BN, Swerdlow SH, et al. Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma). In: Jaffe ES; Harris NL SHaVJ, ed. Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press; 2001:157-160.
2. Isaacson PG. Gastric MALT-lymphoma: from concept to cure. *Ann Oncol* 1999;10:637-45.
3. Raderer M, Isaacson PG. Extranodal lymphoma of MALT-type: Perspective at the beginning of the 21st century. *Expert Rev Anticancer Ther* 2001;1:53-64.
4. Cerroni L, Zöchling N, Putz B, Kerl H. Infection by *Borrelia burgdorferi* and cutaneous B-cell lymphoma. *J Cutan Pathol* 1997;24:457-61.
5. Ferreri AJM, Guidiboni M, Ponzoni M, De Conciliis C, Dell'Oro S, Fleischhauer K, et al. Evidence for an association between *Chlamydia psittaci* and ocular adnexal lymphoma. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:586-94.
6. Isaacson PG, Norton AJ. Malignant lymphoma of the thyroid gland. In: Isaacson PG, Norton AJ, editors. *Extranodal Lymphomas*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994; p. 103-16.
7. Isaacson PG, Norton AJ. Malignant lymphoma of the salivary glands. In: Isaacson PG, Norton AJ. *Extranodal Lymphomas*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994; p. 67-84.
8. Thieblemont C, Bastion Y, Berger F, Rieux C, Salles G, Dumontet C, et al. Mucosa associated lymphoid tissue gastrointestinal and nongastrointestinal lymphoma behavior: analysis of 108 patients. *J Clin Oncol* 1997;15:1624.
9. Raderer M, Vorbeck F, Formanek M, Österreicher C, Valencak J, Penz M, et al. Importance of extensive staging in patients with mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)-type lymphoma. *Br J Cancer* 2000;83:454-7.
10. Thieblemont C, De la Fourchadiere A, Coiffier B. Nongastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Clin Lymphoma* 2003;3:212-24.
11. Zinzani P, Magagnoli M, Galieni P, Martelli M, Poletti V, Zaja F, et al. Nongastrointestinal low-grade mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: analysis of 75 patients. *J Clin Oncol* 1999;17:1254-8.
12. Baldini L, Blini M, Guffanti A, Fossati V, Colombi M, La Targia ML, et al. Treatment and prognosis in a series of primary extranodal lymphomas of the ocular adnexa. *Ann Oncol* 1998;9:779-81.
13. Tsang RW, Gospodarowicz MK, Pintilie M, Wells W, Hodgson DC, Sun A, et al. Localized mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma treated with radiation therapy has excellent clinical outcome. *J Clin Oncol* 2003;21:4157-64.
14. Wenzel C, Fiebigger W, Dieckmann K, Formanek M, Chott A, Raderer M. Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue of the head and neck area: High rate of disease recurrence following local therapy. *Cancer* 2003;97:2236-41.

LINFOMAS CEREBRALES PRIMARIOS

F. GRAUS

Servicio de Neurología. Hospital Clínic. Barcelona.

Los linfomas cerebrales primarios (LCP) representan el 1-2 % de los tumores cerebrales y menos del 2 % de los linfomas de origen extraganglionar. El LCP por definición se localiza en el sistema nervioso, generalmente es intraparenquimatoso, y no se encuentra en el estudio de extensión inicial, ni durante la mayor parte de su evolución, ninguna afectación extraneural concomitante. Aunque el LCP aparece en pacientes sin ningún factor de riesgo aparente, los pacientes inmunodeprimidos tienen un riesgo elevado de desarrollar LCP. En pacientes con sida la incidencia de LCP es del 2-4%, suele aparecer en estadios finales de la enfermedad cuando el recuento de linfocitos CD4+ es inferior a 100.

Etiología y patogenia

Los LCP tienen unas características anatomopatológicas, homogéneas, la mayoría son de grado intermedio o alto de malignidad y tienen fenotipo B. Se ha relacionado la presencia del LCP con la infección por el

virus de Epstein-Barr (VEB). Mientras que la frecuencia de expresión de ARN de VEB es prácticamente del 100% en LCP de pacientes con sida, la frecuencia es prácticamente nula en LCP de pacientes no inmunodeprimidos. Estos resultados sugieren que la patogénesis de los LCP en pacientes con sida podría ser diferente del LCP de pacientes sin inmunodepresión.

Clínica

El cuadro clínico de los pacientes con LCP dependerá de la localización, que suele afectar la sustancia blanca de los hemisferios cerebrales y las áreas periventriculares. Los LCP se presentan como masas intraparenquimatosas en el 80-90% de los casos. Las lesiones son casi siempre supratentoriales, pero también afectan el tronco cerebral. El paciente puede presentar diversos síndromes neurológicos, que aparecen de manera aislada o simultáneamente, como hipertensión intracraneal, déficit focales, trastornos mentales y crisis convulsivas. Cerca del 10% de los LCP infiltran de manera difusa la región subependimaria de los ventrículos laterales. Esta localización es muy sugestiva de LCP. El cuadro clínico se manifiesta como un déficit cognitivo, trastornos de la deambulación y del nivel de conciencia o, más raramente, hipertensión intracraneal.

La presentación del LCP como linfomatosis meníngea es excepcional y representa menos del 1% de todos los LCP. La leptomeningitis linfomatosa es casi siempre secundaria a un linfoma no hodgkiniano (LNH) sistémico o a la diseminación de un LCP inicialmente intraparenquimatoso o periventricular. Por este motivo, el diagnóstico de linfoma meníngeo primario sólo puede aceptarse después de confirmar por tomografía computarizada (TC) cerebral la ausencia de lesiones linfomatosas y de realizar un exhaustivo estudio de extensión en el que no se detecte LNH sistémico y éste no aparezca durante el seguimiento del enfermo. La clínica de los LNH meníngeos primarios es indistinguible de la que se registra en la infiltración meníngea por un LNH sistémico. Suele haber afección de los nervios craneales, hipertensión intracraneal o alteraciones cognitivas, confusión o trastornos psiquiátricos. La extensión espinal puede ocasionar un síndrome de la cola de caballo, que a veces es la única manifestación clínica del linfoma.

Diagnóstico y estudio de extensión

El estudio neurorradiológico no aporta imágenes diagnósticas de LCP, pero algunas son muy sugestivas. En la TC o resonancia magnética (RM) sin contraste el LCP se presenta como una (70% de casos) o varias lesiones (30%) circunscritas, de densidad homogénea, con poco efecto de masa en relación con el volumen del tumor, y rodeadas de poco edema. Tras la administración de contraste el tumor capta de manera intensa y uniforme, con bordes bien definidos, de modo similar a lo que ocurre en las metástasis. Esta apariencia radiológica descrita en los LCP

no es constante, y en pacientes con sida el patrón es más variable: con mayor frecuencia las masas presentan necrosis en su interior. En la forma de presentación periventricular se observan en la RM lesiones difusas hipodensas que infiltran de forma irregular las estructuras periventriculares, sobre todo de las astas frontales, de manera bilateral y simétrica. La lesión ocasiona un edema mínimo y se hace más manifiesta después de la administración de contraste.

Dada la falta de especificidad de los estudios neurorradiológicos, el diagnóstico de LCP debe efectuarse mediante biopsia o a través del estudio citológico del líquido cefalorraquídeo (LCR). En la actualidad la biopsia estereotáxica guiada por TC permite obtener tejido de áreas cerebrales previamente inaccesibles y constituye la prueba diagnóstica de elección. Si no existen contraindicaciones, el estudio del LCR puede poner de manifiesto células linfomatosas, lo que evita la práctica de una biopsia cerebral.

Una vez confirmado el diagnóstico de LCP debe realizarse un estudio de extensión minucioso, tanto para conocer la extensión local del LNH como para excluir la existencia de un LNH sistémico. Así, procede efectuar un examen del LCR, siempre que no existan contraindicaciones, y si las hay, debe analizarse con detalle la RM con gadolinio para detectar captación en las meninges. Las exploraciones obligadas en el estudio de extensión del LNH son el estudio oftalmológico con lámpara de hendidura, la TC torácica y abdominal y la biopsia de médula ósea.

Factores pronósticos

La baja incidencia del LCP ha limitado la publicación de series amplias donde se puedan analizar la presencia de factores pronóstico. En un estudio retrospectivo de 378 pacientes con LCP tratados en 23 centros diferentes se identificó como predictores de mortalidad la edad superior a 60 años, un estado funcional superior a 1 de la escala de la ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group), niveles altos de lactato deshidrogenasa sérica o de proteínas en el LCR, y afectación de estructuras profundas del cerebro. Con estas variables se diseñó una escala pronóstica en la que el valor 0 significaba el no tener ningún predictor favorable de mortalidad y el valor 5 el tenerlos todos. Al aplicar el modelo al subgrupo de 105 pacientes que recibieron quimioterapia basada en dosis altas de metotrexato se vio que los pacientes con valores pronósticos de 0-1 tenían una supervivencia media actuarial a los 2 años del 80%, aquellos con valores de 2-3 del 48% y los de peor pronóstico (valores de 4-5) del 15%.

Las limitaciones de esta escala pronóstica es la inclusión de valores de LCR que pueden faltar en pacientes en los que la punción lumbar está contraindicada. En otro estudio de 77 pacientes tratados con el mismo protocolo se identificó como predictores de mortalidad la edad superior a 60 años, un estadio funcional superior a 1 de la escala de ECOG y la pre-

sencia de linfoma multifocal o con diseminación meníngea. La combinación de estas 3 variables permitió elaborar una escala de 0 (ningún predictor desfavorable) a 3 (todos los predictores desfavorables) con predicciones de supervivencia similares a los del estudio previo (Bessell et al, en prensa).

Tratamiento

El LCP es un tumor maligno que sin tratamiento produce la muerte del paciente en pocas semanas. Los corticoides son citolíticos para el LCP y pueden causar una respuesta parcial o total hasta en el 40% de los pacientes no inmunodeprimidos. La respuesta sin embargo, es de poca duración y no tiene efecto curativo. La radioterapia holocraneal era hasta la última década el tratamiento estándar de los LCP. La sobrevida mediana de los pacientes no inmunodeprimidos tratados con radioterapia es de unos 11 meses con una tasa de sobrevida a los 2 años del 35%. Estos resultados son claramente inferiores en los pacientes con LCP y sida, ya que éstos suelen morir antes de infecciones oportunistas intercurrentes.

Aunque no ha habido estudios aleatorizados, diversos estudios en fase II han combinado tratamientos con quimioterapia y radioterapia con resultados claramente superiores a los de la radioterapia sola. Estos estudios han permitido llegar a las siguientes conclusiones:

1. Los esquemas tradicionales de tratamiento de linfoma sistémico (ciclofosfamida, adriamicina, vincristina, prednisona, CHOP) no son efectivos al no pasar la barrera hematoencefálica. Aunque el tratamiento con CHOP produce una buena respuesta inicial al estar la mayoría del tumor no protegido por la barrera hematoencefálica, como lo demuestra la intensa captación de contraste, los siguientes ciclos de CHOP no consiguen erradicar los restos del linfoma. En un estudio aleatorizado, la adición de ciclos de CHOP tras la radioterapia no fue superior al tratamiento aislado con radioterapia.

2. Los fármacos más activos para el tratamiento del LCP en pacientes no inmunodeprimidos son el metotrexato a dosis mínimas de 1 g/m² y el arabinósido de citosina (Ara-C) en dosis de 3 g/m². Los regímenes que incluyen estos fármacos junto con radioterapia consiguen una tasa de respuestas cercana al 80% y una sobrevida media de 3 años. La dosis de metotrexato ideal sigue siendo un tema de debate. Es importante que la dosis consiga unos niveles suficientes de fármaco en el parénquima cerebral y LCR durante un tiempo suficiente. Para ello es importante administrar la dosis en un período no inferior a 4 h. Aunque la dosis aconsejable para alcanzar unos niveles de seguridad es de 3 g/m², esquemas con dosis inferiores, pero siempre superiores a 1 g/m², han demostrado tasas de respuesta similares. Este dato es importante al considerar que más del 50% de los pacientes con LCP tienen una edad superior a 60 años y su filtrado glome-

ular puede estar alterado con el consiguiente aumento de toxicidad al usar dosis muy altas de metotrexato.

Otro aspecto no resuelto es demostrar si el tratamiento aislado con metotrexato produce unos resultados similares a regímenes de poli-quimioterapia. La tendencia es usar el metotrexato en combinación con otros fármacos liposolubles como nitrosureas o tio-tepa o fármacos en altas dosis para pasar la barrera hematoencefálica como el Ara-C siguiendo el razonamiento que el tratamiento con monoterapia es poco probable que cure el LCP. En la actualidad no hay ningún esquema de poli-quimioterapia que se haya demostrado superior. Se está valorando en hacer un estudio aleatorizado para comparar el tratamiento en monoterapia con metotrexato a dosis de 8 g/m² con un esquema de metotrexato a dosis de 3 g/m² asociado a Ara-C, lomustina (CCNU) y procarbazona (esquema del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center) sin embargo, la baja incidencia del LCP ha limitado la puesta en práctica de este estudio.

3. La adición de quimioterapia intratecal no parece mejorar la tasa de respuestas completas ni la sobrevida. Aunque no hay estudios comparativos. El análisis retrospectivo de las series que han complementado el tratamiento sistémico con metotrexato intratecal no demuestra una superioridad clara frente a estudios que no usaron esta modalidad terapéutica. El tratamiento intratecal se ha dado a través de un reservorio de Omayá. El tratamiento vía reservorio es más práctico para el paciente y asegura una mejor distribución del fármaco en el LCR, sin embargo, la colocación del reservorio puede ser difícil en pacientes con ventrículos pequeños y no está exento de complicaciones sobre todo en centros con poca experiencia en la colocación de este reservorio.

4. En pacientes mayores de 60 años el riesgo de neurotoxicidad por la combinación de metotrexato y radioterapia es muy alto y se desaconseja el hacer radioterapia si el linfoma está en remisión al acabar la radioterapia. Sin embargo, esta actitud disminuye de forma clara el período libre de recaída de la enfermedad. En pacientes más jóvenes el tratamiento con radioterapia probablemente es importante para asegurar la curación del LCP: en un estudio retrospectivo, los pacientes de menos de 60 años que recibieron tras la quimioterapia una dosis de radioterapia de 36 Gy tuvieron una tasa de recaídas significativamente superior a los que recibieron 54 Gy sin que se apreciase en este grupo de pacientes una mayor incidencia de neurotoxicidad.

Bibliografía

- Basso U, Brandes AA. Diagnostic advances and new trends for the treatment of primary central nervous system lymphoma. *Eur J Cancer* 2002; 38:1298-312.
- Baumgartner JE, Rachlin JR, Becstead JH, Meeker TC, Levy RM, Wara WM, et al. Primary central nervous system lymphomas: Natural history and response to radiation therapy in 55 patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J Neurosurg* 1990;73:206-11.

- Bessell EM, López-Guillermo A, Villa S, et al. Importance of radiotherapy in the outcome of patients with primary CNS lymphoma: An analysis of the CHOD/BVAM regimen followed by two different radiotherapy treatments. *J Clin Oncol* 2002;20:231-6.
- DeAngelis LM, Seiferheld W, Schold C, et al. Combination chemotherapy and radiotherapy for primary central nervous system lymphoma: Radiation therapy oncology group study 93-10. *J Clin Oncol* 2002;20:4643-8.
- Ferreri AJM, Abrey LE, Blay JY, et al. Summary statement on primary central nervous system lymphomas from the eighth international conference on malignant lymphoma, Lugano, Switzerland, June 12 to 15, 2002. *J Clin Oncol* 2003;21:2407-14.
- Ferreri AJM, Blay JY, Reni M, et al. Prognostic scoring system for primary CNS lymphomas: The international extranodal lymphoma study group experience. *J Clin Oncol* 2003;21:266-72.
- Ferreri AJM, Reni M, Villa E. Therapeutic management of primary central nervous system lymphoma: Lessons from prospective trials. *Ann Oncol* 2000;11:927-37.
- Hochberg FH, Miller DC. Primary central nervous system lymphoma. Review article. *J Neurosurg* 1988;68:835-53.
- Nakamura M, Kishi M, Sakaki M, et al. Novel tumor suppressor loci on 6q22-23 in primary central nervous system lymphoma. *Cancer Res* 2003;63:737-41.
- Nelson FD, Martz KL, Bonner H, Nelson JS, Newall J, Kerman HD, et al. Non-Hodgkin's lymphoma of the brain: Can high dose, large volume radiation therapy improve survival?. Report of a prospective trial by the Radium Therapy Oncology Group. *Int J Radiat Biol Phys* 1992;23:9-17.

PRIMARY CENTRAL NERVOUS SYSTEM LYMPHOMAS: CLINICO-PATHOLOGICAL CHARACTERISTICS AND THERAPEUTIC MANAGEMENT OF RARE ENTITIES

A.J.M. FERRERI¹, R. STEFANO¹, P.A. SCALFARO¹, S. DELL'ORO¹, N. FRUNGILLO¹, L. POLITI², A. FRANZIN³, M. FOPPOLI⁴, M. PONZONI⁵ AND M. RENI¹

Dept of ¹Radiochemotherapy, ²Neuroradiology, ³Neurosurgery, ⁴Internal Medicine, and ⁵Pathology. San Raffaele H Scientific Institute. Milan. Italia.

Abstract

Primary central nervous system lymphomas (PCNSL) are aggressive malignancies arising in an anatomical site with certain structural, biological and immunological characteristics and exhibit one of the worst prognoses among non-Hodgkin lymphomas. PCNSL constitute a group of heterogeneous malignancies, and clinical characteristics and therapeutic guidelines reported in the related literature should not be homogeneously applied to all lymphoproliferative disorders primarily arising in the CNS. Differences among some CNS lymphomas could be due to special characteristics of the site where the lymphoma arises or to the particular natural history of some lymphoma entities. This special subgroup of PCNSL is constituted by rare forms of a rare malignancy, which are associated with distinct clinical courses, and, importantly, may require different therapeutic approaches. Literature regarding these rare forms of PCNSL is mostly constituted by case reports and small case series, and anecdotal evidence results in a rele-

vant number of management uncertainties. This paper summarizes clinical and therapeutic aspects of the most relevant uncommon forms of PCNSL.

The "common form" of primary CNS lymphoma

Primary central nervous system lymphomas (PCNSL) are rare and aggressive malignancies arising within and confined to the CNS. PCNSL represent 4% of all primary brain tumors, 4-6% of extranodal lymphomas; globally, their incidence has raised in the past 2 decades, both in immunocompromised and immunocompetent individuals, mostly in HIV-negative individuals over 50 years of age¹. PCNSL are more common among individuals older than 50 years, with a slight prevalence among males; 5-15% of PCNSL patients have a history of a previous cancer. At presentation, PCNSL patients usually display a poor performance status, while systemic symptoms are rare ($\leq 2\%$ of cases)². Presenting symptoms consist of non-specific motor and/or sensory focal deficit in approximately 50% of cases; cognitive and personality changes, headache and others signs of intracranial hypertension such as nausea, vomiting and papilledema are frequently observed³. PCNSL exhibit one of the worst prognoses among non-Hodgkin lymphomas, and the best treatment modality has not been yet identified. In most prospective trials, general criteria for treatment of aggressive lymphoma have been adopted, choosing primary chemotherapy followed by radiotherapy as therapeutic modality⁴. This strategy produced a 5-yr survival of 22-40% in comparison to the 3-26% reported with radiotherapy alone⁴. Systemic high-dose methotrexate is the most effective drug, producing a response rate of 52-100% and a 2-yr OS of 58-72%, while any regimen without this drug comprehensively performed no better than radiotherapy alone⁴. To date, the addition of other drugs at conventional doses has not consistently improved outcome. In fact, the prognosis of PCNSL remains poor with a great number of local relapses that, after a brief course, inevitably leads to patient death.

Actually, PCNSL constitute a group of heterogeneous malignancies, and the above-summarized clinical characteristics and therapeutic guidelines should not be homogeneously applied to all lymphoproliferative disorders arising in the CNS. In fact, some CNS lymphomas display particular differences with respect to the majority of PCNSL, which could be due to the distinctive characteristics of the site where the lymphoma arises or to the particular natural history of some lymphoma categories. Literature regarding these extremely rare forms of PCNSL is mostly constituted by case reports and small case series. This paper is an effort to review available information on clinical and therapeutic aspects of the most relevant uncommon forms of PCNSL, which requires a separate analysis with respect to the "common form" of PCNSL.

Rare lymphoma localizations in the CNS

Most PCNSL arise in the cerebral parenchyma, presenting as a single lesion, badly delimited, more frequently localized in the frontal lobe and periventricular structures, infiltrating the corpus callosum and the basal ganglia, and with variable perilesional edema². Multiple brain lesions are observed in 30-40% of immunocompetent patients². Lymphomas arising in the eyes, leptomeninges and spinal cord constitute rare forms of PCNSL, which are associated with distinctive clinical behavior and, most importantly, require peculiar therapeutic approaches.

Intraocular lymphoma

Intraocular lymphoma (IOL) is the most common among the rare forms of PCNSL; comprehensively, ocular involvement is observed in 5-20% of PCNSL^{5,6}. Even if ocular disease can be the sole expression of lymphoma, in 80-90% of cases, ocular involvement is followed, after weeks or months, by the onset of brain lesions⁷. IOL can also occur as an isolated recurrence after parenchymal PCNSL. Lymphomatous cells are able to infiltrate the vitreous humor, retina and choroid; bilateral involvement is observed in 80% of cases^{6,8}. Clinical characteristics of patients with IOL are similar to those of the rest of PCNSL (table 1); however, a more common association with female gender, multifocal disease, systemic symptoms, and CSF dissemination has been reported^{6,9}. The most common presenting symptoms are unspecific visual symptoms such as floaters or campimeter

deficit, with a clinical suspicion of nonspecific uveitis refractory to topical or systemic corticosteroids^{5,10}. The use of slit-lamp examination, indirect ophthalmoscopy and ophthalmic ultrasonography during lymphoma staging allows the detection of ocular disease in a 5% of asymptomatic cases¹¹. The suspicion of the infiltration of the vitreous humour should be confirmed through vitrectomy, which allows cytological diagnosis in most cases. Like in others lymphomatous lesions, the treatment with steroids before acquisition of pathological material may decrease the diagnostic yield of vitrectomy.

No histopathological differences between IOL and other PCNSL exist, being large B-cell lymphoma the most common histotype. The recognition of lymphoma cells by routine cytology looking at the cellular morphology, with or without immunophenotyping, generates a strong suspicion of the diagnosis¹². Immunohistochemistry and/or flow cytometry are needed to characterize cellular phenotype and to confirm the diagnosis. Immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements analyzed using PCR techniques is detected in nearly all of the cases, and may be useful in confirming the monoclonal nature of the disorder¹³. Intravitreal levels of IL-10 and IL-6 are, probably, adjuncts for B-cell IOL diagnosis¹³. Interestingly, a role for specific infectious agents in the pathogenesis of some cases of IOL has been recently hypothesized; DNA of Human Herpes Virus 8, Epstein-Barr virus and *Toxoplasma gondii* has been detected in 19, 10 and 13% of cases, respectively¹³.

The best treatment for IOL remains to be defined, and the lack of a routinely assessment and definition of therapeutic response and failure constitutes an important pitfall in the estimation of treatment efficacy. In the past, patients with symptomatic disease were treated with radiotherapy alone, but nearly all of the patients developed early CNS progression and died. A few case reports and small retrospective studies alluded to the efficacy of chemotherapy, and anecdotal promising results using high-dose cytarabine, high-dose methotrexate, procarbazine, and nitrosoureas have been reported^{14,15}. The efficacy of these cytostatics is dependent on intraocular pharmacokinetics, which are not well understood. Preliminary data¹⁶ suggest that micromolar concentrations of methotrexate are achieved in the aqueous and vitreous humors when the drug is given at dose of 8 g/m². Nevertheless, a high rate of persistence of ocular disease have been reported in patients treated with this strategy, which could be explained by the fact that MTX concentration in the vitreous humor, the main site of IOL, is usually lower than those obtained in the anterior chamber of the eyes¹⁶.

Better disease control combining ocular irradiation to high-dose methotrexate based chemotherapy has been reported⁹. The irradiation of the posterior two thirds of the ocular globes with a dose between 35 and 45 Gy has been recommended, and more recent ex-

Table 1. Patients' characteristics of IOL patients. Comparison with other PCNSL forms

	IOL	Other PCNSL	p
Age			
median	54	58	
range	16-74	14-77	0.61
Males	68%	62%	0.58
Performance status (ECOG criteria)			
0-1	30%	34%	
2-4	70%	66%	0.68
Systemic symptoms	9%	0%	0.007
Prior cancer	5%	5%	0.86
Histotype			
Indolent lymphoma	0%	1%	
Diffuse large B-cell lymphoma	91%	78%	
Unclassified	9%	22%	
T-cell immunophenotype	0%	2%	0.84
Elevated LDH serum level	50%	37%	0.34
Positive CSF cytology	33%	11%	0.009
High CSF protein concentration	43%	68%	0.07
Multiple lesions	36%	36%	0.99
Involvement of deep structures ^a	27%	32%	0.62

^a Cases of involvement of corpus callosum and/or basal ganglia and/or brain stem and/or cerebellum.

LDH: lactate dehydrogenase; CSF: cerebrospinal fluid. Updated from Ferreri AJM, et al. Ann Oncol 2002⁹.

periences suggest the irradiation of the entire orbit up to 20 Gy, followed by additional 10 Gy after shielding the anterior chamber of the eyes. Even in the presence of a monolateral evident disease, both eyes should be irradiated considering the high frequency of bilateral microscopic involvement. Ocular actinic complications of radiotherapy, including cataract, dry eyes, punctate keratopathy, retinopathy, and optic atrophy have been described, but their actual incidence did not emerge because of the short follow-up of published series. Importantly, the enrolment of patients with IOL in trials assessing the activity or efficacy of chemotherapy as exclusive treatment should be critically discussed⁹.

The poor results obtained with conventional strategies have induced investigators to search on new therapeutic approaches. Intriguing results with high-dose chemotherapy supported by autologous peripheral blood stem-cell transplantation¹⁷ and intravitreal chemotherapy¹⁸ in patients with relapsed or refractory IOL have been reported. Some protocols using intravitreal injections of MTX, with or without thiotepa, are currently ongoing. A weekly intravitreal injection of 400 $\mu\text{g}/0.1$ ml of methotrexate, for 4 weeks, and once a month thereafter, has been proposed, with encouraging results and reduced morbidity¹⁸. This experimental strategy may become a valid alternative in IOL.

Leptomeningeal lymphoma

Leptomeningeal lymphoma without a concomitant parenchymal lesion constitutes less than 10% of PCNSL². Meningeal infiltration due to the dissemination of lymphomatous cells through the CSF from the subependymal tissues is a more common feature in PCNSL¹⁹. In fact, lymphomatous cells are detected by CSF cytology examination in 0-50% of PCNSL⁴, while autoptic series have demonstrated the presence of meningeal dissemination in 100% of cases. Most leptomeningeal lymphomas are constituted by large B-cells. Only a few cases of indolent lymphomas of leptomeninges have been reported; such cases are mostly represented by marginal zone B-cell lymphomas of MALT-type (see below). A case represented, either by morphology and immunophenotype, by a small B-cell lymphoma has been recently diagnosed at our Institution (Ponzoni M., unpublished data). Presenting symptoms in leptomeningeal lymphomas are variegated, depending on the involved site. Increased intracranial pressure, multifocal cranial neuropathies, signs of multilevel root involvement, lumbosacral radiculopathies with radicular pain, increase of intrarachidian pressure, and confusion have been reported. Neuroradiological features are not pathognomonic and radiological suspicion is sometimes delayed (fig. 1); meningioma is the main differential diagnosis²⁰.

The alterations of CSF, even if not specific, are very useful for diagnostic orientation. In most cases, protein concentration is increased, while glucose concentration is usually normal, being reduced only in



Figure 1. MRI showing leptomeningeal lymphoma of the left parieto-temporal region infiltrating the skull and the surface of the brain. The lesion was entirely resected because the main clinical suspicion was meningioma. Histological diagnosis was diffuse large B-cell lymphoma.

the case of massive meningeal infiltration. CSF cytology examination has a fundamental value in the staging for its potential prognostic and therapeutic implications. Unfortunately, it is not possible to identify lymphomatous cells in every case and sometimes not even in the presence of an extended meningeal infiltration. Immunocytochemical analysis and detection of immunoglobulin gene rearrangements by PCR technique have been retained useful in the diagnosis of lymphomatous meningitis when routine cytological examination is inconclusive²¹. Tumor markers, including lactate dehydrogenase isoenzymes, B-galacturonidase, and β_2 -microglobulin, may provide indirect evidence of leptomeningeal lymphoma. In some cases with normal features in the CSF, leptomeningeal biopsy is necessary for diagnosis.

With a few exceptions, leptomeningeal lymphoma is reported to be associated with a poor survival (median < 6 months)^{22,23}. Adequate treatment of leptomeningeal lymphoma may be achieved by high-dose systemic chemotherapy or by intrathecal chemotherapy²⁴. Some authorities have suggested the concomitant use of both systemic and intrathecal chemotherapy in patients with positive CSF cytology examination. Therapeutic methotrexate concentrations can be achieved in CSF using intravenous doses ≥ 3 g/m², and preliminary data suggest that systemic high-dose methotrexate is able to clear CSF from neoplastic cells^{25,26}. On the other hand, drug delivery by using Ommaya's reservoir permits a better drug distribution in the subarachnoid space. However, the indications and efficacy of intrathecal chemotherapy are debatable considering that its efficacy has not been prospectively assessed and the results of a recent analysis of a large multicentre series suggesting that patients with PCNSL do not benefit

from intrathecal drug delivery². Moreover, the theoretical advantage of intraventricular drug administration probably does not outweigh the additional risk of infective complications associated with Ommaya reservoir implantation and repeated intraventricular injections and the increased risk of neurotoxicity and chemical meningitis associated with this strategy². Radiation therapy, such as cranio-spinal irradiation, seems to play a palliative role in leptomeningeal lymphomas since it destroys a considerable amount of hemopoietic bone marrow reserve, making troublesome any subsequent chemotherapy.

Spinal cord lymphoma

Primary lymphomas of the spinal cord present the greatest diagnostic difficulties among PCNSL²⁷. These lymphomas often arise in the upper thoracic or lower cervical regions of the spinal cord. Presenting symptoms are protean, depending on the spinal cord level involved. Patients generally complain radicular symptoms, pain in the legs, a sensory level, and motor or bladder disturbances. Myelography shows a spinal cord widening. MRI usually discloses hyperintense signals on T2-weighted and homogeneous enhancement after administration of gadolinium on T1-weighted images²⁷. Increased CSF protein concentration is a common feature. Lymphomas arising in the spinal nerves and ganglia ("neurolymphomatosis"), cauda equina and the sciatic nerve are extremely rare and should be distinguished from the neural infiltration by a systemic lymphoma. Intramedullary lymphoma should be considered in the differential diagnosis of other spinal cord tumors.

Timely histological diagnosis and treatment are essential to achieve recovery of neurological function, which is strongly conditioned by pre-treatment neurological status. Prognosis of patients with spinal cord lymphoma is very poor mainly due to delayed diagnosis. Similarly to other PCNSL, corticosteroids and radiotherapy are associated with lymphoma regression

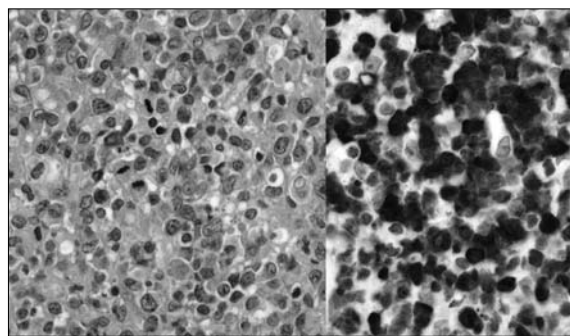


Figure 2. Anaplastic large T-cell lymphoma of the brain (Hematoxylin & eosin; left side). Lymphoma cells show an intense nuclear reactivity for ALK-1 protein (right side). This feature is helpful in the differential diagnosis with T-cell PCNSL, actually being critical for the definition of that particular type of lymphoma colloquially named as "ALKoma".

and clinical improvement. Only sparse data are available regarding the efficacy of chemotherapy in these lymphomas. However, there is no evidence suggesting that spinal cord lymphomas should be treated in a different way with respect to other PCNSL.

Rare lymphoma categories in the CNS

Most of PCNSL are diffuse large B-cell lymphomas. Usually, lymphoma cells grow around the perivascular spaces and invade the surrounding brain parenchyma. Lymphoma cells display mature B-cell phenotype (i.e. CD20 positive) and exhibit a high proliferation rate (50% of MIB1-positive cells). A reactive perivascular T-cell infiltrate (CD3 positive) is evident in one third of cases (Ponzoni M. Personal communication, Barcelona 2004). In contrast to AIDS patients, PCNSL of immunocompetent individuals do not usually carry EBV-genome sequences or proteins. Much rarer lymphoma categories may primarily arise in the CNS: among others, some high-grade categories, such as anaplastic large cell lymphoma, T-cell lymphomas, or intravascular lymphoma, or indolent categories like marginal zone B-cell lymphoma of MALT-type or immunocytoma, solitary brain plasmacytoma, and Hodgkin's lymphoma.

Anaplastic large cell lymphoma

A few cases of primary CNS anaplastic large-cell lymphoma (ALCL), mostly displaying T-cell immunophenotype, have been reported²⁸. In a few cases, primary CNS ALCL carries the characteristic t(2:5) translocation, which is responsible for the production of the fusion protein ALK-1, which may be detected by immunohistochemistry (fig. 2). The parietal lobe is the most common site of disease, although involvement of more than one lobe is the rule. Meningeal involvement and increased CSF protein level seem to be more common in primary CNS ALCL with respect to the rest of PCNSL, while the elevation of lactate dehydrogenase serum levels is a rather unique finding²⁸.

Similarly to systemic ALCL, a better outcome has been observed in young patients and ALK-1 positive lymphomas²⁹. Even if statements about treatment strategy and prognosis cannot be drawn with sufficient confidence, the overall therapeutic approach to primary CNS ALCL does not seem to differ greatly from the current therapy of PCNSL. Importantly, meningeal prophylaxis with intrathecal chemotherapy or high-dose methotrexate-based chemotherapy appears advisable considering the common involvement of meninges²⁸.

T-cell lymphomas

One to 4% of PCNSL displays T-cell phenotype^{2,30}. For unknown reasons, the incidence of T-cell PCNSL appears to be higher in Japanese patients (8% of cases)³¹. The diagnosis of T-cell PCNSL can be difficult and possibly is overestimated due to the presence of reactive perivascular T-cell in-

filtrate, which could interfere with the interpretation of immunophenotyping. In particular, a diagnosis of T-cell lymphoma should be avoided in the case of pre-biopsy administration of corticosteroids. Since these drugs may cause lysis of malignant B-cells, only reactive T-cells are sampled, thus mimicking either an inflammatory process or a T-cell lymphoma³⁰. In comparison to B-cell PCNSL, patients with T-cell PCNSL have a younger median age and a higher prevalence among males³², but these findings were not definitively established. Half of T-cell PCNSL shows an infratentorial lesion, while leptomeningeal involvement is comparable in B- and T-PCNSL (42 vs. 38%)³⁰. Differences from therapeutic and prognostic points of view between T-cell and B-cell PCNSL remain matter of debate; some authorities have suggested a more favorable course for T-cell lymphomas³². Therapeutic comparisons between these subgroups are difficult because only small and heterogeneously treated, retrospective series are available.

Intravascular lymphoma

Intravascular lymphoma (IVL), formerly known as proliferating angioendotheliomatosis, is an aggressive and disseminated malignancy characterized by widespread proliferating B- or T-cells within the lumen of vessels, with no or minimal involvement of the extravascular parenchyma. IVL affects elderly patients, without gender prevalence, resulting in poor performance status, B symptoms, anemia, and elevated lactate dehydrogenase serum levels. CNS, other than skin, is the most commonly involved organ in IVL diagnosed in Western Countries; while, in Japanese IVL patients, CNS is usually spared³³. Exclusive CNS involvement is, however, an extremely rare condition; systemic dissemination and multiorgan infiltration is the rule³⁴. Clinical presentation is varied, ranging from isolated symptoms, such as fever, pain or local symptoms, to diverse combinations of B symptoms and rapidly progressing manifestations of multiorgan failure due to microvessel occlusion and infarcts. Neurological symptoms are present at diagnosis in 34% of IVL cases diagnosed in Western Countries, they are extremely heterogeneous, and neuroimaging confirms CNS involvement only in half of symptomatic patients³⁴. Histopathological hallmark is the presence of large lymphoid cells within vessel lumina (fig. 3); concomitant extravascular infiltrates of neoplastic lymphocytes are observed in 10% of cases³⁴. The most common laboratory features are: increased serum lactate dehydrogenase (86% of cases) and β_2 -microglobulin (82%) levels, anemia (63%), leukopenia, thrombocytopenia, and elevated erythrocyte sedimentation rate (43%). Altered hepatic, renal or thyroid functional tests are common in disseminated cases.

Comprehensively, IVL patients have usually a worse prognosis, with a 3-year OS of 25%³⁴. Similarly to other aggressive lymphomas, CNS involvement represents

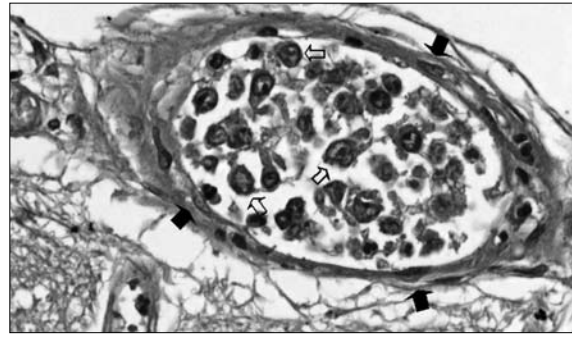


Figure 3. Intravascular lymphoma of the brain (Hematoxylin & eosin). The growth of neoplastic large cells (open arrows) occurs exclusively within blood vessel lumen (endothelial cells; full arrows). Neoplastic lymphocytes show large nuclei with one or more nucleoli and scant cytoplasm; 98% of cases display a B-cell immunophenotype.

a relevant and unfavorable feature in IVL. In spite of some anecdotal encouraging results, most of patients with CNS involvement treated with anthracycline-based chemotherapy relapse and die early. More intensive combinations are needed in cases of IVL with CNS disease, and, consistent with previous reports, drugs with higher bioavailability in the CNS, such as methotrexate or cytarabine, should be included³⁴.

MALT lymphoma

Low-grade marginal zone B-cell lymphoma of MALT-type primarily involving the CNS usually arises in leptomeninges^{35,36}. This is an indolent malignancy affecting females, and usually presenting as a single intracranial lesion (Ann Arbor stage IEA). Its main differential diagnoses are meningioma and, less frequently, acute subdural hematoma^{37,38}. A variety of therapeutic options have been used to treat meningeal MALT lymphomas, including radiotherapy, systemic chemotherapy, and partial surgical excision. It is of high importance to recognize this entity, and to distinguish it from other small B-cell lymphomas considering that, as their counterparts in other organs, meningeal MALT lymphomas have favorable clinical outcomes and excellent long-term prognosis with local therapy alone^{38,39}. As reported for other extranodal MALT lymphomas, consolidation radiotherapy seems to be superfluous after complete surgical resection.

Lymphoplasmacytic lymphoma (immunocytoma)

Immunocytoma has been retained as the 4–13% of all PCNSL⁴⁰. However, most of CNS immunocytoma cases have been reported before the introduction of the WHO classification, where MALT-lymphoma has been formally included. It is likely that a more stringent definition of immunocytoma (i.e. lymphoplasmacytic lymphoma) may not include all the reported cases of PCNSL with “immunocytoma” morphology, which actually may represent examples of MALT lymphomas. Immunocytoma is characterized by a diffuse

growth of small B-cells that share intermediate characteristics between lymphocytes and plasmacells. The phenotype is characteristic of B-cell, but differs from small B-cell lymphoma for its CD5 and CD23 negativity. Similarly to systemic disease, immunocytoma shows an indolent course, but conversely to systemic disease, CNS immunocytoma affects young women. MRI and MR spectroscopy findings indicating the low-grade nature of the malignancy have been reported⁴⁰. In MR spectroscopy, CNS immunocytoma exhibit a lesser degree of metabolite changes and no significant change on follow-up due to its highly differentiated nature⁴⁰. Experience with high-dose methotrexate-based chemotherapy is anecdotal; lymphoma response to this strategy was modest⁴⁰. On the other hand, radiation therapy seems to be associated with an acceptable disease control; while available survival data are insufficient.

Plasmacytoma

CNS involvement in multiple myeloma is a rare condition⁴¹. In half of reported cases, CNS was the sole site of disease. Clinical presentation usually consists of multiple neurologic symptoms, occasionally of space occupying lesion-related symptoms, increased intracranial pressure, optic neuropathy, and optic nerve compression⁴¹. Determining whether an intracranial plasmacytoma is solitary or not is important from a prognostic point of view. In fact, patients with solitary CNS plasmacytoma have more favorable outcome in comparison to patients with systemic myeloma involving the CNS. Intracranial plasmacytoma is unlikely to develop systemic multiple myeloma in patients with initial negative systemic staging⁴². Thus, involved field irradiation with 50 Gy has been reported as an acceptable strategy in these patients⁴³, while some cases, mostly with large lesions, have obtained clinical benefit from chemotherapy⁴². Cases with brain plasmacytoma associated with multiple bone lesions should be treated like multiple myeloma, but CNS bioavailability of used drugs should be taken into account when therapeutic strategy is planned.

Hodgkin's disease

Primary CNS Hodgkin's lymphoma constitutes 1.4% of all lymphoproliferative disorders arising in the CNS⁴⁴. Secondary involvement of the CNS by Hodgkin's disease is more rare (0.2-0.5% of cases). Intracranial Hodgkin's disease may present as an isolated brain lesion, meningeal dissemination with infiltration of subdural neural tissue and/or brain compression without direct infiltration, or as a calvarium lesion with meningeal and/or cerebral infiltration. Nodular sclerosis is the most frequently reported subtype (~50% of cases), and it affects equally males and females, with an age ranging between 50 and 85 years⁴⁵. Neuroimaging is not pathognomonic, and biopsy is mandatory to establish the diagnosis. A lumbar puncture may be helpful in suggesting the diag-

nosis if Reed-Sternberg cells or eosinophilia are identified in the CSF, but these features are uncommon.

Most cases of primary CNS Hodgkin's lymphoma have been treated with complete surgical resection of the tumor, which has been performed with diagnostic purpose. Whole-brain radiotherapy (35-45 Gy) followed by a tumor-bed boost (5-15 Gy) has provided acceptable disease-free survival, none of the reported patients experienced relapse after a median follow-up of 12 months⁴⁵. The role of systemic chemotherapy remains to be defined, while it has been suggested the use of intrathecal chemotherapy in patients with positive CSF cytology examination⁴⁵.

Five-year view

A number of fundamental clinical and biological challenges on PCNSL remain to be addressed²⁴. This is particularly relevant in the field of therapeutic management, where several questions remain unanswered. A more extensive and coordinated, multidisciplinary cooperation will become the main strategy to address some of the fundamental clinical and biological research questions for PCNSL⁴⁶. One of the risks of this strategy is, however, to apply conclusions from multicentre trials to every PCNSL case. Actually, rare lymphoproliferative entities primarily arising in the CNS require a special methodological approach and should be investigated separately from the "common", primary CNS diffuse large B-cell lymphoma. Since these are rare forms of a rare malignancy, a major effort to collect cases from several cancer centers around the world appears advisable. In fact, the creation of a shared historical database that would pool information from an adequate number of cases for every lymphoma category represents a promising clinical research strategy in this field. In addition, it is critical that investigators share archival tumor tissue, which is especially important for frozen tissue since this is a rare resource in PCNSL. With these strategies, the most interesting clinical, molecular, pathologic, and therapeutic issues regarding rare forms of PCNSL will be better investigated. In the next years, international, multidisciplinary cooperation will be the winning strategy in the multifaceted fight against the "common" and "rare" forms of PCNSL.

References

1. Olson JE, Janney CA, Rao RD, Cerhan JR, Kurtin PJ, Schiff D, et al. The continuing increase in the incidence of primary central nervous system non-Hodgkin lymphoma: A surveillance, epidemiology, and end results analysis. *Cancer* 2002;95:1504-10.
2. Ferreri AJM, Reni M, Pasini F, Calderoni A, Tirelli U, Pivnik A, et al. A multicenter study of treatment of primary CNS lymphoma. *Neurology* 2002;58:1513-20.
3. Jellinger KA, Paulus W. Primary central nervous system lymphomas-new pathological developments. *J Neurooncol* 1995;24:33-6.
4. Ferreri AJ, Reni M, Villa E. Therapeutic management of primary central nervous system lymphoma: Lessons from prospective trials. *Ann Oncol* 2000;11:927-37.
5. Akpek EK, Ahmed I, Hochberg FH, Soheilian M, Dryja TP, Jakobiec FA, et al. Intraocular-central nervous system lymphoma: Clinical features, diagnosis, and outcomes. *Ophthalmology* 1999;106:1805-10.

6. Peterson K, Gordon KB, Heinemann MH, Deangelis LM. The clinical spectrum of ocular lymphoma. *Cancer* 1993;72:843-9.
7. Deangelis LM, Yahalom J, Heinemann MH, Cirincione C, Thaler HT, Krol G. Primary CNS lymphoma: Combined treatment with chemotherapy and radiotherapy. *Neurology* 1990;40:80-6.
8. Soussain C, Merle-Beral H, Reux I, Sutton L, Fardeau C, Gerber S, et al. A single-center study of 11 patients with intraocular lymphoma treated with conventional chemotherapy followed by high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation in 5 cases. *Leuk Lymphoma* 1996;23:339-45.
9. Ferreri AJ, Blay JY, Reni M, Pasini F, Gubkin A, Tirelli U, et al. Relevance of intraocular involvement in the management of primary central nervous system lymphomas. *Ann Oncol* 2002;13:531-8.
10. Cassoux N, Merle-Beral H, Leblond V, Bodaghi B, Milea D, Gerber S, et al. Ocular and central nervous system lymphoma: Clinical features and diagnosis. *Ocul Immunol Inflamm* 2000;8:243-50.
11. Ursea R, Heinemann MH, Silverman RH, Deangelis LM, Daly SW, Coleman DJ. Ophthalmic, ultrasonographic findings in primary central nervous system lymphoma with ocular involvement. *Retina* 1997;17:118-23.
12. Merle-Beral H, Davi F, Cassoux N, Baudet S, Colin C, Gourdet T, et al. Biological diagnosis of primary intraocular lymphoma. *Br J Haematol* 2004;124:469-73.
13. Chan CC. Molecular pathology of primary intraocular lymphoma. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2003; 101:275-92.
14. Baumann MA, Ritch PS, Hande KR, Williams GA, Topping TM, Anderson T. Treatment of intraocular lymphoma with high-dose Ara-C. *Cancer* 1986;57:1273-5.
15. Whitcup SM, De SM, Rubin BI, Palestine AG, Martin DF, Burnier MJ, et al. Intraocular lymphoma. Clinical and histopathologic diagnosis. *Ophthalmology* 1993;100:1399-406.
16. Batchelor TT, Kolak G, Ciordia R, Foster CS, Henson JW. High-dose methotrexate for intraocular lymphoma. *Clin Cancer Res* 2003;9:711-5.
17. Soussain C, Suzan F, Hoang-Xuan K, Cassoux N, Levy V, Azar N, et al. Results of Intensive Chemotherapy Followed by Hematopoietic Stem-Cell Rescue in 22 Patients With Refractory or Recurrent Primary CNS Lymphoma or Intraocular Lymphoma. *J Clin Oncol* 2001;19:742-9.
18. Smith JR, Rosenbaum JT, Wilson DJ, Doolittle ND, Siegal T, Neuwelt EA, et al. Role of intravitreal methotrexate in the management of primary central nervous system lymphoma with ocular involvement. *Ophthalmology* 2002;109:1709-16.
19. Khan RB, Shi W, Thaler HT, Deangelis LM, Abrey LE. Is intrathecal methotrexate necessary in the treatment of primary CNS lymphoma? *J Neurooncol* 2002;58:175-8.
20. Matano S, Sakashita Y, Furusho H, Ohashi M, Terahata S, Kakuma K, et al. Primary leptomeningeal lymphoma. *J Neurooncol* 2001;52:81-3.
21. Galoin S, Daste G, Apoil PA, Chollet F, Roda D, Blancher A, et al. Polymerase chain reaction on cerebrospinal fluid cells in the detection of leptomeningeal involvement by B-cell lymphoma and leukaemia: A novel strategy and its implications. *Br J Haematol* 1997;99:122-30.
22. Lachance DH, O'Neill BP, Macdonald DR, Jaekle KA, Witzig TE, Li CY, et al. Primary leptomeningeal lymphoma: Report of 9 cases, diagnosis with immunocytochemical analysis, and review of the literature. *Neurology* 1991;41:95-100.
23. Balmaceda C, Gaynor JJ, Sun M, Gluck JT, Deangelis LM. Leptomeningeal tumor in primary central nervous system lymphoma: Recognition, significance, and implications. *Ann Neurol* 1995;38:202-9.
24. Ferreri AJ, Abrey LE, Blay JY, Borisch B, Hochman J, Neuwelt EA, et al. Summary statement on primary central nervous system lymphomas from the Eighth International Conference on Malignant Lymphoma, Lugano, Switzerland, June 12 to 15, 2002. *J Clin Oncol* 2003;21:2407-14.
25. Guha-Thakurta N, Damek D, Pollack C, Hochberg FH. Intravenous methotrexate as initial treatment for primary central nervous system lymphoma: Response to therapy and quality of life of patients. *J Neurooncol* 1999;43:259-68.
26. Ferreri AJ, Reni M, Dell'Oro S, Ciceri F, Bernardi M, Camba L, et al. Combined treatment with high-dose methotrexate, vincristine and procarbazine, without intrathecal chemotherapy, followed by consolidation radiotherapy for primary central nervous system lymphoma in immunocompetent patients. *Oncology* 2001;60:134-40.
27. Pels H, Vogt I, Klockgether T, Schlegel U. Primary non-Hodgkin's lymphoma of the spinal cord. *Spine* 2000;25:2262-4.
28. Ponzoni M, Terreni MR, Ciceri F, Ferreri AJ, Gerevini S, Anzalone N, et al. Primary brain CD30+ ALK1+ anaplastic large cell lymphoma ("ALKoma"): The first case with a combination of 'not common' variants. *Ann Oncol* 2002;13:1827-32.
29. George DH, Scheithauer BW, Aker FV, Kurtin PJ, Burger PC, Camelselle-Teijeiro J, et al. Primary anaplastic large cell lymphoma of the central nervous system: prognostic effect of ALK-1 expression. *Am J Surg Pathol* 2003;27:487-93.
30. Gijtenbeek JM, Rosenblum MK, Deangelis LM. Primary central nervous system T-cell lymphoma. *Neurology* 2001;57:716-8.
31. Hayabuchi N, Shibamoto Y, Onizuka Y. Primary central nervous system lymphoma in Japan: a nationwide survey. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999;44:265-72.
32. Villegas E, Villa S, López-Guillermo A, Petit J, Ribalta T, Graus F. Primary central nervous system lymphoma of T-cell origin: Description of two cases and review of the literature. *J Neurooncol* 1997;34:157-61.
33. Murase T, Nakamura S, Kawauchi K, Matsuzaki H, Sakai C, Inaba T, et al. An Asian variant of intravascular large B-cell lymphoma: Clinical, pathological and cytogenetic approaches to diffuse large B-cell lymphoma associated with haemophagocytic syndrome. *Br J Haematol* 2000;111:826-34.
34. Ferreri AJ, Campo E, Ambrosetti A, Illariucci F, Seymour JF, Willemze R, et al. Anthracycline based chemotherapy as primary treatment for intravascular lymphoma. *Ann Oncol* 2004, in press.
35. Benouaich A, Delord JP, Danjou M, Richard J, Urocoste E, Soum F, et al. Primary dural lymphoma: a report of two cases with review of the literature. *Rev Neurol (Paris)* 2003;159:652-8.
36. Lima VS, Leite EB, Fonseca RP, Fernandes ASJ. Patients presenting with CNS lesions. Case 1. Primary low-grade mucosa-associated B-cell lymphoma of the dura. *J Clin Oncol* 2003; 21:4058-60.
37. Goetz P, Lafuente J, Revesz T, Galloway M, Dogan A, Kitchen N. Primary low-grade B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue of the dura mimicking the presentation of an acute subdural hematoma. Case report and review of the literature. *J Neurosurg* 2002;96:611-4.
38. Kambham N, Chang Y, Matsushima AY. Primary low-grade B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) arising in dura. *Clin Neuropathol* 1998;17:311-7.
39. Sanjevi A, Krishnan J, Bailey PR, Catlett J. Extranodal Marginal Zone B-Cell Lymphoma of Malt Type Involving the Cavernous Sinus. *Leukemia Lymphoma* 2001;42:1133-7.
40. Braks E, Urbach H, Pels H, Traber F, Block W, Schild HH. Primary central nervous system immunocytoma: MRI and spectroscopy. *Neuroradiology* 2000;42:738-41.
41. Spaar FW. Paraproteinemia and multiple myeloma. In: Vinken PJ, Bruyn GW, eds. *Handbook of Clinical Neurology*, Vol. 39. Amsterdam: North Holland Publishing, 1980: p. 131-80.
42. Bindal AK, Bindal RK, Van Loveren H, Sawaya R. Management of intracranial plasmacytoma. *J Neurosurg* 1995;83:218-21.
43. Brannan SO, Matthews BN, Savant V, Brown RD, Matthews TD. Solitary intracranial extra-osseous plasmacytoma presenting with ophthalmic signs. *J Neuroophthalmol* 2003;23:268-71.
44. Camilleri-Broet S, Martin A, Moreau A, Angonin R, Henin D, Gontier MF, et al. Primary Central Nervous System Lymphomas in 72 Immunocompetent Patients. Pathologic findings and clinical correlations. *Am J Clin Pathol* 1998;110:607-12.
45. Herrlinger U, Klingel K, Meyermann R, Kandolf R, Kaiserling E, Kortmann RD, et al. Central nervous system Hodgkin's lymphoma without systemic manifestation: Case report and review of the literature. *Acta Neuropathol (Berlin)* 2000;99:709-14.
46. Ferreri AJM, Batchelor T, Zucca E, Armitage JO, Cavalli F. International collaborative group against primary CNS lymphomas. *J Clin Oncol* 2003;21:1649-50.

THE APPLICATION OF MOLECULAR STUDIES TO THE CHARACTERIZATION OF CUTANEOUS T CELL LYMPHOMA

L. TRACEY¹, R. VILLUENDAS¹, A.M. DOTOR², I. SPITERI¹, J.F. GARCÍA¹, P. ORTIZ³, F. VANACLOCHA³, J.L. RODRÍGUEZ PERALTO⁴, M. GARCÍA RODRÍGUEZ⁵, J. FERNÁNDEZ HERRERA⁶, I. MORA⁸, C. GARCÍA⁹, S. VIDAL¹⁰, J. FRAGA⁷, L. REQUENA¹¹ Y M.A. PIRIS¹

¹Molecular Pathology Program, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas. Madrid. ²Pathology Department, Hospital Universitario de Getafe. Madrid. ³Dermatology and ⁴Pathology Departments, Hospital 12 de Octubre. Madrid. ⁵Dermatology Department, Hospital Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares. ⁶Dermatology and ⁷Pathology Departments, Hospital de la Princesa. Madrid. ⁸Dermatology Department, Hospital Clínico San Carlos. Madrid. ⁹Dermatology Department, Hospital Virgen de la Salud. Toledo. ¹⁰Dermatology Department, Hospital Militar Gómez Ulla. Madrid. ¹¹Dermatology Department. Clínica de la Concepción. Madrid. Spain.

Introduction

Mycosis fungoides (MF) is a peripheral T-cell lymphoma characterized by the infiltration and accumu-

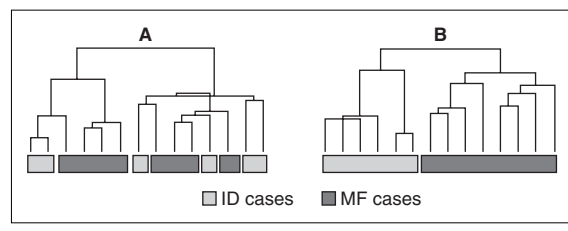


Figure 1. Unsupervised clustering of raw and normalized MF and ID data. A) Using raw data from 8 MF patients and 6 ID patients, group separation was not possible due to high levels of noise coming from normal skin cells. B) Normalization of all samples against normal skin allowed the separation of MF from ID cases.

lation of tumoral T cells in the skin (epidermal and dermal infiltration). It is the most frequent type of cutaneous T cell lymphoma (CTCL), representing more than half of all lymphomas originating in the skin. The knowledge surrounding the aetiology and tumorigenic mechanisms in MF is limited, and the clinical and pathological diagnosis of MF has proved very difficult since it bears many resemblances to common inflammatory dermatoses (ID) such as interface and spongiotic dermatitis, conditions involving infiltration and accumulation of benign T cells in the skin. The difficulties in the study of MF are further compounded by the

small number of tumoral cells, which may be present in the skin, with tumoral T-cell infiltrate often accounting for only 5-10% of the total tissue cells.

cDNA microarrays are a powerful technique, which allow the analysis of the expression of thousands of genes simultaneously. These types of studies have revolutionised the study of cancer including lymphoma and leukaemia, allowing finer tumour classification, prediction of treatment response, prediction of overall survival, analysis of drug resistance and the identification of new therapeutic targets¹⁻¹⁰. In an effort to improve the characterization of these tumours, molecular analysis using the CNIO OncoChip cDNA microarray has been used for examining the expression profile of a total of 53 MF and 11 ID samples, allowing the identification of an MF tumorigenesis model, construction of a 6-gene MF prediction model and the identification of 2 clusters subclasses of MF, one of which tends to include more aggressive type MF cases including tumoral MF forms.

Results

Data normalization

The first major problem in the study of MF is the low number of tumoural cells present in the skin, with T

Table 1. 27 genes significant in separating MF from ID cases

Gene Symbol	Unadjusted p value	Adjusted p value	Function
A: Genes upregulated in MF cases			
Hs.439064	0.00002000	0.0210896	H. sapiens transcribed sequences – Unknown function
STAT4	0.00002000	0.0210896	Signal transduction, T cell differentiation/ proliferation
SYNE1	0.00004000	0.0210896	Signal transduction
CDC16	0.00004000	0.0210896	Cell cycle control
TRAF1	0.00006000	0.0210896	NF-κB activation, TNF signalling, Apoptosis Regulator
BIRC3	0.00006000	0.0210896	NF-κB transcription target, Inhibition of apoptosis
PRO0823	0.00006000	0.0210896	Hypothetical protein – similarity to FYN binding protein
ITGAX	0.00010000	0.0319539	Integrin, Cell adhesion
PRKCH	0.00014000	0.0395430	Protein Kinase C – Signal transduction/NF-κB activation
LYN	0.00016000	0.0395430	Signal transduction. Oncogene
EBI2	0.00016000	0.0395430	EBV induced, receptor signalling, immune response
FNBP1	0.00018000	0.0395430	Forming binding
RASSF2	0.00022000	0.0454873	Oncogene
WASPIP	0.00026000	0.0507712	Cytoskeleton organisation, signal transduction
LCP2	0.00031999	0.0562389	T cell signalling
HCK	0.00033999	0.0569084	Signal transduction
DEDD	0.00037999	0.0607124	Apoptosis
SELP	0.00043999	0.0644404	Selectin, cell adhesion
CD5	0.00047999	0.0674867	T cell marker, T cell proliferation
TNFRSF5	0.00069999	0.0911278	T cell activation, apoptosis inhibitor, NF-κB activation
B: Genes downregulated in MF cases			
FJX1	0.00002000	0.0210896	Differentiation and development
BCL7A	0.00004000	0.0210896	Oncogenesis, Actin binding
WBSCR14	0.00006000	0.0210896	Role in cell differentiation and/or proliferation
BARX2	0.00018000	0.0395430	Differentiation and Development, cell adhesion
PCTAIRE2BP	0.00031999	0.0562389	Cell cycle control
ACTN1	0.00039999	0.0611292	Actinin, Cytoskeleton organisation
UBE2L3	0.00061999	0.0838176	Ubiquitination

cell infiltrates often accounting for only 1-5% of the total number of cells in the tissue. Therefore during cDNA microarray analysis much of the signal comes from normal cells in the skin, and not from the cells of interest. In preliminary studies of 6 ID and 8 MF cases using hierarchical clustering techniques, ID and MF cases could not be separated (fig. 1A). We attempted to eliminate the signal coming from normal surrounding tissue in both sample types by normalizing each MF and ID sample against a pool of normal non-photoexposed skin samples. This technique allowed cases to be clearly separated into 2 groups, using hierarchical clustering (fig. 1B). Therefore this method of normalization against normal samples is a valid method for enriching the data obtained from microarray data in samples where the number of tumoral cells is low, allowing better clustering and classification of these tumours. For the remainder of the study this type of normalization was used for all cases of MF and ID using a total of 6 normal skin samples for normalization.

MF signature: Genes differentially expressed between MF and ID cases

To identify genes implicated in MF tumorigenesis, a total of 29 MF and 11 ID samples were used. Data from microarray studies was normalized against the average signal from 6 normal skin samples. To identify the genes significant in distinguishing between MF and ID cases, we used a t-statistic, and unadjusted p-values were obtained from permutation tests. Adjusted p-values were obtained using Benjamini & Hochberg's procedure for the control of the False Discovery Rate. Genes with unadjusted p-values < 0.001 and adjusted p-values < 0.1 were deemed to be significant. A total of 27 genes significant in the separation of MF from ID samples were identified (table 1). These genes are involved in a large variety of functions such as cell cycle control, apoptosis and signal transduction. However the most striking finding is the upregulation of many genes implicated in activation of NF-κB and TNF signalling including *TRAF1*, *BIRC3* and *TNFRSF5* (CD40).

MF prediction model construction and validation by blind testing

In order to validate the 27-gene MF prediction model, gene clustering was carried out using the SOM algorithm, which defined a total of 6 gene clusters. An average for each gene cluster was calculated and this average was used for validation using discriminant analysis in the study group and blind set of 24 low-stage MF patients, yielding a success rate of 100% in both cases (table 2).

In order to identify a smaller subset of class predictor genes, the gene with the lowest p-value was selected from each cluster generated by the SOM algorithm. The final class prediction model of 6 genes (table 3) was validated by discriminant analysis. This class prediction model classifies all cases with 97.3%

Table 2. Discriminant analysis of averaged 27-gene MF prediction model in study group of 29 MF and 11 ID cases and in blind test group of 24 MF cases

Class	Predicted group membership		Total
	MF	ID	
Original study group			
Count			
MF	29	0	29
ID	0	11	11
Percentage			
MF	100	0	100
ID	0	100	100
Blind set			
Count			
MF	24	0	24
ID	0	11	11
Percentage			
MF	100	0	100
ID	0	100	100

100% of original study group cases correctly classified; 100% of blind set cases correctly classified.

accuracy in the original sample set and with 97.0% accuracy in the blind set (table 4).

Identification of MF subgroups

In order to identify subgroups of MF patients, unsupervised hierarchical clustering analysis was performed of all 53 MF samples, and 2 main clusters of MF were identified (fig 2). At the same time, the heterogeneity of the MF samples was analysed in terms of clinical (treatment responders vs. non-responders), histological (plaque vs. tumour stage; large cell component), or immunophenotypical (common (CD4+/CD8-) vs. aberrant phenotypic, high proliferative index vs. low proliferative index and immunostaining for STAT1, STAT3, or CD30 antibodies) characteristics of the patients. The Fisher's exact test was used to find significant difference between the two clusters. Some characteristics associated with more aggressive phenotypes have a tendency to be found in cluster 2. For example, all tumour-stage disease cases (100%, p: 0.061), along with cases expressing activated STAT3, an oncogene which has been demonstrated to play a role in apoptosis escape in MF cell lines, are over-represented in Cluster 2 (47% compared to 17%, p: 0.069). Other characteristics associated with aggressive disease (large cell component, high proliferative index, and high stage disease) are more predominant in cluster 2 although these differences do not reach significance.

To identify the biological factors responsible for the clustering observed within the MF cases, a Student's T-test comparing MF clusters 1 and 2, was performed. Genes with unadjusted p-values < 0.001 and adjusted p-value < 0.06 were deemed to be significant.

A total of 557 genes whose expression was significantly different between these MF clusters were identified.

Table 3. 6-gene MF prediction model

Gene Symbol	Unadjusted p value	Adjusted p value	Function
FJX1	0.0000200	0.0210896	Differentiation and development
Hs.439064	0.0000200	0.0210896	H. sapiens transcribed sequences – Unknown function
STAT4	0.0000200	0.0210896	Signal transduction, T cell differentiation/ proliferation
SYNE1	0.0000400	0.0210896	Signal transduction
TRAF1	0.0000600	0.0210896	NF- κ B activation, TNF signalling, Apoptosis Regulator
BIRC3	0.0000600	0.0210896	NF- κ B transcription target, Inhibition of apoptosis

Table 4. Discriminant analysis of 6-gene MF prediction model in study group of 29 MF and 11 ID cases and in blind test group of 24 MF cases for which data was available for all 6 genes in the model

Class	Predicted group membership		Total
	MF	ID	
Original study group			
Count			
MF	27	0	27
ID	1	9	10
Percentage			
MF	100	0	100
ID	10	90	100
Blind set			
Count			
MF	22	1	23
ID	0	10	10
Percentage			
MF	95.7	4.3	100
ID	0	100	100

97.3 % of original study group cases correctly classified; 97.0 % of blind set cases correctly classified..

tified. To simplify the analysis, all ESTs and hypothetical genes were excluded from further analysis leaving a total of 368 named genes implicated in the differentiation of MF cluster 1 and cluster 2. Cluster 1 cases, which tend to be less aggressive in terms of STAT3 expression and disease type, show increased expression of growth factors and interleukins, some oncogenes and positive cell cycle regulators. Cluster 2, which tends to include the more aggressive cases,

shows upregulation of some genes implicated in NF- κ B activation in addition to upregulation of a large number of oncogenes, positive cell cycle regulators and anti-apoptotic genes. Furthermore reduced expression of some important tumour suppressor genes is observed compared to Cluster 1 cases.

Discussion

Activation of the NF- κ B and TNF anti-apoptotic signalling in the tumorigenesis of MF

A total of 27 genes are differentially expressed between MF and ID cases (table 1), 20 of which are up-regulated in the MF cases while the remaining 7 genes are downregulated. Most interesting is the upregulation of many genes directly implicated in the regulation of TNF signalling and NF- κ B activation including *BIRC3*, *TRAF1*, *LYN*, *HCK*, *TNFRSF5* and *PRKCH* in addition to other important genes, which may play an indirect role in TNF signalling and NF- κ B activation such as *STAT4*.

NF- κ B is activated primarily through signalling by TNF superfamily receptors and ligands such as CD40 (TNFRSF5), which is overexpressed in MF cases. The TRAF protein family bind to activated TNF family receptors, and subsequently induce phosphorylation and degradation of the NF- κ B inhibitor, I κ B. This allows NF- κ B to translocate to the nucleus and activate transcription, leading to cell growth and survival. *TRAF1* has been identified here as being upregulated in MF cases.

The inhibitor of apoptosis proteins (IAP) inhibit apoptosis including apoptosis induced through signalling by death receptors such as FAS, TRAIL and TNFR1. These receptors possess an intracellular

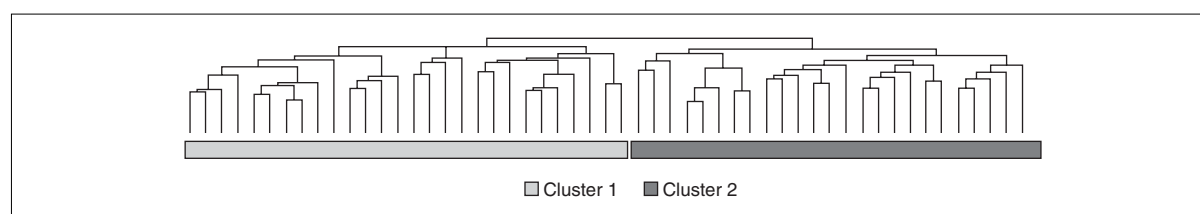


Figure 2. Unsupervised clustering analysis of 53 MF cases revealed 2 main MF clusters. Cluster 2 tends to represent more patients with tumor stage disease and nuclear STAT3 expression, characteristics associated with aggressive disease. A total of 368 named genes are differentially expressed between the two clusters including growth factors, interleukins, oncogenes, positive cell cycle regulators, genes implicated in NF- κ B activation and anti-apoptotic genes.

death domain and induce apoptosis by recruitment of TRADD and subsequent activation of caspase 8 through adapter proteins such as *FADD*¹¹. The IAP/BIRC family, including *BIRC3*, which is upregulated in MF cases, inhibit cell death induced by death receptors thus allowing NF- κ B activation to proceed. The role of *BIRC3* (*cIAP2*) has been described in a variety of lymphomas and leukaemias and its involvement in treatment resistance has been previously described¹²⁻¹⁴.

The protein kinase C family plays an important role in some signalling pathways responsible for activation of NF- κ B particularly those involving the T and B cell receptor complexes and those involving cytokines such as TNF and IL1 in certain cell types. Protein kinase C, an isoform of which is overexpressed in MF cases, is responsible for the degradation of I κ B and activation of NF- κ B¹⁵.

HCK and oncogene *LYN* are tyrosine kinases upregulated in MF cases. *HCK* is responsible for production of TNF in murine cells¹⁶ and both *HCK* and *LYN* have been implicated in TNF production in human monocytes¹⁷. In this study, in addition to *HCK* and *LYN* upregulation in MF cases, TNF was overexpressed although significance was just outside the stringent range set here. Since apoptosis signalling through death receptors including the TNF receptor 1 (TNFR1) is likely to be abrogated due to overexpression of IAPs such as *BIRC3* (*cIAP2*), overexpression of TNF would lead to NF- κ B activation through TNF receptor 2 (TNFR2) and to a lesser extent through TNFR1. Additionally, *HCK* and *LYN* and the oncogene *c-MYC* are induced by IL2 signalling via JAK2 and STAT4 activation. In this study *STAT4* is overexpressed in MF cases, as is the IL2 receptor (*IL2R*), but with a lower significance.

In summary, MF tumorigenesis is associated with activation of the NF- κ B survival pathway through TNFR2 and other TNF family receptors lacking a death domain such as CD40, in addition to inhibition of the pro-apoptotic pathways of TNFR1 and other death receptors. IL2 may also play a critical role in MF tumorigenesis through its receptor by activating JAK2 and STAT4 and subsequently inducing expression of oncogenes such as *c-MYC*, *LYN* and *HCK*. *LYN* and *HCK* participate in an autocrine loop by promoting endogenous TNF production and thereby auto-stimulating TNFR1 and TNFR2 NF- κ B activation pathways and creating a feedback loop of TNF survival pathway activation. TNF apoptotic pathway silencing may be due to overexpression of IAP family members such as *BIRC3* (*cIAP2*) causing caspase inhibition.

MF prediction model

The prediction model using the average signal from the clusters of all 27 genes, can correctly assign class in 100% of both the original MF series and the blind set of 24 MF patients (table 2). Since some genes, although individually significant in separating

MF from ID cases, may provide redundant information, the 27 genes in the tumorigenesis model were grouped using the SOM clustering algorithm, which defined 6 clusters. Subsequently the gene with the lowest p-value from each cluster was chosen and this 6-gene prediction model correctly classified 97.3% of the original series and 97.0% of the MF blind set. Further weight to the validation of this prediction model is provided by the exclusive presence in the blind set of cases with early stages of MF, whose histology more closely mimics that of ID cases.

Clusters of MF cases based on gene expression patterns

Hierarchical clustering of 53 MF samples revealed 2 main MF clusters. Some characteristics associated with more aggressive phenotypes have a tendency to be found in cluster 2 cases, including tumour-stage disease and cases expressing activated STAT3.

Cluster 1 cases, which tend to be less aggressive show increased expression of a large number of genes including growth factors such as those of the fibroblast growth factor family (*FGFR1*, *FGF5*), epidermal growth factor family (*GRB7*, *EGFL3*, *ERBB3*), platelet derived growth factor family (*PDGFA*), vascular endothelial growth factor family (*ANGPTL3*) and the transforming growth factor family (*BMP5*, *TAB1*, *TGFBR3*, *MADHIP*, *GDF1*). In parallel, higher expression of critical oncogenes such as *HRAS* (in addition to *RAB1*, *RAB14*, *RABL2B*, *TIM*) and interleukins (*IL15RA*, *IL7*, *IL1RAPL1*, *IL11*) is observed accompanied by upregulation of positive cell cycle regulators such as cyclin A1 (*CCNA1*), cyclin dependent kinase family genes (*CDKL2*, *CDKL3*) and cell division cycle genes (*CDC27*, *CDC20*). Overexpression of a limited number of genes implicated in the NF- κ B pathway is also observed in cluster 1 cases, including *BIRC4* (*XIAP*) and receptors and ligands such as *TNFRSF11A* (*RANK*) and *TNFSF4* (*OX40L*).

Cluster 2, which tends to include the more aggressive cases, shows upregulation of some genes implicated in NF- κ B activation including *BIRC2* (*c-IAP1*) and *TNFRSF12* (*APO3L/TWEAK receptor*). Parallel to upregulation of NF- κ B activation genes, upregulation of oncogenes such as *MYC*, *FOS*, *VAV3*, *WNT* and *PIM1* is observed, accompanied by upregulation of positive cell cycle regulators such as cyclin D2 and interleukin receptors such as *IL2RB*. Other oncogenes such as *FYN*, *STAT3*, *PIM2* and *MYCN* (*nMYC*) are also expressed at a higher level in cluster 2 cases but with lower significance. The overexpression of *STAT3* in cluster 2 cases lends support to the observation that activated STAT3 protein is a feature more common in cluster 2 cases. Interestingly oncogenes *FOS*, *MYC* and *FYN* and *IL2RB* play an important role in NF- κ B activation¹¹. Furthermore cyclin D2 (*CCND2*) is a transcriptional target of NF- κ B, underlining the potential importance of NF- κ B activity in this cluster of cases. Finally cluster 2 cases show lower expression of a num-

ber of genes with tumour suppressing properties as compared to cluster 1 cases. These include *HIC1*, *LG11*, *DLEU1*, *ST14*, *MSH5* and *PTEN*, whose alteration has been described in lymphoid malignancies¹⁸.

Taken together these results suggest that while NF- κ B activation may be a common event in the tumorigenesis of MF, the two MF cases clusters identified show different characteristics in terms both of NF- κ B activation and expression of oncogenes, growth factors, interleukins and cell cycle control genes. Cluster 1 cases tend to be less aggressive and these cases are more dependent on overexpression of growth factors, interleukins and positive cell cycle regulators and oncogene *HRAS* for their growth. Notwithstanding, these cases also show overexpression of some important NF- κ B pathway genes such as *BIRC4*, *TNFRSF11A* and *TNFSF4* and *TNFRSF17* and *TNFSF9* with lower significance. Cluster 2 cases tend to exhibit a more aggressive phenotype and show overexpression of a large number of genes associated with NF- κ B activation including *BIRC2* (*cIAP1*) and *TNFRSF12* (*APO3L*) and *NFKB2*, *BIRC1* (*NAIP*), *BIRC6*, *TNFSF10* (*TRAIL*) and *TNFSF13* (*APRIL*) with lower significance. Additionally a large number of potent oncogenes are upregulated some of which also play a role in NF- κ B activation while tumour suppressor genes are downregulated as compared to cluster 1 cases. Overall a stronger NF- κ B activation or distinct mechanisms of NF- κ B activation in combination with strong oncogenic pathway activation may help explain the tendency for cluster 2 cases to show a more aggressive phenotype.

Conclusions

MF tumorigenesis combines endogenous TNF production and NF- κ B activation

Microarray analysis revealed 27 genes whose expression is significantly different between MF and non-tumoural ID cases. MF tumorigenesis is associated with NF- κ B activation through TNFR2 and other TNF family receptors such as CD40 and LTB, in addition to inhibition of the pro-apoptotic pathways of TNFR1 and other death receptors. IL2 may also play a critical role in MF tumorigenesis by inducing expression of oncogenes such *c-MYC*, *LYN* and *HCK*. *LYN* and *HCK* participate in an autocrine loop by promoting endogenous TNF production and thereby auto-stimulating TNFR1 and TNFR2 NF- κ B activation pathways and creating a feedback loop of TNF survival pathway activation.

A 6-gene MF prediction predicts MF diagnosis with unprecedented accuracy

A 6-gene prediction model constructed provides an unprecedented accuracy in diagnostic prediction, correctly classifying 97.3% of the original series and 97.0% of the MF blind set. Further weight to the validation of this prediction model is provided by the exclusive presence in the blind set of cases with early

stages of MF, whose histology more closely mimics that of ID cases.

MF consists of two cases clusters, one of which is characterised by a more aggressive phenotype

Hierarchical clustering of 53 MF samples revealed 2 main MF clusters. Cluster 1 cases tend to be less aggressive and these cases are more dependent on overexpression of growth factors, interleukins and positive cell cycle regulators and oncogene *HRAS* for their growth. Cluster 2 cases tend to exhibit a more aggressive phenotype and show overexpression of a large number of genes associated with NF- κ B activation. Additionally a large number of potent oncogenes are upregulated some of which also play a role in NF- κ B activation while tumour suppressor genes are downregulated as compared to cluster 1 cases.

References

- Lossos IS, Czerwinski DK, Alizadeh AA, Wechsler MA, Tibshirani R, Borstein D, et al. Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes. *N Engl J Med.* 2004;350:1828-37.
- Valk PJ, Verhaak RG, Beijnen MA, Erpelinck CA, Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Boer JM, et al. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2004;350:1617-28.
- Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, Weng AP, Kutok JL, Aguiar RC, et al. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med.* 2002;8:68-74.
- Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henriksson SE, et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood.* 2003;101:4944-51.
- Wright G, Tan B, Rosenwald A, Hurt EH, Wiestner A, Staudt LM. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:9991-6.
- Rosenwald A, Wright G, Leroy K, Yu X, Gaulard P, Gascoyne RD, et al. Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J Exp Med.* 2003;198:851-62.
- Bullinger L, Dohner K, Bair E, Frohling S, Schlenk RF, Tibshirani R, et al. Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2004;350:1605-16.
- Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature.* 2000;403:503-11.
- Munshi NC, Hideshima T, Carrasco D, Shamma M, Auclair D, Davies F, et al. Identification of genes modulated in multiple myeloma using genetically identical twin samples. *Blood.* 2004;103:1799-806.
- Tracey L, Villuendas R, Ortiz P, Dopazo A, Spiteri I, Lombardia L, et al. Identification of Genes Involved in Resistance to Interferon-alpha in Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Am J Pathol.* 2002;161:1825-37.
- Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol.* 2001;11:372-7.
- Hasegawa T, Suzuki K, Sakamoto C, Ohta K, Nishiki S, Hino M, et al. Expression of the inhibitor of apoptosis (IAP) family members in human neutrophils: up-regulation of cIAP2 by granulocyte colony-stimulating factor and overexpression of cIAP2 in chronic neutrophilic leukemia. *Blood.* Vol. 101; 2003:1164-71.
- Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, Anderson KC, Treon SP. Intracellular regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human multiple myeloma cells. *Blood.* Vol. 99; 2002:2162-71.
- Hubinger G, Schneider C, Stohr D, Ruff H, Kirchner D, Schwanen C, et al. CD30-induced up-regulation of the inhibitor of apoptosis genes cIAP1 and cIAP2 in anaplastic large cell lymphoma cells. *Exp Hematol.* Vol. 32; 2004:382-9.
- Schmitz ML, Bacher S, Dienz O. NF-kappaB activation pathways induced by T cell costimulation. *Faseb J.* Vol. 17; 2003:2187-93.
- English BK, Ihle JN, Myracle A, Yi T. Hck tyrosine kinase activity modulates tumor necrosis factor production by murine macrophages. *J Exp Med.* 1993;178:1017-22.
- Beatty CD, Franklin TL, Uehara Y, Wilson CB. Lipopolysaccharide-induced cytokine production in human monocytes: role of tyrosine phosphorylation in transmembrane signal transduction. *Eur J Immunol.* 1994;24:1278-84.
- Sakai A, Thieblemont C, Wellmann A, Jaffe ES, Raffeld M. PTEN gene alterations in lymphoid neoplasms. *Blood.* 1998;92:3410-5.

TROMBOEMBOLISMO VENOSO

COORDINADORES: J. MONASTERIO. *Unitat de Recerca en Hemostasia, Hospital Universitari Vall d'Hebròn, Barcelona*
M. MONREAL. *Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Badalona*

Resumen del simposio

El tromboembolismo venoso es una enfermedad a la vez grave, frecuente y prevenible. En los últimos años hemos asistido a grandes avances en el conocimiento de fisiopatología, la epidemiología, el diagnóstico, el tratamiento y la prevención de esta enfermedad. Sin embargo, no son pocos aún los interrogantes que nos plantea la práctica clínica diaria en cuanto al tratamiento de estos pacientes.

Uno de los aspectos que más polémica ha levantado en los últimos años consiste en definir en qué pacientes con trombosis venosa y/o embolia pulmonar conviene realizar estudios biológicos encaminados a detectar la posible presencia de defectos congénitos o adquiridos que supongan una tendencia a la trombofilia. Y no solamente en qué pacientes estaría indicado, sino también en qué momento de la evolución y qué batería de pruebas deberían realizarse. Una vez contestados estos puntos queda aún el tema de a qué pacientes conviene alargar la duración del tratamiento anticoagulante, basándose precisamente a la presencia o no de algún defecto trombofílico.

Para discutir estos temas disponemos de la doctora Amparo Vayá, de la Unidad de Trombosis y Hemostasia del Hospital Universitario La Fe, de Valencia, y del doctor Ramón Lecumberri, del servicio de Hematología de la Clínica Universitaria de Pamplona. La primera centrará su presentación en sus estudios de trombofilia en los pacientes con trombosis venosa de extremidad superior, mientras que Ramón nos hablará de la trombofilia en los pacientes del Registro Informatizado de pacientes con Enfermedad TromboEmbólica (RIETE), a partir de una base de datos con más de 8.000 pacientes.

Esta misma base de datos sirve de soporte para tratar un nuevo tema: el de la utilidad de la determinación de los niveles de dímero-D en el diagnóstico y en el seguimiento de los pacientes con tromboembolismo venoso. El doctor Enric Grau, del Servicio de Hematología del hospital Lluís Alcanyis nos presentará los datos del estudio que ha realizado a partir de la base de datos de RIETE sobre la distinta especificidad de los diversos reactivos del dímero-D en el diagnóstico de la enfermedad, de su relación con la extensión o gravedad de la enfermedad, pero también de su relación con el pronóstico clínico de los pacientes.

Por último, el doctor Fernando Martínez Brotons, del Servicio de Hematología del hospital de Bellvitge, en Barcelona, nos presentará la situación actual sobre en qué pacientes conviene alargar la duración del tratamiento anticoagulante, durante cuánto tiempo, con qué fármacos y por qué motivos.

TROMBOSIS VENOSA PROFUNDA DE MIEMBRO SUPERIOR Y TROMBOFILIA

A. VAYÁ, Y. MIRA, F. FERRANDO Y J. AZNAR

Unidad de Trombosis y Hemostasia. Departamento de Biopatología Clínica. Hospital Universitario La Fe. Valencia.

Introducción

La trombosis venosa profunda de miembros superiores (TVPMS) es una entidad clínica poco estudiada, aunque es responsable del 4% de todos los casos de trombosis venosa profunda¹. Descrita separadamente por Paget² y Schroetter³ a finales de 1800, ha presentado una incidencia creciente durante las dos últimas décadas. Este incremento puede atribuirse a que los profesionales médicos conocen mejor dicha entidad clínica, a los mejores métodos de detección y al incremento en el uso de catéteres centrales^{4,5}. De todas formas, la verdadera incidencia de la enfermedad podría ser mayor, ya que frecuentemente es asintomática. Se ha descrito una prevalencia de 2 casos por cada 1.000 admisiones hospitalarias⁶.

De la misma forma que en las trombosis venosas profundas de miembros inferiores, las TVPMS constituyen una patología trombótica importante debido a su morbimortalidad⁷. Aunque inicialmente se creía que la gran mayoría eran benignas, estudios recientes han demostrado que pueden asociarse a un mayor número de tromboembolismos pulmonares de los que previamente se pensaba⁸⁻¹⁰. En la actualidad existen diversos aspectos no bien aclarados en esta patología trombótica, tales como el riesgo de desarrollar un síndrome posflebítico, el tiempo óptimo de anticoagulación, la conveniencia de profilaxis primaria en grupos de alto riesgo, así como el papel que los defectos trombofílicos hereditarios y/o adquiridos pueden desempeñar en la patogenia de la misma.

Respecto a los mecanismos patogénicos de la TVPMS, algunas consideraciones mecánicas deben ser tenidas en cuenta. En este sentido, varios factores explicarían el menor riesgo de trombosis venosa en las venas de las extremidades superiores respecto al sistema venoso iliofemoral de los miembros inferiores. En efecto, en pacientes con patología médica encamados, los brazos están generalmente menos inmovilizados que las piernas, por lo que las venas de los brazos sufren menor estrés gravitacional y por tanto menor estasis venosa. Adicionalmente, las fuerzas de cizallamiento sanguíneo son mayores en las venas de los miembros superiores, a la vez que carecen o poseen escasas válvulas venosas, que como es conocido representan áreas de máxima estasis. Por tanto, y debido a estos hechos, en el sistema venoso profundo de los miembros superiores, la acumulación de factores activados de la coagulación y consecuentemente los depósitos de fibrina, son menos proclives a producirse¹¹.

TVPMS primarias

Clásicamente, las TVPMS se clasifican en dos tipos: primarias y secundarias. Las primarias suelen presentarse en pacientes jóvenes y sanos, siendo responsables aproximadamente del 20% de todos los casos de TVPMS¹², con una incidencia de 2 por 100.000 personas/año. Las TVPMS primarias pueden ser idiopáticas o relacionadas con el esfuerzo.

TVPMS relacionadas con el esfuerzo

Se denominan como síndrome de Paget-Schroetter, afectan fundamentalmente a varones jóvenes activos, que realizan ejercicios vigorosos de sobrecarga del cuello y de los músculos del brazo (tenis, remo, béisbol, etc.), que potencian la musculatura de los escalenos anteriores, pudiendo por tanto comprimir a la vena subclavia al atravesar el estrecho espacio entre los componentes esqueléticos y musculares, afectando a la extremidad dominante en el 70% de los casos^{13,14}. La compresión venosa puede también ser debida a anomalías anatómicas, que afectan al estrecho torácico¹⁵. En cualquier caso, los esfuerzos vigorosos o de sobrecarga del miembro superior, por una práctica deportiva inusual, pueden producir TVPMS en individuos sin anomalías anatómicas ni factores predisponentes.

El hecho de incluir la trombosis de esfuerzo dentro de las primarias, como lo hacen la mayoría de los trabajos, supone a nuestro juicio una incorrecta clasificación, lo que puede generar confusiones cuando se valora la prevalencia de defectos trombofílicos en TVPMS, ya que esta es una causa de trombosis bien establecida y frecuente para esta localización trombótica.

TVPMS idiopáticas

Son aquellas que no se asocian a factores desencadenantes, ni enfermedad de base subyacente. Sin embargo, llama la atención que algunos autores¹⁶ consideran idiopáticas aquellas trombosis relacionadas con anticonceptivos, embarazos o fertilización *in vitro*, que son conocidos factores de riesgo trombótico, por lo que no deberían clasificarse como idiopáticas para evitar confusiones. En una cuarta parte de los pacientes¹⁷, las trombosis venosas idiopáticas pueden ser la primera manifestación de una neoplasia oculta, diagnosticándose cáncer de pulmón o linfomas dentro del primer año de seguimiento del paciente tras el episodio trombótico agudo.

La prevalencia de estados de hipercoagulabilidad en pacientes con TVPMS es incierta, ya que los estudios observacionales aportan resultados dispares. Por tanto, el detección de defectos trombofílicos en pacientes con dicha localización trombótica es controvertido, por lo que algunos autores estiman que su determinación no es coste-efectiva¹⁸. Dentro de las trombosis idiopáticas, aquellos pacientes con historia familiar de trombosis, recurrencia de abortos inexplicables o antecedentes personales de trom-

bosis venosa, son los más proclives a presentar alteraciones trombofílicas, lo que justificaría que ciertos autores¹⁹ aconsejen llevar a cabo los estudios de trombofilia sólo en estos casos especiales, o determinar sólo los factores trombofílicos más comunes, es decir, el factor V Leiden, la mutación G20210A de la protrombina, hiperhomocisteinemia y anticuerpos antifosfolípidos.

TVPMS secundarias

Las TVPMS secundarias constituyen aproximadamente el 80 % de todas las TVPMS asociándose principalmente a la presencia de catéteres centrales, neoplasias, cirugía previa, infección, marcapasos, insuficiencia renal, traumatismos, insuficiencia cardíaca, embarazo, anticonceptivos, enfermedad hepática, abuso de drogas, antecedentes de trombosis y drogas antineoplásicas^{4,7,20,21}. Suelen presentarse en pacientes mayores, con algún tipo de patología subyacente y no tienen predilección por ninguna extremidad.

Respecto a las TVPMS relacionadas con catéteres, éstas pueden estar presentes en el 72 % de los pacientes a los que se les coloca una vía central²¹, siendo diversos los factores relacionados con el catéter que pueden influir en la formación del trombo²²⁻²⁵, tales como la circunferencia, el tamaño, el tiempo de permanencia, el tipo, así como las características de la infusión liberada a través del catéter. Las TVPMS debidas a catéteres centrales son cada vez más prevalentes, ya que éstos se utilizan cada vez más en la práctica clínica habitual¹⁵. Se estima que entre el 13-35 % de pacientes que llevan catéter desarrollan trombosis venosa axilsubclavia, considerándose que la cateterización es responsable del 39 % de las trombosis venosas localizadas en la vena subclavia²⁶. Un estudio publicado recientemente²⁷ muestra que la asociación de factor V Leiden o la mutación G20210A de la protrombina, en pacientes con catéter, contribuye al desarrollo de trombosis, incrementando el riesgo casi tres veces.

En pacientes con cáncer, puede existir un estado de hipercoagulabilidad debido a alteraciones en los factores de la coagulación, a una moderada coagulación intravascular diseminada mediada por las células tumorales, o por estasis, debido a la compresión del tumor. Estos factores, solos o combinados con catéteres centrales, utilizados para administrar quimioterapia parenteral, predisponen a pacientes con cáncer al desarrollo de trombosis²⁸. Recientemente, Fijnheer et al²⁹ observan que el 54 % de pacientes portadores de factor V Leiden frente al 9 % de no portadores desarrollan trombosis de la subclavia tras colocación de catéter para trasplante de médula ósea alogénico, lo que supone un riesgo siete veces mayor, aconsejando llevar a cabo estudios genéticos en estos pacientes. Igualmente, en dos trabajos publicados en 2004 en pacientes con linfomas³⁰ y cáncer de mama³¹ con catéteres centrales, se aconseja igualmente determinar

las mutaciones trombofílicas más comunes, es decir, factor V Leiden, mutación G20210A de la protrombina y MTHFR (5-metil-tetrahidrofolato-homocisteína-S-metiltransferasa), dado el incremento del riesgo de trombosis en los portadores. En general, se observa una mayor incidencia de trombosis de la subclavia en pacientes con cáncer que llevan catéter, respecto a pacientes sin cáncer que también llevan catéter en la misma localización³². Las TVPMS espontáneas en pacientes con cáncer son infrecuentes en ausencia de catéteres venosos centrales, radioterapia o compresión extrínseca tumoral¹⁵.

La obesidad constituye un factor de riesgo independiente para la trombosis de miembros inferiores, y aunque los mecanismos protrombóticos en pacientes obesos no están totalmente establecidos, un aumento de fibrinógeno, triglicéridos, inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1), factor VII y resistencia a la proteína C activada (PCA) circulante, podrían estar implicados en su patogenia^{34,35}. Igualmente, la hiperlipidemia constituye un factor de riesgo independiente para la trombosis venosa profunda idiopática de miembros inferiores, incrementando casi tres veces el riesgo³⁵. Llama la atención que estos factores no hayan sido considerados en pacientes con TVPMS, por lo que convendría evaluarlos en futuros estudios.

El papel que desempeñan los anticonceptivos orales en la patogenia de la TVPMS no ha sido completamente evaluado en los diversos trabajos. Así, la prevalencia oscila entre 4 a 33 % cuando se considera el número total de pacientes incluidos en el estudio, incrementándose esta cifra a 47 % cuando se refiere sólo a las mujeres. Adicionalmente, estos porcentajes no se han calculado considerando el número de mujeres fértiles, excepto en el publicado por nuestro grupo³⁵, donde 13 de 25 mujeres fértiles en el grupo de trombosis primarias y 1 de 12 mujeres fértiles en el grupo de trombosis secundarias tomaban anticonceptivos, es decir, el 52 y el 8,3 % respectivamente, siendo el porcentaje de 38 % si se consideraran ambos grupos conjuntamente. En ninguno de los trabajos publicados, se especifica si los anticonceptivos eran de segunda o tercera generación, ni tampoco el tiempo transcurrido desde el inicio de la toma de los mismos hasta el evento trombofílico.

La prevalencia de otros factores circunstanciales de riesgo trombofílico en TVPMS tales como embarazo, puerperio, traumatismos, marcapasos, insuficiencia cardíaca, cirugía o infección, es menor.

Gran parte de los estudios llevados a cabo en pacientes con TVPMS relacionados con catéter, neoplasia o estrecho torácico, carecen de un estudio simultáneo de hipercoagulabilidad sanguínea, ya que la mayor parte de autores asumen que estas causas tienen por sí mismas suficiente "potencial protrombótico" como para no precisar de estados de hipercoagulabilidad adicionales, que potencien el desarrollo de eventos trombofílicos.

Tabla 1. Prevalencia de factores de riesgo circunstanciales y criterios de exclusión en pacientes con trombosis venosa profunda de miembros superiores

<i>Autor/año</i>	<i>Diseño estudio</i>	<i>Pacientes</i>	<i>Grupo control</i>	<i>TVPMS Factores de riesgo excluidos</i>	<i>TVPMS Clasificación según los autores</i>	<i>Factores de riesgo circunstanciales n (%)</i>	
Ruggeri et al ⁴¹ 1997	Descriptivo	27	No	Catéter	9 idiopáticas 18 secundarias	Esfuerzo Cáncer Marcapasos Estrecho torácico Trauma AO Total	10 (37,0) 3 (11,1) 1 (3,7) 1 (3,7) 3 (11,1) NR 18 (66,6)
Prandoni et al ³⁶ 1997	Descriptivo	27	31 TVPMS No confirmadas	Ninguno	-	Esfuerzo Cáncer AO Catéter Total	3 (11,1) 6 (22,2) 1 (12,5) 8 (28,6) 18 (66,6)
Martinelli et al ¹⁸ 1997	Caso control	36	108 sanos 162 TVPMI	Cáncer Trauma E. autoinmune Abuso drogas Catéter E. renal/hepática ICC	Primarias	Esfuerzo Trauma Cirugía AO Total	6 (16,6) 3 (8,3) 1 (2,7) 4 (11,1) 14 (38,8)
Marie et al ³⁸ 1998	Descriptivo	49	No	Ninguno	Primarias Secundarias	Esfuerzo Cáncer Catéter Estrecho torácico Trauma ICC Posparto AO Total	5 (10,2) 16 (32,7) 8 (16,3) 6 (12,3) 2 (4,1) 2 (4,1) 1 (2,0) 1 (2,0) 41 (83,7)
Hingorani et al ³⁷ 2000	Descriptivo	52	No	E. hepática Quimioterapia	-	Catéter Cáncer Marcapasos TVPMI AO Total	25 (48,0) 14 (26,9) 4 (7,7) 7 (13,4) NR 50 (96,1)
Ellis et al ⁴² 2000	Descriptivo	18	20 TVPMI	Catéter Trauma Estrecho torácico	Espontáneas	Esfuerzo Cáncer Embarazo AO Total	2 (11,1) 1 (5,5) 4 (22,2) 4 (22,2) 11 (61,0)
Heron et al ¹⁶ 2000	Descriptivo	51	No	E. renal/hepática Catéter Trauma Cáncer Marcapasos Abuso drogas	20 esfuerzo 31 idiopáticas	AO FIV Embarazo + FIV AO Total	3/51 (5,9) 3/20 (15,0) 1/51 (1,9) 1/31 (3,2) 3/51 (5,9) 3/31 (9,7) 11/25 (44,0) 18 (35,3)
Leebeck et al ³⁹ 2001	Descriptivo	41	No	Ninguno	10 espontáneas (idiopáticas) 31 secundarias	Esfuerzo Catéter + cáncer Cáncer Trauma AO Total	4 (9,8) 17 (41,4) 4 (9,75) 1 (2,4) 4/18 (22,2) 30 (73,1)

(continúa)

Tabla 1. Prevalencia de factores de riesgo circunstanciales y criterios de exclusión en pacientes con trombosis venosa profunda de miembros superiores (continuación)

Autor/año	Diseño estudio	Pacientes	Grupo control	TVPMS Factores de riesgo excluidos	TVPMS Clasificación según los autores	Factores de riesgo circunstanciales n (%)	
Bombeli et al ⁴⁰ 2002	Caso control	99	120 sanos	Ninguno 292 TVMI	-	Esfuerzo	8 (8,0)
						Cáncer	7 (7,0)
						Catéter	35 (35,0)
						Cirugía	25 (25,0)
						Inmovilización	2 (2,0)
						Trauma	4 (4,0)
						Escayola	1 (1,0)
						Embarazo	1 (1,0)
						AO	14/59 (3,7)
Total	97 (98,9)						
Vayá et al ³⁵ 2003	Caso control	79	165 sanos	Cáncer Infecciones E. autoinmune E. renal/hepática Abuso de drogas	48 primarias 31 secundarias	Esfuerzo	8/79 (10,1)
							8/48 (16,6)
						AO	13/28 (46,4)
						Catéter	23/79 (29,1)
							23/31 (74,2)
						Trauma	3/79 (3,8)
							3/31 (9,7)
						Estrecho torácico	3/79 (3,8)
							3/31 (9,7)
						Marcapasos	2/79 (2,5)
							2/31 (6,4)
AO	1/16 (6,2)						
Total	53 (67,0)						

AO: anticonceptivos orales % calculado en relación con el número total de mujeres incluidas en el estudio; TVPMI: trombosis venosa profunda de miembros inferiores; NR: no referido; ICC: insuficiencia cardíaca congestiva; FIV: fertilización in vitro.

Dado que nuestro principal interés va encaminado a conocer las causas de riesgo trombotico en TVPMS, hemos analizado en las tablas 1 y 2, aquellos trabajos donde se valoran simultáneamente, tanto los factores clínicos circunstanciales, como los defectos analíticos trombofílicos, para así poder conocer mejor la contribución de ambos en la patogenia de los eventos tromboticos en dicha localización. En estos trabajos, la prevalencia de esfuerzo como factor de riesgo de TVPMS ha oscilado entre un 8 a un 37%. En ellos, solamente el de Heron et al¹⁶ especifican minuciosamente el tipo de esfuerzo (ocupacional, actividades físicas deportivas habituales y actividades físicas vigorosas inusuales). En algunas ocasiones, como este autor sugiere, este factor de riesgo puede ser infravalorado, como ocurre cuando se trata de esfuerzos físicos vigorosos ocasionales, siendo conveniente efectuar una minuciosa historia clínica con relación a posibles esfuerzos inusuales en la semana previa al inicio del cuadro trombotico. La prevalencia de catéteres oscila entre 16-48%³⁶⁻⁴⁰, cuando se incluyen los pacientes con cáncer. En nuestra experiencia³⁵, cuando consideramos sólo las trombosis secundarias (siendo el cáncer un criterio de exclusión), el porcentaje de catéteres llega a ser

incluso del 74%, coincidiendo con Martinelli et al¹¹, en que el catéter es el factor de riesgo más prevalente en las TVPMS. La prevalencia de cáncer como factor de riesgo de TVPMS oscila entre un 5,5 y 32%, si bien en la mayoría de los estudios no se especifica si los pacientes con cáncer llevan adicionalmente catéter³⁷⁻⁴². Sólo el estudio de Leebeck et al³⁹ valora el cáncer como un factor de riesgo aislado o en combinación con catéteres venosos centrales, siendo la prevalencia de 10 o 41%, respectivamente, lo que reafirmaría que el cáncer aislado no es un factor de riesgo muy común en ausencia de catéteres venosos centrales.

En conclusión, observamos que la mayor parte de TVPMS se asocian a factores de riesgo circunstanciales, siendo los catéteres el factor de riesgo más prevalente. En aquellos estudios en que la presencia de catéter es un criterio de exclusión^{16,18,41,42}, se detectan factores circunstanciales de riesgo en el 35-67% de los pacientes. Cuando sólo se considera el cáncer como criterio de exclusión, pero no el catéter, los factores de riesgo circunstanciales están presentes en el 67% de los pacientes³⁵. Cuando no existen criterios de exclusión, la prevalencia de factores circunstanciales desencadenantes aumenta, oscilando

Tabla 2. Prevalencia de alteraciones hereditarias y adquiridas de la coagulación en pacientes con trombosis venosa profunda de miembros superiores

Autor (año; n = pacientes)	Criterios inclusión TVPMS	AT n (%)	PC n (%)	PS n (%)	R-PCa n (%)	FVL n (%)	G20210A n (%)	Total defectos adquiridos AAC n (%)	Total defectos hereditarios n (%)	Total defectos trombofílicos n (%)
Ruggeri et al ⁴¹ (1997; n = 27)	Todas	0 (0)	1 (3,7)	0 (0)	1 (3,7)	1 (3,7)	ND	4 (14,8)	2 (7,4)	6 (22,2)
Prandoni et al ³⁶ (1997; n = 27)	Todas	1 (3,7)	2 (7,4)	1 (3,7)	2 (7,4)	ND	ND	1 (3,7)	6 (22,2)	7 (25,9)
Martinelli et al ¹⁸ (1997; n = 36)	Primarias	0 (0)	0/34 (0)	0/34 (0)	3 (8,3)	3 (8,3)	ND	2 (5,8) ^d	3 (8,8)	5/34 (15,0)
Marie et al ³⁸ (1998; n = 49)	Todas	0/21 (0)	0/21 (0)	1/21 (4,8)	1/21 (4,8)	ND	ND	2/21 (9,5)	2 (9,5)	4/21 (19,0)
Hingorani et al ³⁷ (2000; n = 52)	Todas	8/29 (27,6)	1/29 (3,4)	0/29 (0)	5/29 (17,2)	5/29 (17,2)	ND	3/29 (10,3)	14/29 (48,3)	17/29 (58,6)
Ellis et al ⁴² (2000; n = 18)	Espontáneas 20 esfuerzo	0 (0) 0 (0)	0 (0) 0 (0)	0 (0) 0 (0)	9 (50,0) ^b ND	ND 1 (5,0)	ND 0 (0)	4 (22,2) ^c 2 (10,0)	9 (50,0) 6 (11,7)	11 (61,1) 3/51 (5,9) 3/20 (15,0)
Heron et al ¹⁶ (2000; n = 51)	31 idiopáticas	0/30 (0)	0/27 (0)	2/27 (7,4) ^d	ND	4/27 (14,8) ^e	0 (0)	9 (29,0) ^f		13/51 (25,4) 13/31 (41,9)
Leebeck et al ³⁹ (2001; n = 41)	Todas	1 (2,4)	0/31 (0)	0/31 (0)	ND	2 (4,8)	0 (0)	6 (14,6) ^g AL 5 (12,1)	3 (7,3)	13 (31,7)
Bombeli et al ⁴⁰ (2002; n = 99)	Todas 48 primarias	1 (1,0) 0 (0)	2 (2,0) 0 (0)	2 (2,0) 0 (0)	25 (25,3) 0(0)	25 (25,3) 0 (0)	4/55 (7,3) 6 (12,5)	ND 4 (8,3)	34 (34,3) 12 (15,2)	34 (34,3) 10/79 (12,6) 10/48 (20,8)
Vayá et al ³⁵ (2003; n = 79)	31 secundarias	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (9,7)	3 (9,7)	2 (6,5)		8/79 (10,1) 8/31 (25,8)

AL: anticoagulante lipídico; AAC: anticuerpos anticardiolipinas; a2: pacientes con hiperhomocisteinemia; ^bn = 7 R-PCa aislado (38,9%) n = 2 R-PCa + AAC (11%); ^cn = 2 AAC aislado (11%) n = 2 R-PCa + AAC (11%); ^dn = 1 asociado a FVL; ^en = 1 asociado a PS; ^fn = 1 asociado a FVL, n = 1 asociado a AL; ^gn = 1 asociado a FVL.

su prevalencia entre un 66 a 99 %^{36,38-40}. Este dato demuestra que las TVPMS idiopáticas son extremadamente raras, y que en gran parte los factores de riesgo circunstanciales coinciden con los de las trombosis de miembros inferiores, menos las relacionadas con el esfuerzo, que constituyen un factor de riesgo protrombótico patognomónico para esta localización trombótica.

Factores analíticos de hipercoagulabilidad en TVPMS

La asociación entre hipercoagulabilidad sanguínea y trombosis venosa profunda de miembros inferiores ha sido ampliamente estudiada, siendo la prevalencia de defectos trombofílicos hereditarios o adquiridos aproximadamente de un 30 % en pacientes no seleccionados^{43,44}, mientras que son escasos los estudios que valoran la prevalencia de alteraciones trombofílicas hereditarias y adquiridas, así como el riesgo asociado en TVPMS.

En la revisión de los trabajos que valoran la prevalencia de defectos trombofílicos en TVPMS, recogidos en la tabla 2, destaca la alta variabilidad de la misma, siendo del 22⁴¹ %, 26³⁶ %, 15¹⁸ %, 19³⁸ %, 58³⁷ %, 61⁴² %, 15 % y 42 %, según se trate de trombosis relacionada con esfuerzo o idiopáticas¹⁶; 32³⁹ %, 34⁴⁰ % y 21 % en trombosis primarias y del 26 % en trombosis secundarias³⁵. Esta disparidad de resultados puede atribuirse a los distintos criterios de inclusión de los pacientes, ya que Leebeck et al³⁹ incluyen un alto número de éstos con cáncer y quimioterapia, donde como es sabido, el porcentaje de anticuerpos anticardiolipina (AAC) es muy elevado^{45,46}. Otro motivo que justifica la disparidad de resultados es la clasificación de los pacientes, ya que la prevalencia de defectos puede variar según se trate de trombosis primaria-secundaria³⁵, esfuerzo-idiopática¹⁶ o se las considere conjuntamente. El hecho de que en los distintos estudios las pruebas de hipercoagulabilidad de laboratorio efectuadas no coincidan, puede ser también motivo de las discrepancias, ya que por ejemplo, Martinelli et al¹⁸ consideran la hiperhomocisteinemia como factor de riesgo de hipercoagulabilidad adquirido, parámetro que no es determinado en ninguno de los demás estudios. A la vez, no a todos los pacientes se les determinan todos los parámetros trombofílicos. Así, la proteína C y la proteína S sólo la determinan en 21 de 49³⁸, en 29 de 52³⁷ y en 31 de 41 casos³⁹. Adicionalmente, la mayor parte de los estudios incluyen un escaso número de pacientes, ya que se trata de una localización trombótica inusual, a la vez que se trata de estudios descriptivos que carecen en su mayor parte de un grupo control, con lo que dada la distinta prevalencia de factor V Leiden y de la mutación G20210A de la protrombina en las distintas áreas geográficas europeas⁴⁷ no permite calcular el riesgo. El momento en el que se realiza el estudio (tiempo transcurrido desde el episodio

trombótico) conlleva a que los resultados de algún estudio³⁷ sean cuestionables. Otro factor a tener en cuenta es qué títulos de AAC se han considerado para incluir a un paciente como positivo, ya que como es sabido, sólo títulos elevados y que persisten en el tiempo deben considerarse positivos.

La prevalencia de defectos en los inhibidores fisiológicos de la coagulación en TVPMS es baja^{39,41}, habiendo algunos estudios donde no se ha encontrado ningún portador de dichas anomalías^{18,35,42}. El porcentaje sorprendentemente elevado de deficiencias de proteína C en el estudio de Prandoni et al³⁶ y de proteína S, en el grupo de idiopáticas de Heron¹⁶, podría ser un problema del azar, dado el escaso número de pacientes incluidos en el estudio. Igualmente, Hingorani et al³⁷, que observan una prevalencia de déficit de antitrombina del 27 %, probablemente se deba a que el estudio se hizo en fase aguda y algunos pacientes estaban siendo tratados con heparina, por lo que este dato es poco fiable.

Respecto al factor V Leiden, en la mayoría de los estudios europeos^{18,35,39,41}, su prevalencia oscila entre 3,7-8,3 %, siendo similar a la observada en la población normal. Heron et al¹⁶ encuentran una prevalencia del 15 % (4 de 27 pacientes) cuando consideran sólo las trombosis idiopáticas, aunque este dato es poco valorable, ya que no determina la prevalencia de dicha mutación en un grupo control. En el trabajo de Bombelli et al⁴⁰, donde se valoran los defectos trombofílicos no sólo en miembro superior, sino en diversas localizaciones trombóticas, la prevalencia de factor V Leiden es de 25,3 % frente a 6,7 % en controles, valores similares a los hallados en trombosis de miembros inferiores, 27 %. Es importante destacar que algunos autores⁴² no han determinado la mutación genética, sino la resistencia a la PCA. Así, en este estudio, 4 de las 18 pacientes estaban embarazadas y 4 tomaban anticonceptivos, lo que puede justificar la presencia de dicha resistencia en el 50 % de los pacientes. Una situación similar podría ocurrir en los pacientes del trabajo de Prandoni et al³⁶ que tampoco valora esta mutación genética.

Respecto a la mutación G20210A de la protrombina, conviene destacar que no se ha determinado en la mayoría de los estudios^{18,36-38,41,42}, existiendo sólo 4 con información al respecto^{16,35,39,40}. Los estudios de Heron et al¹⁶ y Leebeck et al³⁹ no detectan ningún portador, si bien carecen de grupo control. Igualmente Bombelli et al en Suiza⁴⁰ tampoco observan una mayor prevalencia de dicha mutación respecto al grupo control, aunque sólo la determinan en 55 de los 99 pacientes incluidos en el estudio. Dado que en el norte de Europa la prevalencia de dicha mutación es menor que en el sur⁴⁷, esta diferente distribución geográfica podría en parte explicar los resultados. Así pues, en el estudio de Vayá et al³⁵ efectuado en el mediterráneo español, se observa una mayor prevalencia de dicha mutación, ya que

6 de 48 (12,5%) TVPMS primarias frente a 6 de 165 controles, eran portadores, acompañándose de un riesgo 3,8 veces superior ($p = 0,031$; *odds ratio* [OR], 3,76; intervalo de confianza del 95% [IC 95%], 1,15-12,26). En este sentido, es un hecho bien conocido que la mutación G20210A de la protrombina es el factor hereditario trombofílico más prevalente en la población sana española y en pacientes con trombosis^{48,49}. En el mencionado estudio, la interacción de la mutación G20210A de la protrombina y los anticonceptivos aumentaban marcadamente el riesgo, indicando un efecto sinérgico como ocurre en otras localizaciones trombóticas⁴⁹⁻⁵¹.

Respecto a las alteraciones adquiridas de la coagulación determinantes de hipercoagulabilidad en TVPMS, en la mayor parte de los estudios se ha encontrado una alta prevalencia de AAC y/o lupus anticoagulante, siendo los más altos en orden creciente el de Ruggeri et al⁴¹ 14,8%, Ellis et al⁴² 22%, Heron et al¹⁶ 29%, cuando sólo se consideran las trombosis idiopáticas y Leebeck et al³⁹ 26,7%, seguidos de los estudios de Marie et al³⁸ 9,5%, Hingorani et al³⁷ 10%, Heron et al¹⁶ 10% en las trombosis relacionadas con esfuerzo y Vayá et al³⁵ 8,3% en las trombosis primarias. Los títulos especialmente elevados observados en el trabajo de Leebeck et al³⁹ podrían atribuirse a que muchos pacientes presentaban enfermedades hematológicas que frecuentemente se asocian a la presencia de anticuerpos antifosfolípidos^{45,46}, aunque también la alta prevalencia en el resto de estudios que excluyen el cáncer, sugiere que los títulos elevados y mantenidos de AAC constituyen un importante factor de riesgo para dicha localización trombótica. En nuestra experiencia³⁵ en las TVPMS primarias, el riesgo asociado a AAC es casi 5 veces mayor (OR, 4,88; IC 95%, 1,05-22,61).

En conclusión, el impacto de los factores circunstanciales en la génesis de TVPMS parece ser igual o más importante que la presencia de los defectos trombofílicos, como se desprende del alto porcentaje de trombosis con factores de riesgo asociados (3/4 partes de los pacientes), ya que en aquellos trabajos que clasifican a las trombosis como espontáneas o idiopáticas, éstas también se asocian a conocidos factores de riesgo trombótico, tales como embarazo y anticonceptivos. La prevalencia de déficit de inhibidores de la coagulación en esta localización trombótica es baja y en general menor que la observada en trombosis de miembro inferior. La prevalencia de factor V Leiden y de la mutación G20210A de la protrombina es difícil de evaluar, dado el escaso número de pacientes incluidos en los diversos estudios, y la distinta prevalencia de dichos defectos en las distintas áreas geográficas europeas. En cambio, la prevalencia de anticuerpos anticardiolipina, en general es alta y comparable a las obtenidas en trombosis de miembro inferior⁵².

Basándose en todo lo expuesto, parece razonable en pacientes con TVPMS no determinar los niveles de

los inhibidores fisiológicos de la coagulación anti-trombina, proteína C y proteína S, aunque sí de AAC. En cambio, dados los resultados dispares respecto a la prevalencia de factor V Leiden y mutación G20210A de la protrombina para esta localización trombótica, son necesarios estudios multicéntricos que incluyan un mayor tamaño muestral. Mientras no se disponga de estos datos, no parece desaconsejable determinar ambas mutaciones con independencia de que existan o no factores de riesgo circunstanciales asociados, y especialmente en los grupos de alto riesgo como pacientes oncohematológicos o aquellos a los que se les vaya a colocar un catéter central, con la finalidad de administrar profilaxis antitrombótica y disminuir así el riesgo de trombosis.

Bibliografía

- Horattas MC, Wright DJ, Fenton AH, Evans DM, Oddi MA, Kamienski RW, et al. Changing concepts of deep venous thrombosis of the upper extremity: Report of a series and review of the literature. *Surgery* 1988;104:561-7.
- Paget J. *Clinical Lectures and Essays*. London, Longmans, Green, and Co, 1875.
- Von Schroetter L. *Nothnagel Handbuch der Pathologie und Therapie*. Vienna: Holder, 1884.
- Burhan E, De Figueiredo LF, Francisco J Jr, Miranda F Jr. Upper-extremity deep venous thrombosis: Analysis of 52 cases. *Cardiovasc Surg* 1993;1:19-22.
- Monreal M, Davant E. Thrombotic complications of central venous catheters in cancer patients. *Acta Haematol* 2001;106:69-72.
- Kröger K, Schelo C, Gocke C, Rudofsky G. Colour doppler sonographic diagnosis of upper limb venous thromboses. *Clin Sci (Lond)* 1998;94:657-61.
- Hingorani A, Ascher E, Hanson J, Scheiman M, Yorkovich W, Lorenson E, et al. Upper extremity versus lower extremity deep vein thrombosis. *Am J Surg* 1997;214-7.
- Prandoni P, Polistena P, Bernardi E, Cogo A, Casara D, Verlato F, et al. Upper-extremity deep vein thrombosis: risk factors, diagnosis, and complications. *Arch Intern Med* 1997;157:57-62.
- Monreal M, Lafoz E, Ruiz J, Valls E, Alastrue A. Upper extremity deep venous thrombosis and pulmonary embolism: a prospective study. *Chest* 1991;99:280-3.
- Ault M, Artal R. Upper extremity DVT: what is the risk? *Arch Intern Med* 1998;158:1950-1.
- Martinelli J. Unusual forms of venous thrombosis and thrombophilia. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002;32:343-5.
- Hughes ESR. Venous obstruction in the upper extremity. *Br J Surg* 1999;36:155-63.
- Sheeran SR, Hallisey MJ, Murphy TP, Faberman RS, Sherman S. Local thrombolytic therapy as part of multidisciplinary approach to acute axillosubclavian vein thrombosis (Paget-Schroetter syndrome). *J Vas Interv Radiol* 1997;8:253-60.
- Rutherford RB. Primary subclavian-axillary vein thrombosis: the relative roles of thrombolysis, percutaneous angioplasty, stents, and surgery. *Semin Vas Surg* 1998;11:91-5.
- Komreddy A, Zroukian MH, Hassouna HI. Upper extremity deep venous thrombosis. *Semin Thromb Haemost* 2002;28:89-99.
- Heron E, Lozquez O, Alhenc-Gelas M, Emmerich J, Fiessinger JN. Hypercoagulable states in primary upper-extremity deep vein thrombosis. *Arch Intern Med* 2000;160:382-6.
- Girolami A, Prandoni P, Zanon, Bagatella P, Girolami B. Venous thromboses of upper limbs are more frequently associated with occult cancer as compared with those of lower limbs. *Blood Coag Fibrinol* 1999;10:455-7.
- Martinelli I, Cattaneo M, Panzeri D, Taioli E, Mannucci PM. Risk factors for deep venous thrombosis of the upper extremities. *Ann Intern Med* 1997;126:707-11.
- Joffe HV, Goldhaber SZ. Upper extremity deep vein thrombosis. *Circulation* 2002;106:1874-80.
- Carman TL, Fernández BB Jr. Issues and controversies in venous thromboembolism. *Cleve Clin J Med* 1999;66:113-23.
- Marinella MA, Kathula SK, Markert RJ. Spectrum of upper-extremity deep venous thrombosis in a community teaching hospital. *Heart Lung* 2000;29:113-7.
- McDonough JJ, Altemeier WA. Subclavian venous thrombosis secondary to indwelling catheters. *Surg Gynecol Obstet* 1971;133:397-400.
- Welch GW, Mckee DW Jr, Silverstein P, Walker HL. The role of catheter composition in the development of thrombophlebitis. *Surg Gynecol Obstet* 1974;138:421-4.

24. Ross AH, Griffith CD, Anderson JR, Grieve DC. Thromboembolic complications with silicone elastomer subclavian catheters. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1982;6:61-3.
25. Martin C, Viviani X, Saux P, Gouin F. Upper-extremity deep vein thrombosis after central venous catheterization via the axillary vein. *Crit Care Med* 1999;27:2626-9.
26. Reed JD, Harman JT, Harris V. Regional fibrinolytic therapy for iatrogenic subclavian vein thrombosis. *Semin Intervent Radiol* 1992;9:183-9.
27. Van Rooden CJ, Rosendaal FR, Meinders AE, Van Oostayen JA, Van der Meer FJM, Huisman MV. The contribution of factor V Leiden and prothrombin G20210A mutation to the risk of central venous catheter-related thrombosis. *Haematologica* 2004;89:201-6.
28. Arkel YS. Thrombosis and cancer. *Semin Oncol* 2000;27:362-74.
29. Fijnheer R, Pajmans B, Verdonck LF, Nieuwenhuis HK, Roest M, Dekker AW. Factor V Leiden in central venous catheter associated thrombosis. *Br J Haematol* 2002;118:267-70.
30. Di Mico P, Niglio A, De Renzo A, Lucania A, Di Fiore R, Sludiero O, et al. Congenital and acquired thrombotic risk factors in lymphoma patients bearing upper extremities deep venous thrombosis: a preliminary report. *J Transl Med* 2004;2:7.
31. Mandala M, Curigliano G, Bucciarelli P, Ferretti G, Manucci PM, Colleoni M, et al. Factor V Leiden and G20210A prothrombin mutation and the risk of subclavian vein thrombosis in patients with breast cancer and central venous catheter. *Ann Oncol* 2004;15:590-3.
32. Whigham CJ, Greenbaum MC, Fisher RG, Goodman CJ, Thomby JI. Incidence and management of catheter occlusion implantable armports: results in 391 patients. *J Vasc Interv Radiol* 1999;10:767-74.
33. Vayá A, Mira Y, Ferrando F, Contreras MT, Estellés A, España F, et al. Hyperlipidaemia and venous thromboembolism in patients lacking thrombophilic risk factors. *Br J Haematol* 2002;118:255-9.
34. Juhán-Vague I, Alessi M. PAI-1 obesity, insulin resistance and risk of cardiovascular events. *Thromb Haemost* 1997;78:656-60.
35. Vayá A, Mira Y, Mateo J, Falcó C, Villa P, Estellés A, et al. Prothrombin G20210A mutation and oral contraceptive use increase upper-extremity deep vein thrombotic risk. *Thromb Haemost* 2003;89:452-7.
36. Prandoni P, Polistena P, Bernardi E, Cogo A, Casara D, Verlato F, et al. Upper extremity deep vein thrombosis. *Arch Intern Med* 1997;157:57-62.
37. Hingorani A, Ascher E, Yorkovich W, Mazzarioli F, Jacob T, Gunduz Y, et al. Upper extremity deep venous thrombosis: An underrecognized manifestation of a hypercoagulable state. *Ann Vasc Surg* 2000;14:421-6.
38. Marie I, Lévesque H, Cailleux N, Primrd E, Peillon C, Watelet J, Courtois H. Les thromboses veineuses profondes des membres supérieurs. A propos de 49 cas. *Rev Med Interne* 1998;19:399-408.
39. Leebeck FWG, Stadhouders NAM, Van Stein D, Gómez-García EB, Kappers-Klunne MC. Hypercoagulability states in upper-extremity deep venous thrombosis. *Am J Hematol* 2001;67:15-9.
40. Bombeli Th, Basic A, Fehr J. Prevalence of hereditary thrombophilia in patients with thrombosis in different venous systems. *Am J Hematol* 2002;70:126-32.
41. Ruggeri M, Castaman G, Tosetto A, Rodeghiero F. Low prevalence of thrombophilic coagulation defects in patients with deep vein thrombosis of the upper limbs. *Blood Coagul Fibrinol* 1997;8:191-4.
42. Ellis MH, Manor Y, Witz M. Risk factors and management of patients with upper limb deep vein thrombosis. *Chest* 2000;117:43-6.
43. Bertina RM. Genetic approach to thrombophilia. *Thromb Haemost* 2001;86:92-103.
44. Rodeghiero F, Tosetto A. The epidemiology of inherited thrombophilia: the VITA project. *Thromb Haemost* 1997;78:636-40.
45. Ciaudio M, Horellu MH, Audouin J, De Carbonnières C, Conard J, Samama M. Lupus anticoagulant associated with primary malignant lymphoplasmacytic lymphoma of the spleen: a report of four patients. *Am J Hematol* 1991;38:271-6.
46. Onida P, Tresoldi M, Rugarli C. Anti-phospholipid antibody syndrome associated with peripheral T-cell lymphoma. *Am J Hematol* 1997;55:167-8.
47. Rosendaal FR, Doggen JM, Zivelin A, Arruda VR, Aiach M, Siscovick DS, et al. Geographic distribution of the 20210G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost* 1998;79:706-8.
48. Souto JC, Coll I, Lobet D, Del Río E, Oliver A, Mateo J, et al. The prothrombin 20210A allele is the most prevalent genetic risk factor for venous thromboembolism in the Spanish population. *Thromb Haemost* 1998;80:366-9.
49. Aznar J, Vayá, Estellés A, Mira Y, Seguí R, Villa P, et al. Risk of venous thrombosis in carriers of the prothrombin G20210A variant and factor V Leiden and their interaction with oral contraceptives. *Haematologica* 2000;85:1271-6.
50. Martinelli I, Taioli E, Bucciarelli P, Akhavan S, Mannucci PM. Interaction between the G20210A mutation of the prothrombin gene and oral contraceptive use in deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:700-3.
51. Emmerich J, Rosendaal FR, Cattaneo M, Margaglione M, De Stefano V, Cumming T, et al. Combined effect of factor V Leiden and prothrombin 20210A on the risk of venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2001;86:809-16.
52. Eschwège V, Peynaud-Debayle E, Wolf M, Amiral J, Vissac AM, Bridey F, et al. Prevalence of antiphospholipid-related antibodies in unselected patients with history of venous thrombosis. *Blood Coagul Fibrinol* 1998;9:429-34.

TROMBOFILIA: RESULTADOS EN LOS PACIENTES DEL RIETE

R. LECUMBERRI¹, R. GUTIÉRREZ², E. ROCHA¹
Y LOS INVESTIGADORES DEL RIETE

¹Servicio de Hematología. Clínica Universitaria de Navarra. Pamplona. ²Servicio de Hematología. Hospital de Valme. Sevilla.

Introducción

El tromboembolismo venoso (TEV) es un trastorno frecuente en la sociedad occidental, con una incidencia aproximada de un caso por cada 1.000 habitantes y año. Hoy en día el TEV es considerado como una enfermedad de etiología multifactorial, que se origina por la conjunción de diversas causas, congénitas y adquiridas, que confluyen en un momento concreto en un paciente. Normalmente existe una causa desencadenante, no siempre evidente, que se suma a una combinación de factores, más o menos permanentes, que predisponen al sujeto a padecer un TEV.

Son muchos los factores de riesgo de trombosis venosa que se conocen en la actualidad: edad, inmovilización, traumatismos, intervenciones quirúrgicas, neoplasias, consumo de determinados fármacos (anticonceptivos orales, terapia hormonal sustitutiva, antipsicóticos, talidomida), viajes prolongados (el conocido como síndrome de la clase turista), o el embarazo y puerperio, entre otros.

Pero además existen alteraciones en el propio sistema hemostático, tanto congénitas como adquiridas, que condicionan la aparición de un estado trombofílico.

Hasta hace pocos años era posible identificar un factor de riesgo biológico de trombosis en un número muy limitado de pacientes con trombosis. Las deficiencias congénitas de diversas proteínas con acción anticoagulante, antitrombina, proteína C y proteína S, se habían asociado con un incremento del riesgo de trombosis. Sin embargo, su prevalencia en la población general es muy baja, y en pacientes con TEV apenas se identificaban en un 5% de los casos¹. A partir de la descripción del fenómeno de resistencia a la proteína C activada en 1993, y poco más tarde del defecto molecular responsable en muchos de los casos de dicho fenómeno (el factor V Leiden)² se abrió un apasionante campo de investigación que desembocó en la identificación de otros defectos asociados con un aumento del riesgo trombotico (mutación G20210A de la protrombina, hiperhomocisteinemia, niveles plasmáticos elevados de factores VIII y IX, etc.). Estas alteraciones tienen una prevalencia mucho mayor en la población general, y en la actualidad es posible identificar algún factor de riesgo biológico en un número sustancial de pacientes con trombosis venosa³.

Estudio de trombofilia: un debate abierto

Las técnicas empleadas en el diagnóstico de una trombofilia venosa no son ni simples ni baratas, por lo que resulta imprescindible definir a qué sujetos se le debe realizar dicho estudio, y qué pruebas deben ser incluidas en el mismo. La indicación de la realización de una detección de trombofilia ha sido y continúa siendo en la actualidad motivo de debate en la literatura científica^{4,5}.

Existe unanimidad en la ausencia de utilidad de estudiar a individuos sin historia personal ni familiar de TEV. Un ejemplo típico es la detección en mujeres sanas con anterioridad a la iniciación de tratamiento con anticonceptivos orales. Se calcula que para prevenir la aparición de un episodio anual de TEV sería necesario suspender la anticoncepción oral en 400 portadoras asintomáticas del factor V Leiden; para ello, sería necesario realizar la detección de aproximadamente 10.000 mujeres⁶. Parece evidente que esta estrategia dista mucho de ser coste-efectiva.

Mayor controversia existe a la hora de plantearse el estudio en pacientes que han desarrollado un episodio de TEV. La principal fuente de discusión se deriva del hecho de si los resultados del estudio de trombofilia pueden implicar modificaciones en el tratamiento de estos pacientes, especialmente en la duración del mismo. Los datos existentes sobre un posible aumento del riesgo de recurrencia asociado a la trombofilia no han sido uniformes en los distintos estudios. Posibles explicaciones para estas discrepancias radicarían en diferencias en los distintos estudios en cuanto a la localización inicial de la trombosis, tipo de tratamiento agudo y duración de la profilaxis secundaria, tipo de seguimiento (prospectivo o retrospectivo), tamaño de la muestra y duración del seguimiento⁷.

Otro argumento a favor de la realización del estudio de trombofilia a pacientes con TEV es que la identificación de algún defecto, podría ayudar en la decisión de realizar profilaxis primaria en los familiares asintomáticos portadores del defecto en caso de exposición a factores de riesgo transitorios^{8,9}.

Con todo, existen opiniones en la literatura especializada que abogan por no realizar ningún estudio ante un primer episodio de trombosis venosa excepto en casos muy excepcionales (individuos muy jóvenes, trombosis muy extensas, historia familiar evidente)¹⁰.

Trombofilia y recurrencia de TEV

La identificación de algún defecto trombofílico por lo general no implica ninguna variación en el tratamiento inicial del paciente con trombosis venosa. El tratamiento habitual de los pacientes con TEV consiste en anticoagulación durante 3 a 6 meses, dependiendo de si el episodio fue secundario a algún factor de riesgo transitorio o espontáneo. Sin embargo, una vez finalizado el tratamiento anticoagulante, la incidencia acumulada de recurrencia a los

5 años es aproximadamente del 25%¹¹. La continuación del tratamiento disminuye la incidencia de recurrencias durante el mismo, pero a costa de un incremento en la incidencia de hemorragias. Pero además, se ha observado que el beneficio observado con la prolongación de la anticoagulación no se mantiene tras la suspensión del mismo^{12,13}. Si alguna de las alteraciones incluidas en el estudio de hipercoagulabilidad supusiera un aumento del riesgo de recurrencia trombótica cabría plantearse la prolongación del tratamiento en los portadores de las mismas. De hecho, la ACCP en su última conferencia consenso recomienda mantener la anticoagulación por períodos prolongados en pacientes con síndrome antifosfolípido o con deficiencia de antitrombina¹⁴.

Recientemente, un estudio prospectivo mostraba que la presencia o ausencia de una trombofilia hereditaria (factor V Leiden, mutación G20210A de la protrombina, deficiencia de antitrombina, proteína C o proteína S) no se asociaban con variaciones en la tasa de recurrencias, tanto si el episodio trombótico fue secundario o espontáneo¹⁵; si bien la incidencia de recurrencias era significativamente superior en los pacientes con trombosis idiopática. Sin embargo, aunque la presencia o ausencia de una alteración aislada no parece influir en el riesgo de recurrencia trombótica, se ha descrito que la concurrencia de varias alteraciones sí se asociaría con un aumento de la incidencia de recurrencias. En este sentido, los portadores heterocigotos del factor V Leiden y de la mutación G20210A de la protrombina presentaban en un estudio en 412 pacientes una incidencia de recurrencia significativamente superior que los portadores únicamente del factor V Leiden (riesgo relativo: 2,6). Por el contrario, el riesgo de recurrencia en los portadores heterocigotos del factor V Leiden o de la mutación de la protrombina en solitario incluidos en este trabajo fue similar al de los pacientes sin ninguna de las dos mutaciones (riesgo relativo: 1,1 y 1,3 respectivamente)^{16,17}. Otro estudio en pacientes portadores del factor V Leiden con y sin recurrencia trombótica concluía que la incidencia de TEV recurrente dependía de la presencia concomitante de otras alteraciones trombofílicas (sobre todo la mutación de la protrombina y la hiperhomocisteinemia plasmática), además de si el primer episodio trombótico había sido espontáneo o secundario¹⁸. La tasa de recurrencia anual oscilaba desde 0,45 por 100 pacientes-año en pacientes heterocigotos para el factor V Leiden sin otros defectos acompañantes y con un primer episodio trombótico secundario, hasta 4,8 por 100 pacientes-año en aquellos con un primer episodio espontáneo y portadores de otro defecto concomitante.

En pacientes pediátricos la importancia de la trombofilia en la recurrencia trombótica es mayor, por lo que existe menos controversia en la indicación del despistaje en pacientes pediátricos con TEV¹⁹.

Trombofilia en el RIETE

El RIETE (Registro Informatizado de la Enfermedad TromboEmbólica) es un registro español de pacientes consecutivos con TEV agudo sintomático confirmado mediante métodos objetivos. En junio de 2004 hay incluidos 8.157 pacientes válidos, con un seguimiento de al menos 3 meses.

De ellos, 6.845 casos corresponden a pacientes con un primer episodio de TEV y sin trombofilia conocida. De entre los pacientes de los que aparece registrada la actitud respecto a la búsqueda o no de una posible trombofilia, ésta fue analizada en el 20,8% de los pacientes, encontrándose al menos un defecto en el 44,4% de los pacientes en los que se realizó la detección. El defecto más frecuentemente encontrado en el conjunto de los pacientes fue la hiperhomocisteinemia plasmática (tabla 1).

Existen diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de pacientes en los que se realizaba el estudio de trombofilia en función de la edad al diagnóstico igual o inferior a 50 años o superior a 50 años (50,3 y 14,5%, respectivamente; $p < 0,001$); y de si el episodio trombótico fue espontáneo o secundario (27,7 y 16,2%, respectivamente; $p < 0,001$). Estas diferencias eran muy evidentes especialmente al comparar los pacientes con y sin cáncer activo al diagnóstico (trombofilia buscada en el 6,9% de los pacientes con cáncer y el 24,6% de los pacientes sin cáncer respectivamente; $p < 0,001$).

Sin embargo, el hallazgo de al menos un defecto trombofílico en los casos en los que se había realizado la búsqueda ocurrió en un porcentaje similar de pacientes independientemente de la edad o de la presencia o ausencia de factores de riesgo trombóticos. Tan sólo en los pacientes con cáncer el resultado de la detección fue positivo en un porcentaje menor de pacientes en los que éste se había realizado, aunque las diferencias no alcanzaban significación estadística (34,6% en los pacientes con cáncer frente a 45,2% en los pacientes sin cáncer; $p = 0,06$).

En cuanto a los defectos identificados, se observan diferencias en las frecuencias de los mismos en función de la edad en la que ocurrió el episodio trombótico. El defecto identificado más frecuentemente en los pacientes con edad igual o superior a 50 años era el factor V Leiden/resistencia a la proteína C activada (13,2% de los estudios de trombofilia realizados), mientras que en los de más de 50 años lo más frecuente era encontrar una hiperhomocisteinemia plasmática (23,8% de las búsquedas). Las diferencias resultaban estadísticamente significativas en el caso del factor V Leiden, más frecuente en los más jóvenes; y la hiperhomocisteinemia plasmática, más frecuente en edades más avanzadas. También la frecuencia de deficiencia de anticoagulantes naturales era mayor en los pacientes de 50 años o menores, aunque las diferencias no alcanzaban significación estadística, probablemente por la menor prevalencia de estas alteraciones.

Tabla 1. Resultados del estudio de trombofilia en los pacientes del RIETE en pacientes con un primer episodio trombótico (n = 1122) o con trombosis recurrente (n = 287)

Tipo de defecto	1º Episodio n	TEV % ^a	TEV n	Recurrente % ^a
Déficit AT	13	1,2	2	0,7
Déficit PC	19	1,7	3	1,0
Déficit PS	37	3,3	6	2,1
Déficit AT, PC o PS	65	5,8	11	3,8
Factor V Leiden/RPCA	116	10,3	31	10,8
Mutación protrombina	67	6,0	17	5,9
Hiperhomocisteinemia	209	18,6	35	12,2
Anticuerpos antifosfolípido	84	7,5	23	8,0
Otros defectos	42	3,7	14	4,9
Factor V Leiden/ RPCA + otro defecto	39	3,5	10	3,5
Factor V Leiden/ RPCA + mutación protrombina	12	1,1	2	0,7
Total trombofilia positiva	498	44,4	109	38,0

^a Respecto al total de pacientes estudiados.

RIETE: Registro Informatizado de la Enfermedad TromboEmbólica; TEV: tromboembolismo venoso; AT: antitrombina; PC: proteína C; PS: proteína S; RPCA: resistencia a la proteína C activada.

Se ha publicado que la probabilidad de hallar una trombofilia, especialmente el factor V Leiden, puede diferir en función de la presencia de una TVP o un EP, siendo menos común en los pacientes con EP, sugiriendo una influencia en el riesgo de embolización²⁰. En este caso, la distribución de pacientes con TVP o EP fue semejante en los pacientes con trombofilia buscada positiva que en los pacientes con resultado negativo de la búsqueda. En los pacientes con TVP se observa una mayor prevalencia del factor V Leiden que en los casos con EP, si bien las diferencias no alcanzaban la significación estadística ($p = 0,08$).

El período de seguimiento en los pacientes incluidos en el RIETE es de al menos 3 meses tras el diagnóstico por lo que no se pueden extraer conclusiones definitivas acerca de la asociación entre recurrencia trombótica a largo plazo y trombofilia. En los datos del RIETE no se observan diferencias en la incidencia de recurrencia/progresión trombótica en función de la identificación o no de algún defecto (5,8 y 5,6%, respectivamente).

El registro incluye también 1.253 pacientes con historia previa de TEV y sin trombofilia conocida. En estos pacientes el porcentaje de trombosis espontáneas era superior que en los pacientes con un primer episodio (59,7 y 32,0%, respectivamente; $p < 0,001$). Se realizó detección de trombofilia en el 28,8% de los pacientes ($p < 0,001$ en comparación con los pacientes con un primer episodio trombótico), encontrándose al menos un defecto en el 38,0% de los pacientes en los que se realizó la detección ($p = 0,05$ en comparación con los pacientes con un primer episodio

dio de TEV). Al igual que en los pacientes con un primer episodio trombótico la realización de la detección de trombofilia fue más frecuente en los pacientes con edad de 50 años o menores y con episodio trombótico espontáneo. La distribución de los defectos identificados en este grupo fue similar a la observada en la población con un primer episodio de TEV.

Conclusiones

La indicación de realización de un estudio de trombofilia en pacientes que han sufrido un episodio de TEV no está aceptada de manera uniforme. Aunque en ocasiones la identificación de una alteración puede no suponer ninguna variación en el tratamiento del paciente, en caso de encontrarse algún defecto con alto riesgo de recurrencia (anticuerpos antifosfolípido) o varias alteraciones concurrentes (p. ej., factor V Leiden + mutación de la protrombina) cabe plantearse la prolongación del tratamiento anticoagulante. Probablemente, la determinación del dímero-D poco tiempo después de la finalización del tratamiento, así como la evaluación de la persistencia de trombosis residual en la ecografía, permita afinar más en la identificación de aquellos individuos con mayor riesgo de recurrencia^{21,22}.

Por otra parte, en caso de identificación de un defecto podrían beneficiarse los familiares asintomáticos de una adecuada profilaxis cuando estén expuestos a una situación de riesgo trombótico.

Los datos de los pacientes del RIETE revelan que la detección de trombofilia se realizan en nuestro medio en una minoría de pacientes con TEV, si bien en pacientes con trombosis con edad menor de 50 años y de carácter espontáneo, o con historia previa de TEV la búsqueda de una trombofilia es algo más frecuente. Llama la atención que sin embargo la búsqueda resulta positiva en un porcentaje de pacientes similar independientemente de la edad o el carácter de la trombosis (importancia de las interacciones gen-ambiente en las trombosis secundarias), aunque la prevalencia de las distintas alteraciones identificadas era distinta en función de la edad de los pacientes. La probabilidad de obtener un resultado positivo es menor en los pacientes con neoplasias activas, en concordancia con estudios previos, lo que cuestionaría la idoneidad de realizar el estudio en los pacientes oncológicos, sobre todo en caso de tumores avanzados.

Bibliografía

- De Stefano V, Finazzi G, Mannucci PM. Inherited thrombophilia: Pathogenesis, clinical syndromes and management. *Blood* 1996;87:3531-44.
- Bertina RM, Koelman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, deRonde H, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994;369:64-7.
- Bauer KA. The thrombophilias: Well-define risk factors with uncertain therapeutic implications. *Ann Intern Med* 2001;135:367-73.
- Martinelli I. Pros and cons of thrombophilia testing: Pros. *J Thromb Haemost* 2003;1:410-1.

- Machin SJ. Pros and cons of thrombophilia testing: Cons. *J Thromb Haemost* 2003;1:412-3.
- Vandenbroucke JP, Van der Meer FJM, Helmerhorst FM, Rosendaal FR. Factor V Leiden: Should we screen oral contraceptive users and pregnant women? *BMJ* 1996;313:1127-30.
- Simioni P. Risk of recurrent venous thromboembolism and thrombophilia: Does discrepancy make complexity or vice versa? *J Thromb Haemost* 2003;1:16-8.
- Simioni P, Tormene D, Prandoni P, Zerbinati P, Gavasso S, Cefalo P, et al. Incidence of venous thromboembolism in asymptomatic family members who are carriers of factor V Leiden: A prospective cohort study. *Blood* 2002;99:1938-42.
- Martinelli I, Legnani C, Bucciarelli P, Grandone E, De Stefano V, Mannucci PM. Risk of pregnancy-related venous thrombosis in carriers of severe inherited thrombophilia. *Thromb Haemost* 2001;86:800-3.
- Bauer KA, Rosendaal FR, Heit JA. Hypercoagulability: Too many tests, too much conflicting data. *Haematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2002;353-68.
- Prandoni P, Lensing AW, Cogo A, Cuppini S, Villalta S, Carta M, et al. The long-term clinical course of acute deep venous thrombosis. *Ann Intern Med* 1996;125:1-7.
- Agnelli G, Prandoni P, Santamaria MG, Bagatella P, Iorio A, Bazzan M, et al. Three months versus one year of oral anticoagulant therapy for idiopathic deep venous thrombosis. *N Engl J Med* 2001;345:165-9.
- Agnelli G, Prandoni P, Becattini C, Silingardi M, Taliani MR, Miccio M, et al. Extended oral anticoagulant therapy after a first episode of pulmonary embolism. *Ann Intern Med* 2003;139:19-25.
- Hyers TM, Agnelli G, Hull RD, Morris TA, Samama M, Tapson V, et al. Antithrombotic therapy for venous thromboembolism. *Chest* 2001;119:176-93.
- Baglin T, Luddington R, Brown K, Baglin C. Incidence of recurrent venous thromboembolism in relation to clinical and thrombophilic risk factors: Prospective cohort study. *Lancet* 2003;362:523-6.
- De Stefano V, Martinelli I, Mannucci PM, Paciaroni K, Chiusolo P, Casorelli I, et al. The risk of recurrent deep venous thrombosis among heterozygous carriers of both factor V Leiden and the G20210A prothrombin mutation. *N Engl J Med* 1999;341:801-6.
- De Stefano V, Martinelli I, Mannucci PM, Paciaroni K, Rossi E, Chiusolo P, et al. The risk of recurrent venous thromboembolism among heterozygous carriers of the G20210A prothrombin gene mutation. *Br J Haematol* 2001;113:630-5.
- Meinardi JR, Middeldorp S, De Kam PJ, Koopman MMW, Van Pampus ECM, Hamulyak K, et al. The incidence of recurrent venous thromboembolism in carriers of factor V Leiden is related to concomitant thrombophilic disorders. *Br J Haematol* 2002;116:625-31.
- Nowak-Göttl U, Junker R, Kreuz W, Von Eckardstein A, Kosch A, Nohe N, et al. Risk of recurrent venous thrombosis in children with combined prothrombotic risk factors. *Blood* 2001;97:858-62.
- Meyer G, Emmerich J, Helley D, Arnaud E, Nicaud V, Alhenc-Gelas M, et al. Factors V Leiden and II 20210A in patients with symptomatic pulmonary embolism and deep vein thrombosis. *Am J Med* 2001;110:12-5.
- Palareti G, Legnani C, Cosmi B, Valdre L, Lunghi B, Bernardi F, et al. Predictive value of D-dimer test for recurrent venous thromboembolism after anticoagulation withdrawal in subjects with a previous idiopathic event and in carriers of congenital thrombophilia. *Circulation* 2003;108:313-8.
- Prandoni P, Lensing AWA, Prins MH, Bernardi F, Marchiori A, Bagatella P, et al. Residual vein thrombosis as a predictive factor of recurrent venous thromboembolism: a prospective cohort study. *Ann Intern Med* 2002;137:955-60.

DÍMERO D EN EL REGISTRO INFORMATIZADO DE PACIENTES CON ENFERMEDAD TROMBOEMBÓLICA EN ESPAÑA (RIETE)

E. GRAU¹, J.M. TENIAS² Y EL GRUPO RIETE

¹Servicio de Hematología. ²Servicio de Medicina Preventiva. Hospital Lluís Alcanyís. Xàtiva. Valencia.

Introducción

La enfermedad tromboembólica venosa (ETE) es un problema médico importante que comprende la trombosis venosa profunda (TVP) y el tromboembolismo pulmonar (TEP). Su incidencia acumulada a lo largo de la vida llega hasta el 5%. Se asocia con

una marcada morbimortalidad tanto a corto como a largo plazo, sobre todo por la aparición del síndrome postrombótico. Debido a que el tratamiento anticoagulante es muy efectivo, el rápido diagnóstico de la ETEV es fundamental. Sin embargo, los signos y síntomas de la ETEV no son específicos y su diagnóstico es difícil en muchos casos como lo demuestra el hecho que sólo entre un 10 y un 30% de los pacientes con sospecha de ETEV se llega a confirmar el diagnóstico mediante técnicas de imagen^{1,2}.

Desde hace más de una década se está estudiando el papel de la determinación de los niveles del dímero D en el diagnóstico de la ETEV. De la mayoría de estos estudios se desprende que el dímero D no se puede considerar como una prueba diagnóstica de primera línea que por sí sólo pueda excluir la ETEV³. En cambio, el dímero D tendría su utilidad en el diagnóstico de la ETEV combinado con pruebas de imagen. Así, diferentes estudios confirman que en pacientes con sospecha de TVP y con eco-Doppler negativo, un dímero D negativo evitaría la realización de eco-Doppler seriados y por otra parte, en los pacientes con sospecha de TEP y con una gammagrafía de ventilación/perfusión negativa, un dímero D negativo haría innecesarias más pruebas de imagen^{4,5}. Además, estudios recientes sugieren que el dímero D combinado con criterios clínicos pretest podría ser suficiente para la exclusión de la ETEV, sobre todo en pacientes ambulatorios⁶.

La información que se disponía hasta ahora en España sobre prevalencia, diagnóstico, factores de riesgo, y tratamiento de la ETEV era escasa, y en la mayoría de casos procedente de estudios de cohortes reducidos efectuados en un único centro. Esta situación ha empezado a cambiar con la puesta en marcha en marzo de 2001 del Registro Informatizado de pacientes con Enfermedad Tromboembólica en España (RIETE). Este Registro es similar a otros Registros desarrollados en Europa y Estados Unidos de América para el estudio de enfermedades relevantes para la población. Estos Registros no son meros sistemas de notificación sino que llevan implícito el concepto de seguimiento y la información generada ha demostrado ser útil para el control de las enfermedades tanto en su prevención y diagnóstico como en su tratamiento⁷.

El RIETE consiste en un estudio observacional, prospectivo y multicéntrico que abarca a diferentes especialidades médicas involucradas en el diagnóstico y tratamiento de la ETEV como Medicina Interna, Hematología, Neumología y Cirugía Vasculat. Se recogen datos de un gran número de los pacientes diagnosticados y tratados de ETEV en diferentes hospitales de España, haciendo hincapié en los aspectos diagnósticos clínicos, radiológicos y biológicos así como en los aspectos terapéuticos. Además se efectúa un seguimiento clínico de al menos 3 meses en el que se recogen la mortalidad, la recidiva tromboembólica y las complicaciones hemorrágicas⁸.

Entre los múltiples datos registrados durante diagnóstico del episodio inicial de ETEV a los pacientes incluidos en el RIETE se encuentran los niveles de dímero D.

Dímero D en el RIETE

Para este análisis se han incluido aquellos pacientes validados en el RIETE con el diagnóstico confirmado mediante al menos una prueba de imagen de TVP, TEP o ambas, con una determinación de los niveles de dímero D en el momento del diagnóstico y con un seguimiento clínico de al menos 3 meses.

Para la determinación de los niveles de dímero D se utilizaron 15 kits comerciales diferentes. Se consideraron los valores *cut-off* aquellos que recomendaba el fabricante (un valor inferior a este *cut-off* se consideró dímero D negativo). A cada paciente incluido y validado le correspondía un solo valor de dímero D y una sola técnica.

Sobre un total de 3.718 pacientes incluidos en el registro RIETE y con un seguimiento de al menos 3 meses, a 2.268 pacientes (61%) se les determinó los niveles de dímero D al diagnóstico. De estos 1.125 (49,6%) eran varones y 1.143 mujeres (50,4%), con una edad media de 66,4 años. En 1.338 (59%) pacientes el diagnóstico fue TVP, en 548 (24,2%) TEP, y en 382 (16,8%) ambos. En 1.657 (97,3%) la TVP fue en miembros inferiores y en 1369 (83,7%) la TVP fue proximal. En la evolución clínica, recidivaron 100 pacientes (4,4%), sufrieron una hemorragia 169 (7,5%) y fallecieron 194 (8,6%).

En su conjunto el dímero D mostró una sensibilidad global de 92,8% (intervalo de confianza del 95% (IC 95%), entre 91,6 y 93,8). Por tanto en un 7,2% de los pacientes con ETEV confirmada, el dímero D fue negativo. En casi el 50% de las determinaciones del dímero D se utilizaron técnicas del látex automatizado inmunoturbidimétrico. Las sensibilidades si bien altas, no superaron el 95%, excepto en el Tinaquant D-Dimer (98%), aunque hay que tener en cuenta que esta técnica sólo se utilizó en 56 casos. Por otra parte, en el 15% de las determinaciones se utilizó el nuevo VIDAS, una modificación del clásico análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) que permite una lectura en 35 min, que obtuvo una alta sensibilidad media (97%). En un 12% de los casos el dímero D se determinó mediante los nuevos métodos semicuantitativos en sangre total o plasma que se caracterizan por su simplicidad. La sensibilidad media fue de 91% en el caso de Nycocard y hasta el 98% que mostró el Minutex. Por último, la técnica de aglutinación látex clásica mostró una sensibilidad media muy baja (87%).

La edad media de los pacientes con dímero D positivo fue significativamente superior que en los pacientes con dímero D negativo ($p < 0,0001$). En cambio, los niveles de dímero D fueron similares en ambos sexos.

Los niveles de dímero D fueron significativamente superiores en los pacientes con TVP y TEP que en los pacientes con TVP sin TEP clínico ($p < 0,0001$). En los pacientes con TVP en miembros superiores los niveles de dímero D fueron claramente menores a los obtenidos en los pacientes con TVP en miembros inferiores ($p < 0,0001$). Cabe destacar que en tan sólo un 80% de los casos de TVP de miembro superior, el dímero D fue positivo. Por otra parte, en los pacientes con trombosis en miembros inferiores, aquellos con trombosis distal mostraron un porcentaje de dímero D positivo muy por debajo del obtenido en los pacientes con trombosis proximal ($p = 0,0001$). Y así en tan sólo un 86% de las trombosis distales los niveles de dímero se encontraban por encima del *cut-off*.

Los niveles de dímero D se relacionaron con los diversos tests biológicos practicados al diagnóstico del ETEV. Se encontró relación significativa directa con los niveles de creatinina, siendo mucho más frecuente encontrar dímero D positivo en los pacientes con creatinina elevada ($p < 0,001$). Por otra parte, se apreció una correlación significativa inversa entre los niveles de hemoglobina y los niveles de dímero D ($p < 0,0001$).

Cuando se relacionaron diversos factores de riesgo de ETEV adquiridos con los niveles de dímero D se observó que la existencia o no de cirugía, inmovilización o ETEV previa, no modificaba significativamente el porcentaje de pacientes con dímero D positivo. En cambio, los pacientes con cáncer tenían un porcentaje más elevado de dímero D positivo que los pacientes que no tenían este factor de riesgo ($p = 0,026$). Además se observó una marcada relación entre el número de factores de riesgo que presentaban los pacientes al diagnóstico con el porcentaje de pacientes con dímero D positivo ($p < 0,05$).

Los pacientes que recidivaron dentro de los 3 meses de seguimiento mostraron un niveles de dímero D superiores a los que no recidivaron, con una relación de "dosis-respuesta" (a mayor nivel de dímero D, mayor riesgo de recidiva). No obstante, se observó que la capacidad predictiva del modelo para padecer una recidiva tromboembólica era relativamente pobre (ROCa = 0,65; IC 95%, 0,63-0,67). En cambio, el dímero D resultó poseer un excelente valor predictivo negativo de tal forma que ningún paciente con dímero D inferior o igual a 400 ng/ml presentó recidiva en los 3 meses siguientes.

El dímero D resultó tener capacidad para predecir la mortalidad, con diferencias altamente significativas tanto del dímero D como variable dicotómica (un dímero D positivo incrementa el riesgo de mortalidad 3,52 veces) como tras su categorización en diferentes niveles. Utilizando el modelo con dímero D como variable cuantitativa y categorizado por niveles se apreció una capacidad predictiva de defunción (ROCa = 0,81; IC 95%, 0,79-0,83). Por

tanto, los resultados indicaban que los pacientes con ETEV cuanto mayor era el nivel de dímero D al diagnóstico, mayor era la probabilidad de fallecer a los 3 meses.

Conclusiones

En el análisis de los pacientes incluidos en el RIETE, se observa que en nuestro país, al menos en un gran número de centros, el dímero D no es una técnica que se efectúe de forma sistemática en el diagnóstico de la ETEV. De hecho, la cuantificación del dímero D se llevo a cabo en algo más de la mitad de los pacientes incluidos en el RIETE.

En la mayoría de centros las determinaciones del dímero D se utilizaron técnicas del látex automatizado inmunoturbidimétrico. Las sensibilidades obtenidas si bien altas, no superaron el 95%, y fueron similares a las descritas en diferentes estudios que han analizado estas pruebas de látex automatizado en la exclusión de la TVP y TEP⁹. Al igual que en otros estudios, el nuevo VIDAS en el RIETE resultó tener una alta sensibilidad media. No obstante, según algunos autores, el VIDAS se caracteriza por una muy baja especificidad, lo cual obliga a realizar pruebas de imagen adicionales en la mayoría de pacientes si la prevalencia de la ETEV es baja¹⁰. De este análisis del RIETE se desprende que los nuevos métodos semicuantitativos en sangre total o plasma podrían ser una alternativa a los métodos clásicos. Sin embargo, hay que tener en cuenta la limitación de estos nuevos tests rápidos ya que su lectura es visual y por lo tanto sometida a la interpretación subjetiva¹¹. Por último, el análisis del RIETE confirmó la escasa utilidad de la técnica de aglutinación látex clásica con una sensibilidad media muy baja comparada con los otros tests disponibles en la actualidad¹². Así pues, el RIETE parece confirmar las limitaciones del dímero D como prueba exclusiva de diagnóstico de la ETEV. Sin embargo, su cuantificación es conveniente ya que combinada con otros hallazgos biológicos, clínicos y radiológicos es útil en el diagnóstico de la ETEV.

En la cohorte del RIETE, al igual que en otros grupos poblacionales estudiados, los niveles de dímero D fueron significativamente más elevados en los pacientes de más edad, y no se observaron diferencias entre sexos. También fueron más elevados en los pacientes con TVP y TEP que en aquellos con TVP o TEP aislados, y superiores en los pacientes con TVP proximal (en los casos de TVP aislada) que en los de TVP distal, lo cual sugeriría una relación más o menos proporcional al tamaño del trombo.

Estudios recientes sugieren que aparte de su utilidad en el diagnóstico, el dímero D podría tener valor predictivo del riesgo de recidiva tromboembólica y de mortalidad en la ETEV¹³⁻¹⁵. De los resultados obtenidos del RIETE se desprende que la determinación al diagnóstico de los niveles de dímero D tiene escaso poder predictivo positivo de recidiva tromboembólica. En cambio, el dímero D tiene un excelente

valor predictivo negativo, de tal forma el riesgo de recidiva es muy bajo en aquellos pacientes con dímero D inferior a 400 ng/ml. Esto puede tener implicaciones en la práctica diaria ya que la duración de la profilaxis secundaria en la ETEV aún es motivo de controversia sobre todo en los pacientes con ETEV idiopática, y estos hallazgos pueden ayudar junto a otras variables en la toma de decisión de suspender o continuar la anticoagulación oral. Otros autores también han observado que el dímero D en su determinación basal y sobre todo en su cuantificación a las 3-4 semanas de haber finalizado el tratamiento anticoagulante tiene un alto valor predictivo negativo de recidiva tromboembólica¹³⁻¹⁵.

Los resultados obtenidos en el RIETE indican que los niveles de dímero D basal se correlacionan con la mortalidad a los 3 meses en los pacientes con ETEV. Si bien no existe apenas información sobre este valor predictivo del dímero D, los resultados del RIETE se encuentran en la línea de los obtenidos por otros estudios que señalan al dímero D como un buen marcador de gravedad y por tanto de mortalidad en enfermos ingresados en unidades de cuidados intensivos con sospecha de ETEV, y en enfermos que padecen diferentes entidades como la cardiopatía isquémica o la neumonía¹⁶⁻¹⁸. No obstante, se requieren más estudios prospectivos para poder determinar el papel del dímero D como variable predictiva de mortalidad en la ETEV.

Bibliografía

- Hirsh J, Lee AYY. How we diagnose and treat deep vein thrombosis. *Blood* 2002;99:3102-10.
- Stein PD, Hull RD, Saltzman HA, Pineo G. Strategy for diagnosis of patients with suspected acute pulmonary embolism. *Chest* 1993;103:1553-9.
- Bounameaux H, De Moerloose P, Perrier A, Reber G. Plasma measurement of D-dimer as diagnostic aid in suspected venous thromboembolism: an overview. *Thromb Haemost* 1994;71:1-6.
- Kraaijenhagen RA, Piovella F, Bernardi E, Verlatto F, Beckers EA, Koopman MM, et al. Simplification of the diagnostic management of suspected deep vein thrombosis. *Arch Intern Med* 2002;162:907-11.
- De Groot MR, Van Marwijk Kooy M, Pouwels JGJ, Engelage AH, Kuipers BF, Büller HR. The use of a rapid D-dimer blood test in the diagnostic work-up for pulmonary embolism: a management study. *Thromb Haemost* 1999;82:1588-92.
- Kearon C, Ginsberg JS, Douketis J, Crowther M, Brill-Edwards P, Weitz JI, et al. Management of suspected deep venous thrombosis in outpatients by using clinical assessment and D-dimer testing. *Ann Intern Med* 2001;135:108-11.
- Goldhaber SZ, Visani L, de Rosa M. Acute pulmonary embolism: clinical outcomes in the International Cooperative Pulmonary Embolism Registry. *Lancet* 1999;353:1386-9.
- Arcelus JI, Caprini JA, Monreal M, Suárez C, González-Fajardo J. The management and outcome of acute venous thromboembolism: a prospective registry including 4011 patients. *J Vasc Surg* 2003;38:916-22.
- Van der Graaf F, Van den Borne H, Van der Kolk M, De Wild PJ, Janssen GWT, Van Uum SHM. Exclusion of deep venous thrombosis with D-dimer testing. *Thromb Haemost* 2000;83:191-8.
- Schutgens REG, Haas FJLM, Gerritsen WBM, Van der Horst F, Nieuwenhuis HK, Biesma DH. The usefulness of five D-dimer assays in the exclusion of deep venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2003;1:976-81.
- Legnani C, Pancani C, Palareti G, Guazzaloca G, Fortunato G, Grau F, et al. Comparison of new rapid methods for D-dimer measurement exclude deep vein thrombosis in symptomatic outpatients. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1997;8:296-302.
- Grau E, Linares M, Estany A, Martín F. Utility of D dimer in the diagnosis of deep venous thrombosis in outpatients. *Thromb Haemost* 1991;66:510.
- Palareti G, Legnani C, Cosmi B, Valdré L, Lunghi B, Bernardi F, et al. Predictive value of D-dimer test for recurrent venous thromboembolism

after withdrawal in subjects with a previous idiopathic event and in carriers of congenital thrombophilia. *Circulation* 2003;108:313-8.

- Cushman M, Folsom AR, Wang L, Aleksic N, Rosamond WD, Tracy RP, et al. Fibrin fragment D-dimer and the risk of future venous thrombosis. *Blood* 2003;101:1243-8.
- Eichinger S, Minar E, Bialonczyk C, Hirsch M, Quehenberger P, Schneider B, et al. D-dimer levels and risk of recurrent venous thromboembolism. *JAMA* 2003;290:1071-4.
- Kollef MH, Zahib M, Eisenberg PR. Predictive value of a rapid semi-quantitative D-dimer assay in critically ill patients with suspected venous thromboembolic disease. *Crit Care Med* 2000;28:414-20.
- Vene N, Mavri A, Kosmelj K, Stegnar M. High D-dimer levels predict cardiovascular events in patients with chronic atrial fibrillation during oral anticoagulant therapy. *Thromb Haemost* 2003;90:1163-72.
- Querol-Ribelles JM, Tenias JM, Grau E, Querol-Borrás JM, Climent JL, Gómez E, et al. Plasma D-dimer levels correlate with outcomes in patients with community-acquired pneumonia. *Chest* (en prensa).

DURACIÓN DEL TRATAMIENTO ANTICOAGULANTE.

SITUACIONES ESPECIALES

F. MARTÍNEZ BROTONS

Y P. DOMÈNECH SANTASUSANA

Servicio de Hematología y Hemoterapia.

Hospital Universitario de Bellvitge. Barcelona.

Introducción

Actualmente está plenamente admitido que ante un episodio agudo de tromboembolismo venoso (TEV), sea éste una trombosis venosa profunda (TVP) o una embolia pulmonar (EP), es necesario un período de anticoagulación con heparina, no fraccionada o de bajo peso molecular, durante un mínimo de 5 días. La necesidad de esta primera aproximación terapéutica quedó demostrada en el trabajo de Brandjes et al¹ de 1992.

También se acepta que aquélla ha de ser continuada por una segunda etapa de anticoagulación, de duración variable, denominada de profilaxis secundaria, que se realiza, en la mayor parte de los casos, con cumarínicos, iniciando su administración durante el mismo tratamiento con heparina. Cuando el anticoagulante es la warfarina puede coincidir prácticamente el inicio de ambos, ya que ésta requiere tiempos relativamente largos para alcanzar el nivel terapéutico. En el caso de la acenocumarina, su administración no deberá comenzarse hasta el segundo o tercer día del tratamiento con heparina ya que, de lo contrario, la rapidez con que este fármaco alcanza la zona terapéutica impediría completar el ciclo mínimo de 5 días para el tratamiento heparínico.

El nivel terapéutico para la anticoagulación corresponderá a valores de índice normalizado internacional (INR) comprendidos entre 2 y 3. Una anticoagulación más intensa no reduce la incidencia de recidivas pero sí incrementa la de hemorragias².

El establecimiento de una profilaxis secundaria se ha realizado de forma empírica durante muchos años, sin que existiera recomendación formal alguna sobre su duración. Se ha considerado, de forma ha-

bitual, que la duración mínima sería la de 3 meses, lo cual se ha basado principalmente en un estudio retrospectivo de casos frente a controles³, en el que se observaba una marcada reducción de la recurrencia en los pacientes que habían realizado, al menos, 3 meses de tratamiento anticoagulante oral.

La mejor demostración de la necesidad de esta segunda etapa de profilaxis secundaria, incluso en la TVP distal, es el estudio, prospectivo y aleatorizado, publicado en 1985 por Lagerstedt et al⁴. Éste incluía 51 pacientes con TVP distal que fueron repartidos en 2 grupos, el primero recibió warfarina durante 3 meses, tras el curso inicial de heparina, y el otro no. A los 3 meses las recurrencias sintomáticas objetivadas por flebografía en el grupo sin warfarina fueron del 29 % mientras que en el grupo tratado no se detectó ninguna ($p < 0,01$). El beneficio se prolongó más allá de los primeros 3 meses, ya que al año sólo un paciente del grupo que recibió warfarina presentó una recurrencia mientras que en el grupo que no recibió anticoagulación oral, 19 de los 28 pacientes sí las presentaron ($p < 0,02$).

Una vez aceptada la necesidad de la profilaxis secundaria y el hecho de que una duración mínima de 3 meses es más una cuestión de consenso que de evidencia científica, quedan pendientes otras preguntas. ¿Puede reducirse su duración en pacientes con escaso riesgo trombótico? Por el contrario, cuando el riesgo es elevado y los factores que lo condicionan son persistentes y, como caso especial, en la trombofilia, ¿cuál sería la duración óptima? Otra duda surge con respecto al TEV esencial, ¿es suficiente en éste un período de anticoagulación de 3 meses o se mejora su pronóstico prolongando éste? Las respuestas serán múltiples y no simples, debido a la heterogeneidad de los pacientes a que nos referimos, aun tratando de agruparlos por sus aparentes factores de riesgo.

Estratificación en función del riesgo trombótico

En este apartado consideraríamos como pacientes de bajo riesgo trombótico los que han sufrido TVP distal de las extremidades inferiores o aquellos con trombosis proximales secundarias a un proceso agudo (cirugía o traumatismo), sin factores de riesgo permanentes, mientras que los de alto riesgo serían los que presentan factores de riesgo duraderos (cáncer) o permanentes (trombofilia congénita, anticuerpos antifosfolípido) o TEV idiopático.

El *Research Committee* de la *British Thoracic Society* publicó en 1992 un estudio, sobre cuya fiabilidad cabe decir que los diagnósticos de inclusión fueron objetivados únicamente en 71 % de los casos y que sólo en la mitad de las sospechas de recidiva se realizó confirmación instrumental⁵. En él se incluyeron 712 pacientes diagnosticados de TVP, EP o ambas, que en 116 de ellos se había presentado en el postoperatorio, mientras que el resto no eran pacientes

quirúrgicos. Todos ellos se repartieron en 2 grupos, el primero con sólo 4 semanas de anticoagulación oral y el resto anticoagulados durante 3 meses. La incidencia de recidiva en los pacientes posquirúrgicos tratados durante 4 semanas fue aceptable (3,3 %) pero algo superior a la obtenida con 3 meses de anticoagulación (1,8 %). Por el contrario, el 16,8 % de los pacientes no quirúrgicos presentaron nuevos episodios en el grupo de tratamiento corto y sólo 8,7 % con 3 meses de anticoagulación.

Otro estudio, publicado por Levine et al⁶ se desarrolló sobre 406 pacientes con TVP proximal objetivada flebográficamente. Tras una fase de anticoagulación oral de 4 semanas de duración, común para todos los pacientes, los casos que presentaban una pletismografía por impedancia normal fueron aleatorizados en una rama de prolongación de la anticoagulación, hasta completar los 3 meses ($n = 109$), y otra que recibió placebo ($n = 105$). Durante estas 8 semanas de prolongación del tratamiento, el grupo placebo presentó un 8,6 % de recidivas frente a sólo el 0,9 % en los tratados ($p = 0,009$), pero al final de los 11 meses de seguimiento se había perdido la significación estadística en la incidencia de recidivas entre ambos grupos, lo que parece indicar que algunos pacientes, incluso con un estudio de pletismografía normal, hubieran precisado una duración del tratamiento superior a 3 meses. El problema es cómo identificar a estos pacientes.

En 2000 Pinede et al⁷ publicaron un metaanálisis de siete estudios controlados, en los que se habían comparado dos duraciones diferentes de anticoagulación, y con dos puntos finales: recurrencia en función de la duración, después de un seguimiento de 12 meses, y hemorragia mayor.

El análisis del primer punto final, que incluía 2.304 pacientes, evidenció que 12 a 24 semanas de profilaxis secundaria es preferible a una anticoagulación de sólo 3 a 6 semanas para el conjunto de los pacientes, tanto con factores de riesgo transitorios como duraderos o con episodios esenciales. El riesgo relativo para la anticoagulación más prolongada era claramente inferior (riesgo relativo [RR], 0,6; intervalo de confianza del 95 % [IC 95 %], 0,45-0,79; $p < 0,001$). En el análisis por subgrupos, para los pacientes con accidentes trombóticos esenciales o secundarios a factores de riesgo persistentes, la reducción del riesgo relativo al prolongar la anticoagulación aún era mayor (RR, 0,48; IC 95 %, 0,34-0,68; $p < 0,001$), mientras que para el subgrupo con factores de riesgo pasajeros, la tendencia fue similar, pero sin alcanzar significación estadística, sugiriendo cierta ventaja para una cobertura más prolongada (12 semanas) incluso en pacientes con un factor de riesgo transitorio.

Con respecto al segundo punto final, el análisis comprendía 1.823 pacientes y no se detectaron diferencias significativas en la incidencia de hemorragias mayores al prolongar la terapéutica anticoagulante.

De los datos hasta aquí expuestos se desprende que la duración mínima de la profilaxis secundaria debería alcanzar los 3 meses, incluso en pacientes de bajo riesgo. Sin embargo, todos los estudios comentados hasta aquí tienen la limitación de un seguimiento a relativamente corto plazo. Prandoni et al⁸, basándose en los datos de un seguimiento de 8 años en pacientes no seleccionados con TVP que recibieron durante 3 meses anticoagulación oral, tras la fase aguda, ponen en duda la utilidad de la profilaxis secundaria a tan corto plazo. De su estudio se desprende que la recidiva del TEV se presenta en el 17,5% de casos después de 2 años, en el 24,6% a los 5 años y en el 30,3% a los 8 años, incrementándose el riesgo en pacientes con cáncer ($\times 1,72$) o trombofilia ($\times 1,44$) y disminuyendo cuando la cirugía o un traumatismo era la causa desencadenante de la trombosis. Especialmente importantes son las cifras de incidencia acumulada del síndrome posttrombótico, que alcanzan al 29,1% de los casos al cabo de 8 años, estando especialmente favorecido por las recidivas ipsolaterales de la trombosis venosa.

Dado que estos datos se refieren a pacientes no seleccionados y que, cuando se estratifican en función de los factores de riesgo, se observan claras diferencias en la incidencia de complicaciones tardías, no vendrían a invalidar la clasificación fundamentada en la estratificación del riesgo como base para seleccionar la duración de la profilaxis secundaria. ¿Pero cuál sería la duración óptima en pacientes de alto riesgo?

Prolongación de la profilaxis secundaria en pacientes de alto riesgo

Vamos a tratar de hallar respuestas acerca la duración de la prolongación de la profilaxis secundaria en pacientes de alto riesgo y del beneficio que esta prolongación proporciona a largo plazo. Dos grupos de pacientes son de especial interés, los que ya han sufrido un segundo episodio de TEV y los que han presentado el primero en ausencia de factores de riesgo conocidos, es decir, como TEV idiopático.

Schulman et al⁹ y el Duration of Anticoagulation Trial Study Group publicaron un estudio (DURAC II) en 1997, desarrollado sobre 227 pacientes que habían presentado un segundo episodio de TEV y que fueron repartidos de forma aleatorizada entre dos opciones terapéuticas: anticoagulación oral durante 6 meses o bien a largo plazo (tabla 1). Tras 4 años de seguimiento se detectó una incidencia de recurrencias en el primer grupo de 20,7% frente a 2,6% en el segundo lo que representa un incremento del riesgo relativo de 8,0 (IC 95%, 2,5-25,9) para los que suspendieron la anticoagulación. La incidencia de hemorragias mayores fue superior en los pacientes tratados a largo plazo (2,7% frente a 8,6%), aunque el incremento no alcanzó significación estadística. Cabe señalar que, a pesar de la diferencia en el número de recidivas, no se halló diferencia en la mortalidad.

Tabla 1. Duración de la anticoagulación oral después de un segundo episodio de TEV

Eventos	6 meses (n = 111)	Plazo indefinido (n = 116)	Riesgo relativo (IC 95 %)
TVP recurrente	23 (20,7%)	3 (2,6%)	8,0 (2,5-26)
Hemorragia mayor	3 (2,7%)	10 (8,6%)	0,3 (0,1-1,1)

TEV: tromboembolismo venoso; IC 95%: intervalo de confianza del 95%,
TVP: trombosis venosa profunda.

Tomada de Schulman et al. Estudio DURAC II, 1997: 4 años de seguimiento⁹.

Kearon et al¹⁰ realizaron un estudio aleatorizado y doble ciego en pacientes afectados de un primer episodio de TEV esencial. Tras concluir 3 meses de anticoagulación oral, los pacientes eran aleatorizados para continuar recibiendo warfarina o placebo durante otros 24 meses. El estudio fue concluido prematuramente, con una media de seguimiento de 10 meses y unos 80 pacientes incluidos en cada grupo, por la superioridad manifiesta en el beneficio del grupo tratado de forma prolongada. Éste presentaba una incidencia de recurrencias del 1,3% frente a un 27,4% en el grupo de tratamiento de corta duración ($p < 0,001$), lo que implica una reducción del riesgo de recurrencia del 95% (IC 95%, 63-99). El número de hemorragias mayores fue de tres en grupo tratado frente a ninguna en el que recibía placebo ($p = 0,09$).

La lectura de este estudio sugiere dos preguntas. La primera sería: ¿Hasta cuándo se debe prolongar la profilaxis secundaria en el TEV idiopático? ¿Tal vez a plazo indefinido?, y la segunda: ¿En caso de que el tratamiento sea suspendido al cabo de cierto tiempo (p. ej., un año), qué ocurre a partir de ese momento con la incidencia de recidivas?

En parte estas preguntas han sido contestadas por el estudio WODIT que Agnelli et al¹¹ publicaron en 2001. Se trata de un estudio aleatorizado, abierto, y con valoración ciega de los eventos, cuyo objetivo era estudiar las recurrencias ocurridas tras suspender la anticoagulación oral en pacientes con un primer episodio de TVP idiopática diagnosticada por medios instrumentales, y con un seguimiento mínimo de 2 años (tabla 2). Se administraron anticoagulantes orales durante 3 meses a 267 pacientes y, a continuación, se repartieron de forma aleatoria entre suspender la anticoagulación o prolongarla durante 9 meses más. Tras un seguimiento medio de aproximadamente 37 meses en ambas ramas, las recurrencias globales en el grupo de tratamiento corto fueron del 15,7% y las del largo del 15,8%. Limitándonos a los eventos de recurrencia tras suprimir la anticoagulación, la incidencia de accidentes fue del 5,1% anual (IC 95%, 3,2-7,5) y del 5,0% anual (IC 95%, 3,1-7,8), respectivamente. En el grupo con tratamiento de mayor duración se detectó

Tabla 2. Duración de la anticoagulación oral después de un primer episodio de TVP idiopática

Eventos	Supresión a los 3 meses (n = 133)	Continuación hasta 12 meses (n = 134)
Recurrencia de TEV al término del seguimiento	21 15,8%	21 15,7%
Recurrencia tras la supresión	5,1%/año (IC 95%, 3,2-7,5)	5,0%/año (IC 95%, 3,1-7,8)
Hemorragia mayor	2 1,5%	4 3,0%
Muerte	7 5,3%	7 5,2%

TVP: trombosis venosa profunda; TEV: tromboembolismo venoso; IC 95%: intervalo de confianza del 95%

Tomada de Estudio WODIT, 2001: 37 meses de seguimiento medio¹¹.

un 3 % de hemorragias mayores durante la etapa de su prolongación.

Este mismo grupo publicó en 2003, una segunda parte del estudio WODIT, destinada a valorar la duración de la anticoagulación tras un primer episodio de EP¹². Se incluyeron en él pacientes con EP sintomática y objetivada instrumentalmente, sin factores de riesgo conocidos (grupo A) o con factores de riesgo transitorios (grupo B). Todos recibieron anticoagulación oral durante 3 meses. Al cabo de este tiempo los pacientes fueron aleatorizados para continuar el tratamiento (9 meses más para el grupo A o 3 meses más para el grupo B) o suprimirlo. Entre los pacientes con EP idiopático, tras un seguimiento medio de 32,7 meses, la cifra de recurrencias en el grupo de anticoagulación prolongada fue igual al hallado en los anticoagulados a corto plazo. En el grupo con factores de riesgo transitorios las tasas de recurrencia tampoco fueron significativamente diferentes.

Estos datos vienen a corroborar los resultados del estudio sobre TVP idiopática del mismo equipo. Los autores concluyen que el beneficio asociado a la extensión de la anticoagulación no se mantiene tras discontinuar el tratamiento y que se requieren nuevas estrategias para abordar este problema. Por una parte, establecer los parámetros que sirvan para seleccionar a aquellos pacientes con mayor riesgo de recidiva una vez suprimida la anticoagulación oral. Por otra, la aplicación de estrategias terapéuticas que no conlleven un excesivo riesgo de complicaciones hemorrágicas.

Estrategias terapéuticas para la anticoagulación a largo plazo

En este aspecto se perfilan dos opciones, la anticoagulación con cumarínicos a niveles más moderados, y la administración del nuevo fármaco anti-trombótico ximelagatran, a dosis moderadas.

A lo largo de 2003 se han publicado 2 estudios que valoran la primera opción. El de Ridker et al¹³, que recoge los resultados del estudio PREVENT, incluye algo más de 500 pacientes con TEV idiopático que, tras 6 meses de tratamiento con cumarínicos a nivel estándar (INR, 2,0-3,0), fueron aleatorizados para continuar la anticoagulación a largo plazo, con un nivel más moderado (INR, 1,5-2,0) o recibir placebo. Tras la aleatorización, con un seguimiento medio de 2,1 años y máximo de 4,3 años, la incidencia de recurrencia fue del 7,2 % anual en el grupo placebo y del 2,6 % anual en los tratados, con una diferencia claramente significativa (*hazard ratio*, 0,36; IC 95 %, 0,19-0,67; $p < 0,001$). Por el contrario, la incidencia de complicaciones hemorrágicas mayores no fue significativamente diferente entre ambos grupos (0,4 % anual frente a 0,9 % anual; $p = 0,25$).

Unos meses más tarde, Kearon et al¹⁴ publicaban un estudio similar en el que más de 700 pacientes con TEV idiopático, que habían recibido warfarina durante tres o más meses (INR, 2,0-3,0), fueron aleatorizados para seguir a largo plazo con igual nivel o con uno más moderado (INR, 1,5-1,9). Tras un seguimiento medio de 2,4 años, la incidencia de recurrencias fue menor en el grupo de nivel convencional (0,7 % anual) que en el de nivel reducido (1,9 % anual), y este beneficio se lograba sin incrementar la incidencia de hemorragia mayor (0,9 % anual frente a 1,1 % anual; $p = 0,76$). Este último dato no deja de ser sorprendente, ya que a una mayor intensidad de anticoagulación cabe esperar un incremento de complicaciones hemorrágicas. Queda, pues, sin aclarar cuál sería el nivel óptimo de anticoagulación en tratamientos a largo plazo.

Con respecto a la segunda opción, Schulman et al¹⁵ publicaron en 2003 un estudio que incluía 1.233 pacientes con TEV que, tras 6 meses de anticoagulación con warfarina, fueron aleatorizados para recibir ximelagatran durante 18 meses, a dosis de 24 mg/12 h, inferior a la recomendada en la fase aguda y en los primeros meses de la profilaxis secundaria (36 mg/12 h), o bien placebo. Al final de este plazo, 71 pacientes (12,6 %) del grupo placebo y sólo 12 (2,8 %) de los tratados, habían sufrido recurrencia de TEV, sin que hubiera diferencia alguna en la incidencia de hemorragia mayor. Esta aproximación terapéutica a la profilaxis secundaria, que tiene la ventaja de no precisar controles analíticos para ajuste de la dosis, se muestra claramente prometedora.

Duración de la profilaxis secundaria en pacientes con trombofilia

Las causas hereditarias de trombofilia conocidas antes de 1993 eran las deficiencias de antitrombina, proteína C y proteína S y, en conjunto, habían sido detectadas como causa del TEV en sólo un 5 a 10 % de los pacientes¹⁶. Los descubrimientos posteriores de dos mutaciones protrombóticas con una mayor prevalencia en la población, el factor V Leiden y

la mutación G20210A de la protrombina, ha elevado este porcentaje por encima del 30 %, lo que ha hecho mayor la necesidad de una estratificación del riesgo trombótico que cada una de ellas comporta, para poder establecer la duración de la profilaxis secundaria tras un episodio de TEV en pacientes con trombofilia (tabla 3).

Evidentemente, la administración de cumarínicos a nivel estándar (INR, 2,0-3,0) da lugar a una clara protección contra el TEV, pero habrá que valorar en cada caso si el riesgo trombótico no es superado por el riesgo de hemorragia mayor que esta terapéutica conlleva y que alcanzaría un 2 a 3 % anual⁹, con incidencias probablemente más altas en la población de edad avanzada.

En primer lugar, parece aceptado de forma general que los portadores de trombofilia hereditaria que permanecen asintomáticos no deben recibir anticoagulación a largo plazo de forma profiláctica, pero sí deben protegerse con medidas de profilaxis cuando se hallen sometidos a situaciones de riesgo.

Siguiendo el análisis realizado recientemente por Bauer¹⁷, sólo estaría justificada la anticoagulación a plazo indefinido en pacientes que hayan sufrido un episodio trombótico espontáneo y presenten un déficit de antitrombina o anticuerpos antifosfolípido o más de una anomalía genética o alélica de otros déficit congénitos, es decir, portadores de un doble defecto u homocigotos para uno de ellos. No existe acuerdo sobre si en este grupo deberían incluirse los déficits heterocigotos de proteínas C y S.

Para el resto de causas de trombofilia, sólo sería recomendable la anticoagulación a largo plazo en aquellos pacientes que han sufrido accidentes trombóticos espontáneos que representaron un riesgo para la vida del paciente, como la EP masiva o la trombosis venosa cerebral, mesentérica, portal o suprahepática; así como en pacientes que han sufrido dos o más accidentes trombóticos espontáneos.

En el resto de pacientes, con trombofilia hereditaria y un episodio de TEV asociado a un factor de riesgo transitorio, probablemente 3 a 6 meses de profilaxis secundaria sean suficientes. Dentro de este grupo se puede incluir la hiperhomocisteinemia moderada, con un riesgo relativo de 2,5¹⁸ y que es un factor de riesgo mixto, ya que puede tener una causa genética o carencial.

Todas estas recomendaciones deben ser tomadas con la adecuada prudencia, debido a lo limitado de la información disponible y a las discrepancias que en ella aparecen, especialmente en lo que respecta a los resultados a largo plazo, y a que los modelos de decisión están basados en hipótesis, no siempre plenamente demostradas.

Dentro de las medidas de profilaxis del TEV en sujetos con trombofilia, hayan iniciado ya con un episodio trombótico o no, debe recordarse la necesidad de no asociar factores de riesgo externos, como la administración de anticonceptivos orales, que da

Tabla 3. Trombofilia. Prevalencia y riesgo relativo de TEV en factores congénitos y mixtos

Factor de riesgo	Prevalencia (%)	Riesgo relativo
Déficit de antitrombina	0,02	50?
Déficit de proteína C	0,2	10
Déficit de proteína S	?	10?
Factor V Leiden heterocigoto	5	3-8
Factor V Leiden homocigoto	0,1	50?
Protrombina G20210A	3	3
Hiperhomocisteinemia (> 18,5 µmol/l)	5-10	2,5
Factor VIII > 150 U/dl	11	3

TEV: tromboembolismo venoso.

Datos tomados de la literatura.

lugar a una incidencia de TEV cuatro veces superior entre las usuarias con respecto a la población sana de igual edad, pero que cuando se asocia a la presencia de factor V Leiden (RR, 8) su asociación pasa a representar un factor de riesgo 35¹⁹.

Conclusiones

A pesar de la falta de una total coincidencia entre los datos expuestos, de ellos se puede deducir que para decidir la duración de la profilaxis secundaria se requiere una cuidadosa valoración del paciente, atendiendo al tipo de accidente trombótico sufrido (TVP o EP) y a la gravedad del mismo, especialmente si puso en peligro la vida del paciente. No sólo se tendrá en cuenta si el episodio de TEV fue secundario a un factor de riesgo transitorio o duradero, sino que también se valorará si éste era “fuerte” (cirugía mayor, traumatismo importante o enfermedad médica mayor) o “débil” (uso de estrógenos, viajes de larga distancia o traumatismo menor).

Destacan como pacientes de mayor riesgo los que presentan episodios trombóticos recurrentes, especialmente si son idiopáticos, y los que han presentado un episodio idiopático y son portadores de trombofilia en sus formas de mayor riesgo, como los déficit de antitrombina (y probablemente proteína C o proteína S), los homocigotos para la mutación factor V Leiden o heterocigotos para dos defectos, y también los que presentan el síndrome de anticuerpos antifosfolípido o neoplasia avanzada.

De los estudios más recientes se desprende que, una vez identificados los pacientes de más alto riesgo, no parece útil la aplicación de una profilaxis secundaria más o menos prolongada (6 meses o un año), ya que, en el momento que se suspende ésta se recupera el riesgo y la frecuencia de recidivas. Para estos pacientes la indicación sería la anticoagulación a largo plazo. Teniendo en cuenta la morbimortalidad asociadas al tratamiento con cumarínicos a nivel estándar a tan largo plazo, probablemente sería aconsejable la utilización de éstos a niveles más moderados o de ximelagatran, también a dosis moderada.

Tabla 4. Duración de la profilaxis secundaria del TEV. Recomendaciones en función del riesgo de recurrencia

Grupo de riesgo	Características del paciente	Riesgo de recurrencia	Duración de la anticoagulación
Bajo	Secundario a factor de riesgo mayor reversible (cirugía o traumatismo mayor, enfermedad grave)	< 5%/año	3 meses
Moderado	Secundario a factor de riesgo débil, (traumatismo menor, estrógenos) sin trombofilia congénita o adquirida	< 10%/año	6 meses
Alto	TEV idiopático sin trombofilia o con Factor V Leiden heterocigoto o mutación G20210A de la protrombina	~ 10%/año	6 meses*
Muy alto	TEV idiopático y recurrente con o sin trombofilia TEV idiopático con déficit de antitrombina, proteína C o proteína S; homocigoto factor V Leiden; doble heterocigosidad; síndrome anticuerpo antifosfolípido; neoplasia avanzada	> 12%/año	Tratamiento prolongado o a plazo indefinido

*Puede considerarse una mayor duración de acuerdo con la preferencia del paciente y con una revisión anual.

TEV: tromboembolismo venoso.

Tomada de Hirsh y Lee, 2002²⁰.

Una revisión que vendría a sintetizar lo hasta aquí expuesto es la publicada Hirsh y Lee²⁰ (tabla 4), cuya lectura recomendamos, ya que, aparte de tener una amplia base bibliográfica, se fundamenta en una sólida experiencia clínica.

Bibliografía

- Brandjes DP, Heijboer H, Buller HR, De Rijk M, Jagt H, ten Cate JW. Acenocoumarol and heparin compared with acenocoumarol alone in the initial treatment of proximal-vein thrombosis. *N Engl J Med* 1992; 327:1485-9.
- Hull R, Hirsh J, Jay R, Carter C, England C, Gent M, et al. Different intensities of oral anticoagulant therapy in the treatment of proximal-vein thrombosis. *N Engl J Med* 1982;307:1676-81.
- Coon WW, Willis PW 3rd, Keller JB. Venous thromboembolism and other venous disease in the Tecumseh community health study. *Circulation* 1973;48:839-46.
- Lagerstedt CI, Olsson CG, Fagher BO, Oqvist BW, Albrechtsson U. Need for long-term anticoagulant treatment in symptomatic calf-vein thrombosis. *Lancet* 1985;2:515-8.
- Research Committee of the British Thoracic Society. Optimum Duration of Anticoagulation for Deep-Vein Thrombosis and Pulmonary Embolism. *Lancet* 1992;340:873-6.
- Levine MN, Hirsh J, Gent M, Turpie AG, Weitz J, Ginsberg J, et al. Optimal Duration of Oral Anticoagulant Therapy: A Randomized Trial Comparing Four Weeks with Three Months of Warfarin in Patients with Proximal Deep Vein Thrombosis. *Thromb Haemostasis* 1995;74:606-11.
- Pinede L, Duhaut P, Cucherat, Ninet J, Pasquier J, Boissel JP. Comparison of long versus short duration of anticoagulant therapy after first episode of venous thromboembolism: A meta-analysis of randomized, controlled trials. *J Intern Med* 2000;247:553-62.
- Prandoni P, Lensing AWA, Cogo A, Cuppini S, Villalta S, Carta M, et al. The Long-Term Clinical Course Of Acute Deep Venous Thrombosis. *Ann Intern Med* 1996;125:1-7.
- Schulman S, Granqvist S, Holmström M, Carlsson A, Lindmarker P, Nicol P, et al. The Duration of Oral Anticoagulant Therapy after a second episode of venous Thromboembolism. *NEJM* 1997;336:393-8.
- Kearon C, Gent M, Hish J, Weitz J, Kovacs MJ, Anderson DR, et al. A Comparison of Three Months of Anticoagulation with Extended Anticoagulation for a First Episode of Idiopathic Venous Thromboembolism. *NEJM* 1999;340:901-7.
- Agnelli G, Prandoni P, Santamaria MG, Bagatella P, Iorio A, Bazzan M, et al. (WODIT) Three Months versus One Year of Oral Anticoagulant Therapy for Idiopathic Deep Venous Thrombosis. *NEJM* 2001;345:165-9.
- Agnelli G, Prandoni P, Becattini C, Silingardi M, Taliani MR, Miccio M, et al. Warfarin Optimal Duration Italian Trial Investigators. Extended oral anticoagulant therapy after a first episode of pulmonary embolism. *Ann Intern Med* 2003;139:19-25.
- Ridker PM, Goldhaber SZ, Danielson E, Rosenberg Y, Eby CS, Deitcher SR, et al. PREVENT Investigators. Long-term, low-intensity warfarin therapy for the prevention of recurrent venous thromboembolism. *N Engl J Med* 2003;348:1425-34.
- Kearon C, Ginsberg JS, Kovacs MJ, Anderson DR, Wells P, Julián JA, et al. Extended Low-Intensity Anticoagulation for Thrombo-Embolic Investigators. Comparison of low-intensity warfarin therapy with conventional-intensity warfarin therapy for long-term prevention of recurrent venous thromboembolism. *N Engl J Med* 2003;349:631-9.
- Schulman S, Wahlander K, Lundstrom T, Clason SB, Eriksson H. THRIVE III Investigators. Secondary prevention of venous thromboembolism with the oral direct thrombin inhibitor ximelagatran. *N Engl J Med* 2003;349:1713-21.
- Heijboer H, Brandjes DP, Buller HR, Sturk A, ten Cate JW. Deficiencies of coagulation-inhibiting and fibrinolytic proteins in outpatients with deep-vein thrombosis. *N Engl J Med* 1990;323:1512-6.
- Bauer KA. Management of thrombophilia. *J Thromb Haemostasis* 2003;1:1429-34.
- Den Heijer M, Koster T, Blom HJ, Bos GM, Briet E, Reitsma PH, et al. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis. *N Engl J Med* 1996;334:759-62.
- Vandenbroucke JP, Koster T, Briet E, Reitsma PH, Bertina RM, Rosendaal FR. Increased risk of venous thrombosis in oral-contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation. *Lancet* 1994;344:1453-7.
- Hirsh J, Lee AY. How we diagnose and treat deep vein thrombosis. *Blood* 2002;99:3102-10.

ACTUALIDADES EN HEMOTERAPIA

COORDINADORA: E. CASTRO. *Falta centro??, Madrid*

Resumen del simposio

Desde hace ya más de dos décadas la hemoterapia se ha orientado de una forma prioritaria hacia la seguridad de las transfusiones. La disponibilidad de sangre segura es un factor crítico para el progreso de la medicina y para la salud pública. Hace ahora 20 años, aproximadamente 1 de cada 100 unidades de sangre transmitían el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o el virus de la hepatitis C (VHC). Gracias a las mejoras introducidas en la selección de los donantes y todas las innovaciones técnicas que vinieron, tanto en la serología de estos virus como, más recientemente la introducción de técnicas de amplificación de los ácidos nucleicos de los mismos, la seguridad ha mejorado en un factor de 1.000.

A pesar de esta inmensa mejora tenemos que pensar en cómo prevenir futuras y potenciales catástrofes. Entre estas posibles amenazas, algunas ya son conocidas, aunque no efectivamente tratadas, es el caso de la contaminación bacteriana de los componentes sanguíneos, hasta ahora infravalorada pero que emerge como problema. No en vano se calcula que 1 de cada 2.000 transfusiones de plaquetas podrían estar contaminadas, con reacciones fatales en muchos pacientes. Aunque el cultivo rápido de las bacterias en los componentes sanguíneos puede mejorar el problema, no lo resuelve satisfactoriamente. La potencial amenaza de enfermedades transmitidas por picadura de mosquitos como el paludismo o el dengue, es una amenaza también conocida, pero que se está convirtiendo en un nuevo problema de salud pública que también afecta a la seguridad transfusional. De hecho hasta hace tan sólo unos pocos años se consideraba más un riesgo ligado a los viajes y por tanto de poca entidad, que se podía resolver excluyendo por 6 meses a los viajeros. Pero ¿qué va a ocurrir ahora que el número de inmigrantes a nuestro país procedentes de estas áreas crece anualmente de forma exponencial? ¿La misma pregunta para una nueva amenaza para nuestro suministro de sangre, el *Trypanosoma cruzi*, endémico en amplias zonas del continente americano, de donde proceden más del 50% de los inmigrantes que llegan a España? Según un reciente estudio realizado por nosotros, hasta un 1% de los inmigrantes de estas áreas que se acercaron a donar en los últimos 2 años son portadores de anticuerpos frente al *T. cruzi*. Otras amenazas del suministro de sangre las producen la *Babesia microti* en amplias zonas de Estados Unidos, la leishmania es un problema en personas llegadas de Oriente medio. Otro tipo de agentes infecciosos nuevos como la nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, toma cuerpo como amenaza a la transfusión desde que se han comunicado dos casos en el Reino Unido transmitidos por transfusión. Mención especial también merece la epidemia de West Nile virus, que en los últimos 3 años que ha puesto en jaque a la seguridad transfusional en Estados Unidos.

Ante las nuevas amenazas no tenemos una gran capacidad de respuesta inmediata, podemos optar por la exclusión temporal de donantes, al menos hasta que se desarrolle un test específico, pero no deja de ser una medida insatisfactoria e ineficiente, que además socava las reservas de sangre.

En nuestra era ha mejorado la capacidad de afrontar las nuevas amenazas en mucho menor tiempo que cuando sobrevino la epidemia por VIH hace 20 años, pero es preciso mejorar las tecnologías y mantener el nivel de alerta y de investigación en este campo. Estas necesidades incluyen el desarrollo de test que permitan analizar múltiples patógenos simultáneamente, métodos que mejoren el almacenamiento de los componentes sanguíneos por más largo tiempo y formas más efectivas de eliminar los patógenos de los componentes sanguíneos, preservando a su vez la funcionalidad.

Por otro lado, es preciso mantener la donación de sangre en los niveles necesarios para mantener un nivel adecuado de suministro a los hospitales. Es preciso mejorar los conocimientos en el campo de la motivación de los donantes de sangre y llevar a cabo los esfuerzos necesarios para incrementar el número de donaciones de sangre.

Este simposio, en línea con estas tendencias, trata dos aspectos que sin duda van a contribuir en el futuro inmediato a la mejora de esta seguridad de las transfusiones.

Por una parte se tratará la nueva legislación, que estará centrada en las nuevas Directivas Europeas sobre sangre (Directiva 2002/98/EC y la Directiva 2004/22/CE de 22 de marzo de 2004). Ante la inminencia de su entrada en vigor el próximo 8 de febrero de 2005, se proponen algunas reflexiones sobre el impacto que la misma tendrá en los centros de transfusión y hospitales de nuestro país. La Directiva Europea tiene la intención de armonizar los niveles de seguridad en todos los países de la Unión Europea, sentando los mínimos exigibles a sus miembros. Afecta fundamentalmente a la parte de la producción de los componentes sanguíneos y no profundiza en la parte clínica de la misma. Deja además libertad a cada país para hacer legislaciones más estrictas. Se ha hecho especial hincapié en las disparidades que se dan en diferentes Comunidades Autónomas y en los problemas que algunas han de confrontar en tan corto espacio de tiempo. Para finalmente concluir que el objetivo es aumentar la seguridad de la transfusión y la mejora integral del sistema hemoterápico español y que sin duda se traducirá en un beneficio para los destinatarios finales, los pacientes.

La segunda parte de la sesión estará destinada a desgranar los aspectos más importantes que las nuevas tecnologías de inactivación de patógenos en los componentes sanguíneos nos van a brindar en un futuro inmediato. A las ya conocidas y empleadas en nuestro país en el plasma de uso clínico y hemoderivados plasmáticos, se une en la actualidad una tecnología que permite el tratamiento de los concentrados de plaquetas para eliminar una amplia gama de agentes infecciosos, que incluyen no sólo los virus, sino las bacterias y los parásitos. Además otorgan la ventaja añadida, al alterar la replicación de los linfocitos T, de aportar un producto muy seguro para prevenir la enfermedad del injerto contra huésped transfusional.

El formato de "Pro"/"Contra" permite revisar todas las ventajas, e inconvenientes que los sistemas presentan de una forma coherente y objetiva.

En la ponencia dedicada a los "Pro" el autor versará sobre las características y forma de actuación de los sistemas y detallará todos los estudios de seguridad y toxicología a los que ha sido sometida la tecnología para su registro y marca CE. Por otro lado, hablará de la justificación de su empleo, prestando especial atención a los beneficios sobre dos amenazas infecciosas que no están adecuadamente tratadas en la actualidad, como son la contaminación bacteriana de los componentes sanguíneos lábiles, especialmente las plaquetas y los nuevos virus emergentes. Asimismo versará sobre los resultados obtenidos por los sistemas en su uso clínico.

En la ponencia sobre los "Contra" se revisan los puntos débiles del sistema, como la inexistencia de un único compuesto capaz de inactivar la sangre total, que obliga a tratar cada componente sanguíneo con un agente diferente. Otra posible limitación se refiere a la capacidad de inactivación de bajas concentraciones de determinados virus. Las implicaciones clínicas de un producto que ve reducida su concentración por el tratamiento también ha de ser considerado, así como los aspectos toxicológicos, que aunque ampliamente estudiados, necesitan la perspectiva del tiempo para ser completamente elucidados. También y no menos importante se tratará el aspecto económico, como una posible limitación en su empleo rutinario.

LA DIRECTIVA DE LA UNIÓN EUROPEA: PERSPECTIVAS A MENOS DE UN AÑO DE SU ENTRADA EN VIGOR

R. GARCÍA DE VILLAESCUSA COLLAZO
Hospital Central de la Cruz Roja. Madrid.

En febrero de 2003 fue publicada la Directiva 2002/98/CE, en relación con la sangre y los componentes sanguíneos. En ella, se establecían los principios fundamentales que regularán en todo el territorio de la Unión Europea, actual y futuro, normas de calidad y seguridad para la extracción, tratamiento, almacenamiento y distribución de sangre y sus componentes.

El objetivo que persigue dicha Directiva, es alcanzar un elevado y homogéneo nivel de calidad y seguridad en todos los estados miembros actuales y de incorporación próxima, para que, cualquier ciudadano de la UE, goce de las mismas y equivalentes cotas de seguridad transfusional, independientemente de donde resida.

Además de establecer una serie de conceptos clarificadores, especialmente en lo referido a la definición y actividades que podrán realizar los Centros y Servicios de Transfusión, la autosuficiencia basada en la donación altruista, también incorpora la obligatoriedad de establecer sistemas de aseguramiento de la calidad y hemovigilancia, introduce los criterios de designación, autorización y los de inspección periódica de todos los Centros y Servicios de Transfusión por parte de la autoridad sanitaria, completándose la citada directiva, con los anexos técnicos que por primera vez ponen un especial énfasis en la necesidad de vincularlos a los avances científico-técnicos.

El plazo para la aplicación de la directiva y su transposición a la legislación de los estados miembros finalizará en febrero de 2005, disponiendo de un período de 6 meses adicionales para su entrada en vigor.

El 30 de marzo del año en curso, se publicó la Directiva 2004/33/CE de 22 de marzo, en la que se determinan los requisitos técnicos de la sangre y los componentes sanguíneos y se adoptan las definiciones comunes para la terminología técnica con el fin de garantizar la aplicación coherente de la Directiva 2002/98/CE.

En la misma, se establecen 5 anexos técnicos: Anexo I, referido a las definiciones, el Anexo II con sus dos apartados, el primero recoge los requisitos relativos a la información a proporcionar a los posibles donantes de sangre o componentes sanguíneos y el segundo apartado, detalla la información que el Centro de Transfusión debe recabar de los donantes en cada donación.

El Anexo III contempla los siguientes apartados: criterios de selección y exclusión de donantes tanto permanentemente como definitiva e introduce como novedades,

la exclusión por situaciones epidemiológicas concretas así como un apartado dedicado a los criterios de exclusión para donantes de donación autóloga.

El Anexo IV precisa las condiciones de almacenamiento, transporte y distribución así como otros requisitos complementarios para las donaciones autólogas.

Finalmente el Anexo V define los requisitos de calidad y seguridad de la sangre y componentes tanto en lo referido a las mediciones exigibles y a los resultados admisibles así como, se incluyen otros parámetros considerados tan sólo como recomendaciones.

Esta directiva es igualmente aplicable a la sangre y componentes sanguíneos importados de terceros países, incluidos los utilizados como materia prima para la fabricación de hemoderivados, los cuales deberán cumplir los mismos requisitos de calidad y seguridad que se fijan en la misma.

La incorporación de la Directiva 2004 a la normativa estatal sin perjuicio de lo establecido en la Directiva 2002, establece como plazo máximo el 8 de febrero de 2005, debiendo los estados miembros adoptar las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas necesarias para su cumplimiento.

La Hemoterapia Española, dadas sus especiales características y peculiaridades, su modelo sanitario descentralizado y su heterogéneo nivel de desarrollo tanto en autosuficiencia como en infraestructuras hemoterápicas, presenta una especial dificultad para su implantación.

Ciertamente algunas comunidades autónomas se encuentran en una posición privilegiada para conseguir estar en disposición de aplicar y cumplir la directiva en la fecha límite, sin embargo, otras se encuentran muy lejos de poder lograrlo y apenas han dado alguna señal de mostrar un cambio de sus sistemas hemoterápicos.

Con todo, todavía resta por desarrollar muchos aspectos fundamentales especialmente el marco normativo, ya que probablemente exija una revisión del actual RD 1945/1985 que regula la Hemodonación y la Hemoterapia en España, dicha modificación conlleva un tiempo al que debe sumarse la actualización posterior de los decretos autonómicos. Además es preciso el desarrollo e implementación efectivo de procedimientos de designación, autorización y acreditación por parte de la autoridad sanitaria.

Especialmente preocupante pueden representar dos aspectos claves: la inspección técnica de la totalidad de los Servicios de Transfusión y la financiación de los Servicios y Centros de Transfusión.

Con relación a la primera cuestión, no se dispone de un número suficiente de inspectores médicos con conocimientos técnicos específicos en Hemoterapia para abordar una inspección técnica de todos los Centros y Servicios de Transfusión del estado en el plazo que resta para la entrada en vigor de la directiva.

Una colaboración de la SETS a través del CAT, podría ayudar a paliar este déficit, si bien el número de

inspectores es también muy reducido, podrían colaborar con los servicios de inspección de la administración.

La designación y algunos casos la creación y puesta en funcionamiento de Centros de Transfusión en aquellas comunidades que todavía aún no lo han abordado, puede que ya se encuentren en serias dificultades para finalizarlo en los plazos citados.

La segunda cuestión, la financiación de los Servicios y Centros de Transfusión es otro aspecto prioritario ya que, al tener carácter anual, y ya que no es posible su adopción para el ejercicio del 2004, debería ser contemplada su inclusión en el anteproyecto de presupuestos para el año 2005.

De cumplirse los requisitos de la Directiva en el sentido estricto, los recursos actualmente empleados para la promoción, obtención, procesamiento y verificación de la sangre, deberían ser transferidos a los Centros de Transfusión designados para poder realizar con los mismos, dichas actividades.

Además, las exigencias de nuevas medidas de calidad y seguridad implantadas recientemente unas (leucorreducción, técnicas de ácidos nucleicos para el escrutinio de virus) y de incorporación en un futuro próximo otras (inactivación de patógenos) obliga a un exhaustivo análisis de costes para aproximarse al coste real y con ello, una elaboración presupuestaria más rigurosa y realista.

Por otra parte, dicha reubicación de recursos económicos podría representar un serio problema para los Servicios de Transfusión ya que, en muchos casos, la financiación de los mismos es claramente insuficiente y sin embargo, hace preciso una redistribución de capital humano y recursos tecnológicos para no generar más ineficiencias.

Si es bien entendido, y este proceso se realiza con inteligencia y amplitud de miras, probablemente cabe considerarlo más como una oportunidad que como una amenaza, para la dotación racional que los Servicios de Transfusión vienen demandando en los últimos años, destinando más recursos a aquellos aspectos que inciden más en la seguridad, tal y como ponen de manifiesto la gran mayoría de los informes de Hemovigilancia en el ámbito estatal e internacional. No parece razonable seguir manteniendo posiciones numantinas y sí de nuevas oportunidades.

Finalmente podría ser el momento de revisar de igual forma, las estructuras hemoterápicas a nivel del Ministerio de Sanidad cuya función de integración y coordinación en el ámbito estatal a pesar de los últimos cambios, son claramente insuficientes. Una Agencia Estatal de la Sangre a modo y semejanza de la de Medicamentos y Productos Sanitarios o la de Seguridad Alimentaria, podría ser el marco ideal para mejorar y situar a España en un nivel similar y equiparable a los estados europeos más avanzados. En cualquier caso no se debería abordar los futuros retos de la Medicina Transfusional con las actuales estructuras.

Nos resta menos de un año para conseguirlo y aunque disponemos de profesionales y técnicos sobradamente preparados para poder lograrlo, no es tiempo de letargos y si de pasar a la acción, procurando hacer los deberes a tiempo para superar el examen.

Bibliografía

Directiva 2002/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 27 de enero de 2003, por la que se establecen normas de calidad y de seguridad para la extracción, verificación, tratamiento, almacenamiento y distribución de sangre humana y sus componentes.

Directiva 2004/33/CE de la Comisión de 22 de marzo de 2004 por la que se aplica la Directiva 2003/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que se refiere a determinados requisitos técnicos de la sangre y los componentes sanguíneos.

IN FAVOR OF PATHOGEN REDUCTION TECHNOLOGY

L. CORASH

Cerus Corporation and Department of Laboratory Medicine, University of California, San Francisco.

Introduction

Transfusion of blood components has been implicated in the transmission of viral, bacterial, and protozoan infections¹. While it is commonly recognized that hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), cytomegalovirus (CMV), and the retroviruses, such as human immunodeficiency virus (HIV) and the human lymphotropic viruses (HTLV) can be transmitted by transfusion of blood components, other pathogens are emerging as potentially significant transfusion-associated infectious agents. For example, transfusion-transmitted infections due to *T. cruzi* and *B. microti* have been documented²⁻⁴. More importantly, new infectious agents periodically enter the donor population before a test is available. A highly relevant recent example is the epidemic of West Nile virus infections with confirmation of transfusion-transmitted cases in 2002^{5,6}. Testing is inherently a reactive intervention that is effective only once an infectious agent is identified, a test developed and validated, and then implemented. In contrast, a robust pathogen reduction technology, if sufficiently effective against a broad spectrum of pathogens, has the potential for prospective efficacy against emerging pathogens before a test can be implemented. This review will focus primarily on platelets treated with amotosalen HCl and UVA light as an example of pathogen reduction, since this product has recently received the European CE Mark and is currently being introduced into clinical practice.

Limitations of testing

Currently, prevention of transfusion-associated viral disease depends upon pre-donation evaluation of potential donors followed by testing for infectious

pathogens including: HIV-1 and -2, HTLV-I, HBV, and HCV. In addition to these agents, blood is tested for the syphilis pathogen (*Treponema pallidum*). Recently, U.S. and European blood centers have initiated various methods for detection of bacterial contamination of platelet components. Testing is not routinely performed for CMV, parvovirus B19, hepatitis A virus (HAV), hepatitis G virus (HGV), hepatitis E virus (HEV), Epstein Barr virus, herpes viruses (HHV-6, HHV-8), or protozoa. Improvements in testing have reduced the transmission of viral disease by blood components, but viruses may still contaminate the blood supply because diagnostic tests may be insensitive during the “window period” and samples with low numbers of viral copies may not be detectable. For example, patients with occult hepatitis B virus infections may have no detectable anti-HBs or anti-HBc and have viral loads below 1000 IU/mL which are not reliably detectable in nucleic acid assays with a pool size of 16⁷.

Current estimates of the residual risk of viral contamination in donor samples tested with nucleic acid detection methods vary across different geographies, and are dependent on the prevalence of each virus within the donor population (table 1). New agents, such as West Nile virus (WNV) may be present in up to 1 in 6,000 blood donors who are asymptomatic at time of donation⁸. Recent experience with nucleic acid testing of pooled samples has confirmed that individual donation testing is required to detect samples with low numbers of WNV copies (1-75 pfu/mL); and even under those conditions, not all contaminated samples can be detected. Six probable cases of WNV were reported associated with donor samples containing less than 1 pfu/mL⁸.

Bacterial contamination of platelet concentrates continues to be reported; and may be under reported. Prior estimates of the frequency of bacterial contamination range up to 0.4 % of platelet concentrates⁹. More recent surveillance data of 107,827 platelet products detected 846 confirmed contaminated samples (0.7%). Of the contaminated products, only a portion were recalled prior to transfusion¹⁰. A similar experience has been reported for another study of 28,104 platelet products with a contamination rate of 0.72%¹¹. These studies demon-

strate that bacterial culture methods are not sufficiently sensitive to detect components contaminated with small numbers of bacteria or with slow growing bacteria since products may be released before culture results are available. Thus, use of these methods has resulted in the release and transfusion of contaminated platelet components.

Limitations of leuko-reduction and gamma irradiation

Interventions such as leuko-reduction have reduced the risk of some transfusion-transmitted infections, such as cytomegalovirus¹². However, despite the reduction of leukocytes to < 10⁶ per blood component, sensitive methods have confirmed the persistence of leukocyte-associated CMV and HTLV-1 viral nucleic acid sequences in processed blood components^{13,14}. These observations are consistent with recent clinical data confirming that following the extensive use of leukofiltration to prevent CMV infection, the incidence of transfusion-transmitted CMV infection increased in comparison to the incidence reported with use of CMV sero-negative components¹⁵. More importantly, leuko-reduction is not sufficiently effective to prevent transfusion-associated graft -versus-host disease (TA-GVHD)^{16,17}.

While gamma irradiation is effective for prevention of TA-GVHD, the dose response curve is steep with little margin for safety when sub-optimal radiation is delivered¹⁸. More importantly, gamma irradiation is generally not applied to all blood components held in inventory, but is used selectively when a patient at risk for TA-GVHD is identified¹⁹. With the advent of new, highly immunosuppressive therapies, not all patients at risk may be identified and non-irradiated components may be transfused resulting in TA-GVHD²⁰. Gamma irradiation creates infrequent DNA strand breaks, but is not sufficiently effective to inhibit cytokine synthesis and thus prevent cytokine mediated acute transfusion reactions²¹.

Residual risk of transfusion-transmitted infections from a patient perspective

Despite the institution of redundant tests for HIV, HCV, and HBV, residual risk of contamination due to these three pathogens persists (table 1). The cu-

Table 1. Residual risk of contamination from HIV, HCV, and HBV in donors evaluated using nucleic acid testing

Virus	France ^a	Germany ^b	Italy ^c	Spain ^d	UK ^e
HIV	1:2,700,000	1:10,753,696	1:909,150	1:1,420,000	1:8,000,000
HCV	1:8,300,000	1:1,157,414	1:762,000	1:236,667	1:30,000,000
HBV	1:470,000	1:1,585,571	-	1:177,500	1:260,000
Cumulative risk (HIV, HCV, HBV)	1:381,751	1:629,378	1:414,548	1:94,667	1:249,000

^a Pillonel et al³⁷; ^b Seifried et al⁵¹; ^c Velati et al⁵²; ^d Álvarez et al⁵³; ^e Barbara⁵⁴. Based on data reported after implementation of nucleic acid testing in respective countries.

mulative risk of residual contamination for these pathogens is low when expressed on a per donation basis, especially with respect to repeat donors. However, it may be more appropriate to assess residual risk on a per patient basis. For example, patients requiring platelet transfusions during induction treatment of acute leukemia or hematopoietic stem cell transplantation may receive an average of 8 transfusions, and some patients many more²². Thus, the average risk per patient during a cycle of induction therapy is at least 8 fold higher than the risk per donation. If a pooled product is used, then the risk must be multiplied by the number of donors included in the pool.

There are relatively few studies that have examined residual risk on a per patient basis. The prospective study of Chiu et al examined the risk of transfusion-transmitted bacterial infections during bone marrow transplantation. This prospective study of 3,584 platelet transfusions in 161 bone marrow transplant patients requiring repeated platelet transfusions demonstrated the risk of symptomatic bacteremia was 1 per 16 patients²³. Furthermore, bacterial infection may be asymptomatic or with delayed onset such that a relationship to blood transfusion is not suspected. Patients who are treated with ablative chemotherapy may receive platelet transfusions through central venous catheters. Transfusion of blood products through central venous catheters has been associated with an increased risk of catheter related sepsis²⁴. The increased risk of catheter related sepsis may be due to bacterial contamination of blood products and the possible role of platelets, in particular, in supporting the adherence of bacteria to artificial surfaces²⁵.

For patients treated with therapeutic plasma exchange therapy the residual risk may be substantially greater than for patients receiving platelets. During treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP), the average patient underwent 15 therapeutic plasma exchanges with 1 to 1.5 blood volumes of replacement donor plasma²⁶. One course of treatment could result in exposure to 160 donations. For this patient population, the cumulative residual risk for HIV, HBV, and HCV could be as high as 1 in 587 patients in Spain, based on post nucleic acid testing data (table 1).

Moreover, following occurrence of disasters that encourage many new first-time donors, the residual risk may increase by as much as four-fold due to the influx of first-time donors²⁷. Current testing strategies only test for four viruses (HIV, HBV, HCV, and HTLV); but other pathogens may be present in donations and the prevalence may vary considerably in different geographic regions, in different donor populations, and during certain seasons such as the recent West Nile virus epidemic in the United States⁶.

Potential objections to pathogen inactivation

Since pathogen reduction technology requires the use of chemical reagents, with or without light, the

safety of treated blood components, and the function of the treated components is a relevant issue. In addition, the implementation of pathogen reduction technology requires a change in the operation procedures of blood centers with potential impact on the cost of blood components. Each of these factors may be considered as a potential objection to pathogen inactivation and merits consideration.

Safety assessment of pathogen inactivation processes

Relatively few technologies used in the preparation of blood components have been rigorously evaluated in pre-clinical and clinical trials. Introduction of potentially active compounds into blood components requires careful evaluation. Currently, only one method for pathogen inactivation treatment of platelet components has received the CE Mark for use in European blood centers²². This method utilizes a psoralen compound, amotosalen HCl, and long wavelength ultraviolet light (UVA) to inactivate pathogens and residual leukocytes²⁸. The developmental program for this technology was conducted as for a new pharmaceutical, although the residual psoralen has no intended pharmacologic activity²⁹. A similar program was conducted for the same technology as applied to plasma³⁰. Because pathogen reduction methods may target nucleic acid, evaluation of potential carcinogenic effects has been a specific focus of the development program for the psoralen technologies³¹. Assay systems to assess carcinogenic potential have been developed using transgenic mice heterozygous for the p53 mutation. This test system is particularly relevant for platelet components treated with psoralens since patients who receive platelets may have a genetic predisposition to neoplasia. The p53 knockout mouse assay requires repeated intravenous administration of test articles over a six-month period, which comprises approximately 25 % of the murine life span. Thus, this assay provides valuable information regarding repeated administration and long-term safety in animals with a genetic pre-disposition to cancer.

Other key issues that have been raised regarding the safety of pathogen reduction are long-term safety, safety for pediatric patients, and safety for pregnant patients. Long-term safety is not readily assessable through clinical studies, and pre-clinical studies must form the basis for evaluating long-term safety. In contrast to medications that are administered daily for long periods of time, platelet transfusions are generally administered for short periods which may be repeated after transfusion-free intervals. To assess the long term safety of platelets treated with amotosalen, animal models were used in which test article doses (25 mL/kg) five times the clinical dose of platelets (5 mL/kg) were administered to animals daily for up to nine months^{29,30}. The period of exposure covered 25 to 30 % of the expected life span of the test animals. For platelets and plasma treated

with amotosalen and UVA light, no toxicities were observed. Likewise, reproductive toxicity studies with amotosalen have been conducted to evaluate potential effects during pregnancy and the peri-natal period³². No effects have been observed in pregnant animals. Recently, studies were conducted in juvenile animals using amotosalen HCl and platelets and plasma prepared with amotosalen HCl. No toxic effects were observed during the early developmental stage of these animals. Other studies established that the kinetics of clearance of residual amotosalen after transfusion of platelets or plasma were similar in humans and multiple animal species indicating that animal models to assess toxicity were based on similar peak plasma levels of amotosalen³³. Similar studies have not been reported for plasma treated with methylene blue³⁴.

Evaluation of safety during clinical trials is another important component of the development program for pathogen inactivation technology. For the amotosalen HCl pathogen reduction treatment, clinical safety was assessed in multiple clinical trials for both platelets and plasma. For platelets, studies were designed to mimic the clinical conditions in which platelets may be transfused every 1 to 3 days for up to 56 days followed by a second cycle of transfusion if patients continued or returned for additional therapy. In a randomized, controlled study of 103 patients transfused with buffy coat platelets prepared with amotosalen HCl in comparison to conventional platelets, no substantial safety issues were observed²². In a second randomized, controlled study of 645 patients transfused with single donor platelets prepared with amotosalen HCl and UVA light compared to conventional platelets, no differences in the incidence of grade 3/4 or serious adverse events were observed³⁵. After the introduction of this technology into clinical use, a haemovigilance reporting network was developed to collect additional safety information, this process is ongoing.

Functional efficacy of components treated with pathogen reduction technology

The retention of functional efficacy following pathogen reduction treatment is critical. Functional efficacy can be evaluated by *in vitro* assays, but more relevant is demonstration of therapeutic efficacy in randomized clinical trials. The therapeutic efficacy of platelets prepared with amotosalen HCl and UVA light has been evaluated in three randomized clinical trials. In a study of 103 patients randomized to receive either treated platelets or conventional platelets for up to 56 days, comparable count increments and hemostasis were observed between the treatment groups²². A larger randomized, controlled clinical trial was used to assess the hemostatic efficacy of platelets treated with amotosalen HCl and UVA in comparison to conventional platelets³⁵. The primary endpoint of this study was the incidence of grade 2

bleeding (WHO scale). Secondary endpoints included higher grade bleeding and count increments. This study demonstrated that grade 2 bleeding and higher grade bleeding was equivalent between the treatment groups. Patients transfused with platelets treated with pathogen reduction had lower 1 and 24-hour count increments, a shorter interval between transfusions, and required more platelet transfusions. However, some of these differences may have been attributable to the use of a prototype device resulting in smaller platelet doses. A subsequent study with an integrated processing set did not show an increased requirement for more platelet transfusions³⁶.

Cost-effectiveness of the pathogen inactivation processes

The economics of introducing a new technology such as pathogen inactivation are relevant to consideration of whether the technology merits adoption. The current foundation to insure safety of labile blood components is donor screening and testing, most recently including nucleic acid testing for HIV, HCV, and in some countries HBV. In order to increase sensitivity to detect these pathogens, multiple assays for each pathogen are used. With the implementation of additional tests, very few tests have been removed, thus the cost effectiveness of each additional test is lowered and the cost to identify each contaminated donation increases. For example, the cost of preventing one case of severe HCV-related disease per year in France has been estimated at 79,000,000 €³⁷. In the U.S., it is estimated that nucleic acid testing will cost between \$4,700,000 and \$11,200,000 per quality life-year saved³⁸. Recently, bacterial culture testing for all platelet components was initiated in some countries, and this has added additional cost to the preparation of platelet components without preventing the transfusion of contaminated platelet components¹⁰.

Pathogen reduction technology offers the potential to exchange or remove certain costs from the system that will improve cost effectiveness for this technology (table 2). Each of these potential changes will reduce the cost of preparing platelet components, and some of these have already been achieved by blood centers adopting pathogen reduction technology. Based on initial experience, pathogen reduction technology appears to fit within blood center routine manufacturing requirements³⁹.

The rationale for pathogen inactivation of labile blood components

Testing remains a reactive strategy to insure blood component safety. A complementary approach to improving the safety of blood component transfusion is inactivation of infectious pathogens in blood components. Furthermore, a technology capable of inactivating residual leukocytes confers additional benefits, due a variety of adverse immune events ranging in severity from febrile transfusion reac-

Table 2. Potential areas for cost savings with use of pathogen reduction technology

Bacterial cultures
CMV serologic testing
Gamma irradiation
Increased volunteer donor plasma yield
Single donation nucleic acid testing
Avoidance of new tests: Parvovirus B19, West Nile virus, EBV, HHV-6, HHV-8
Extension of platelet storage
Removal of donor travel restrictions
Shift of platelet inventory from single donor to whole blood pooled components

tions⁴⁰ alloimmunization⁴¹, and graft-versus-host disease^{22,42}. The efficacy for pathogen reduction technology depends on the specific characteristics of each system. As an example, amotosalen HCl and UVA light has demonstrated broad efficacy against enveloped viruses, bacteria, and a spectrum of non-enveloped viruses^{43,44}. Additional studies have shown that the technology is effective against protozoa⁴⁵ and emerging pathogens^{46,47}.

Earlier studies have shown that a robust pathogen inactivation process effectively inactivates leukocytes with inhibition of T-cell proliferation, cytokine synthesis, and presentation of leukocyte activation antigens^{21,48,49}. These effects may have contributed to the reduced incidence of acute transfusion reactions observed during a randomized clinical trial³⁵. Moreover, the lower concentration of allogeneic plasma used with pathogen reduction may contribute to fewer allergic transfusion reactions due to allogeneic plasma proteins⁵⁰ and ultimately to a reduction in the incidence of transfusion related acute lung injury.

In conclusion, pathogen reduction technology has the potential to improve the prevention of transfusion-transmitted infections. Development programs have been conducted to provide information to demonstrate large safety margins based on pre-clinical studies and comparable post-transfusion clearance of residual compounds in animals and humans. Randomized clinical trials have been conducted to provide sufficient information to assess the safety profile and the functional efficacy of blood components prepared with pathogen reduction technology.

References

- Dodd RY. Will blood products be free of infectious agents? In: Nance SJ, ed. *Transfusion Medicine In The 1990's*. Arlington: American Association of Blood Banks 1990:223-51.
- McQuiston JH, Childs JE, Chamberland ME, Tabor E. Transmission of tick-borne agents of disease by blood transfusion: A review of known and potential risks in the United States. *Transfusion* 2000;40:274-84.
- Leiby DA, Herron RM, Read EJ, Lenes BA, Strumpf RJ. *Trypanosoma cruzi* in Los Angeles and Miami blood donors: Impact of evolving donor demographics and seroprevalence and implications for transfusion transmission. *Transfusion* 2002;42:549-55.
- Leiby D, Gill J, Johnson ST, et al. Lessons learned from a natural history study of *Babesia microti* infection in Connecticut blood donors. *Transfusion* 2002;42(Suppl):30.
- Biggerstaff BJ, Petersen LR. Estimated risk of transmission of the West Nile virus through blood transfusion in the US, 2002. *Transfusion* 2003;43:1007-17.
- Biggerstaff BJ, Pedersen LR. West Nile virus transmission through transfusion during an epidemic in Queens, New York City. *Transfusion* 2002;42:1019-26.
- Allain JP. Occult hepatitis B virus infection: Implications in transfusion. *Vox Sang* 2004;86:83-91.
- Montgomery SP. Screening of the national blood supply for West Nile virus - United States, 2003. Arbovirus Diseases Branch, DVBID, NCID, CDC. Disponible en: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5313a1.htm>. Accessed April 2004.
- Blajchman MA, Ali A, Lyn P, Bardossy L, Richardson H. Bacterial surveillance of platelet concentrates: Quantitation of bacterial load. *Transfusion* 1997;37(Suppl):74.
- Claeys H, Logghe F, Vandekerchove B, et al. Four-year experience with routine bacterial screening of platelet concentrates. VIII European Congress: International Society of Blood Transfusion 2003;56.
- Beckers EAM, teBoekhorst PAW, Vermeij H, vanRhenen DJ. Limitations of routine bacterial screening of platelets with the BACTALERT system. *Vox Sang* 2004.
- Bowden RA, Slichter SJ, Sayers MH, Mori M, Cays MJ, Meyers JD. Use of leukocyte-depleted platelets and cytomegalovirus seronegative red cells for prevention of primary cytomegalovirus infection after marrow transplant. *Blood* 1991;79:246-50.
- Visconti MR, Pennington J, Garner SF, Allain JP, Williamson LM. Assessment of removal of human cytomegalovirus from blood components by leukocyte depletion filters using real-time quantitative PCR. *Blood First Edition*. 2003;10:1182(Blood 2003;3:762).
- Pennington J, Taylor GP, Sutherland J, et al. Persistence of HTLV-I in blood components after leukocyte depletion. *Blood* 2002;100:677-81.
- Nichols WG, Price TH, Gooley T, Corey L, Boeckh M. Transfusion-transmitted cytomegalovirus infection after receipt of leukoreduced blood products. *Blood* 2003;101:4195-200.
- Akahoshi M, Takanashi M, Masuda M, et al. A case of transfusion-associated graft-versus-host disease not prevented by white cell-reduction filters. *Transfusion* 1992;32:169-72.
- Hayashi H, Nishiuchi T, Tamura H. Transfusion-associated graft-versus-host disease caused by leukocyte filtered stored blood. *Anesthesiology* 1993;79:1419-21.
- Pelszynski MM, Moroff G, Luban NLC, Taylor BJ, Quinones RR. Effect of gamma irradiation on T-cell inactivation as assessed by limiting dilution Analysis: Implications for Preventing transfusion associated graft vs. host disease. *Blood* 1994;83:1683.
- Corash L, Lin L. Novel processes for inactivation of leukocytes to prevent transfusion-associated graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplantation* 2004;33:1-7.
- Leitman SF, Tisdale JF, Bolan CD, et al. Transfusion-associated GVHD after fludarabine therapy in a patient with systemic lupus erythematosus. *Transfusion* 2003;43:1667-71.
- Grass JA, Hei DJ, Metchette K, et al. Inactivation of leukocytes in platelet concentrates by psoralen plus UVA. *Blood* 1998;91:2180-8.
- vanRhenen D, Gulliksson H, Cazenave JP, et al. Transfusion of pooled buffy coat platelet components prepared with photochemical pathogen inactivation treatment: The euroSPRITE trial. *Blood* 2003;101:2426-33.
- Chiu EKW, Yuen KY, Lie AKW, et al. A prospective study of symptomatic bacteremia following platelet transfusion and of its management. *Transfusion* 1994;34:950-4.
- Hanna H, Raad I. Blood Products: A significant risk factor for long-term catheter-related bloodstream infections in cancer patients. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 2001;22:165-6.
- Hermann M, Lai QI, Albrecht RM, Mosher DF, Proctor RA. Adhesion of *Staphylococcus aureus* to surface-bound platelets: Role of fibrinogen/fibrin and platelet integrins. *J Infect Dis* 1992;167:312-22.
- Rock GA, Shumak KH, Buskard NA. Comparison of plasma exchange with plasma infusion in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. Canadian Apheresis Study Group. *N Engl J Med* 1991;325:393-7.
- Dodd RY, Orton SL, Notari EP. Viral marker rates among blood donors before and after the terrorist attacks on the United States on September 11, 2001. *Transfusion* 2002;42:1240-1.
- Wollowitz S. Fundamentals of the psoralen-based Helinx technology for inactivation of infectious pathogens and leukocytes in platelets and plasma. *Seminars in Hematology* 2001;38(Suppl 11):4-11.
- Ciaravino V, McCullough T, Cimino G. The role of toxicology assessment in transfusion medicine. *Transfusion* 2003;43:1481-92.
- Ciaravino V, McCullough T, Cimino G, Sullivan T. Preclinical safety profile of plasma prepared using the INTERCEPT Blood System. *Vox Sanguinis* 2003;85:171-82.
- Ciaravino V, McCullough T, Sullivan T, Bebee L. 26-week IV oncogenicity study with S-59 photochemically treated (PCT) 35% plasma [before and after illumination with and without S-59 reduction device (SRD) treatment] in C57BL/6T-KOp53 N5(+/-) mice. *The Toxicologist* 2001;60(Suppl 1):279.
- Ciaravino V, Sullivan T, McCullough T. The Absence of Reproductive Toxicity Demonstrated by the INTERCEPT Blood System for Platelets. *Transfusion* 2003;43(9S):84A-5A.
- Ciaravino V, McCullough T, Dayan AD. Pharmacokinetic and toxicology assessment of INTERCEPT (S-59 AND UVA treated) platelets. *Human and Experimental Toxicology* 2001;20:533-50.

34. Pereira A. Methylene-blue-photoactivated plasma and its contribution to blood safety. *Transfusion* 2004;44:948-50.
35. McCullough J, Vesole DH, Benjamin RJ, et al. Therapeutic efficacy and safety of platelets treated with a photochemical process for pathogen inactivation: the SPRINT trial. *Blood First Edition*. 2004(DOI 10.1182/blood-2003-12-4443).
36. Kluter H, Chapuis B, Cazenave JP, et al. Apheresis platelets treated with the INTERCEPT blood system for pathogen inactivation provide platelet count increments and hemostasis comparable to conventional platelets. *Vox Sanguinis* 2002;83(Suppl 2):110.
37. Pillonel J, Laperche S, Saura C, Desenclos JC, Courouze AM. Trends in residual risk of transfusion-transmitted viral infections in France between 1992 and 2000. *Transfusion* 2002;42:980-8.
38. Jackson BR, Busch MP, Stramer SL, AuBuchon JP. The cost-effectiveness of NAT for HIV, HCV, and HBV in whole-blood donations. *Transfusion* 2003;43:721-9.
39. Janetzko K, Lin L, Eichler H, Mayaudon V, Flament J, Kluter H. Implementation of the INTERCEPT Blood System for Platelets into routine blood bank manufacturing procedures: evaluation of apheresis platelets. *Vox Sang* 2004;86:239-45.
40. Heddle NM, Blajchman MA, Meyer RM, et al. A randomized controlled trial comparing the frequency of acute reactions to plasma-removed platelets and pre-storage WBC-reduced platelets. *Transfusion* 2002;42:556-66.
41. TRAP Study Group. Leukocyte reduction and ultraviolet B irradiation of platelets to prevent alloimmunization and refractoriness to platelet transfusions. *N Engl J Med* 1997;337:1861-9.
42. Grass JA, Wafa T, Reames A, et al. Prevention of transfusion-associated graft-versus-host disease by photochemical treatment. *Blood* 1999;93:3140-7.
43. Lin L, Cook DN, Wiesehahn GP, et al. Photochemical inactivation of viruses and bacteria in platelet concentrates by use of a novel psoralen and long-wavelength ultraviolet light. *Transfusion* 1997;37:423-35.
44. Knutson F, Alfonso R, Dupuis K, et al. Photochemical inactivation of bacteria and HIV in buffy-coat-derived platelet concentrates under conditions that preserve in vitro platelet function. *Vox Sanguinis* 2000;78:209-16.
45. Van Voorhis WC, Barrett LK, Eastman RT, Alfonso R, Dupuis K. *Trypanosoma cruzi* inactivation in human platelet concentrates and plasma by psoralen (amotosalen HCl) and long-wavelength UV. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2003;47:475-9.
46. Dupuis KW, Bernard KA, Jones S. West Nile Virus is Inactivated by Helix(r) Technology in Human Platelet Concentrates. *Transfusion* 2003;43(9S):82A.
47. Dupuis K, Sampson-Johannes A, Corash L. The INTERCEPT Blood System for Platelets Inactivates the Causative Agent of SARS. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 2003;30(Sonderheft 1):34.
48. Fiebig E, Hirschhorn D, Busch M, Grass J, Lin L, Corash L. Loss of inducible CD69 expression on donor T cells(CD3CD69) in platelet concentrates(PCs) by storage, irradiation, and photochemical treatment. *Transfusion* 1997;37(Suppl):92.
49. Hei DJ, Grass J, Lin L, Corash L, Cimino G. Elimination of cytokine production in stored platelet concentrate aliquots by photochemical treatment with psoralen plus ultraviolet A light. *Transfusion* 1999;39:239-48.
50. López-Plaza I, Snyder E, Goodnough LT, et al. INTERCEPT Platelet Transfusions Are Associated with Fewer Transfusion Reactions than Conventional Platelet Transfusions Prepared by Apheresis with Process Leukoreduction. *Transfusion* 2003;43(9S):84A.
51. Seifried E, Roth WK. Prospective survey of HCV, HBV, HIV-1 NAT screening of more than 10 million blood donors in the Red Cross Blood Service centers of Germany. *Transfusion Clinique et Biologique* 2001;8(Suppl 1):17.
52. Velati C, Romano L, Baruffi L, Pappalettera M, Carreri V, Zanetti AR. Residual risk of transfusion-transmitted HCV and HIV infections by antibody-screened blood in Italy. *Transfusion* 2002;42:966-72.
53. Alvarez M, Oyonarte S, Rodríguez PM, Hernandez JM. Estimated risk of transfusion-transmitted viral infections in Spain. *Transfusion* 2002;42:994-8.
54. Barbara J. Why "safer than ever" may not be safe enough. *Transfus Med Hemother* 2004;31(Suppl 1):2-10.

THE CASE AGAINST PATHOGEN INACTIVATION IN TRANSFUSION

J.P. ALLAIN

Department of Haematology, University of Cambridge

In the late 80s-early 90s, considerable emphasis was put on improving blood safety as a consequence of the HIV crisis. Among the many approaches, two competed: nucleic acid testing (NAT) by amplification methods and viral (pathogen) inactivation (PI). In 2004, NAT for HCV RNA is implemented in North

America, the European Union, Japan and Australasia. Solvent detergent (SD) or heat treatment is applied to all plasma derivatives. Some fresh frozen plasma (FFP) is SD treated or methylene blue treated and some platelet concentrates (PC) are treated with Amotosalen S59; the only PI agent in clinical use.

The current methods of PI (S59, S303, Inactine, riboflavin) have in common to inactivate infectious agents by forming stable bonds on nucleic acids, preventing replication. The activity of these compounds therefore includes a broad spectrum of potential causes of transfusion-related side effects or risks. They range from viruses, to bacteria, parasites, nucleated cells causing not only infections but also immunological side effects such as graft versus host disease (GVHD) or microchimerism. This apparently universal solution to eliminate transfusion risk and allowing to approach the optimal "zero risk", however, has a number of intrinsic potential problems and is redundant with a number of safety measures of a different nature implemented over the years to limit some particular side effects covered by PI compounds.

1. The inherent problems are that none of the proposed compounds is applicable to whole blood from which safe components can be produced. S59 is applicable only to FFP and platelets, SD and Methylene blue only to FFP, S303 and Inactine only to Red cell concentrates (RCC). Ensuring the safety of all components would require at least two products and three procedures, each of them at high cost. At the price proposed for Amotosalen applied to PC, PI-treated components derived from a unit of blood would more than double the current price ranging between € 150 and 250.

2. There remain some problems regarding the efficacy of PI with some infectious agents depending on the concentration and the accessibility of targets' nucleic acids. For viruses, human erythroviruses such as parvovirus B19 are not only in concentration as high as 10E14 during the window period but also presents a very tight capsid difficult to penetrate by Amotosalen for instance. Some bacteria are forming spores that are more difficult to penetrate. Most parasites, particularly plasmodia are present in the human host in various forms, probably differently accessible, and only parasites obtained in culture have been inactivated experimentally. Data convincingly providing evidence that these various caveats can be lifted needs to be generated.

3. PI treatment affects blood cells sufficiently to raise questions about the applicability of the procedure to clinical products. Amotosalen-treated platelets either from buffy coat or apheresis have a recovery approximately 20% lower than untreated products, although this does not affect significantly platelet half-life or clinical efficacy^{1,2}. However, since monitoring of treated patients is often based on platelet count, the number of units transfused and

the cost of treatment might be affected. During the phase II clinical trials of RCC treated with either S303 or Inactine, the interaction of the compound with the red cell surface proteins elicited rare cases of antibodies to neo-antigens that led to the interruption of the development programmes of both products.

4. Although riboflavin and methylene blue have been used clinically for long periods of time and are considered innocuous, Amotosalen, S303 and Inactine are considered toxic and having potential genotoxicity. This is why devices have been introduced to remove these compounds after the inactivation step. RCC extensive washing is used to remove Inactine and affinity absorption to deplete S59 and S303³. Despite these removals, traces of the compounds remains in the clinical products and long term toxicity is still considered by some an issue, particularly in patients receiving multiple transfusion of PI-treated products.

A number of procedures have been implemented or developed that address a series of transfusion side effects that are targeted by PI procedures. The risk of infection with HCV and HIV has been virtually eliminated by NAT and new triplex NAT adding HBV DNA to the other two viral genomes' detection are currently assessed and will soon be available in fully automated systems^{4,5}. Leucodepletion is fully implemented in several countries to limit the risk either of vCJD as in the UK or alloimmunisation and infection with intra-cellular viruses as in France, the USA and the Netherlands. There is evidence however that leucodepletion is mostly, but not completely, effective to prevent CMV and HTLV-I infections post-transfusion^{6,7}. PI has the capacity of inactivating viruses that are not currently considered for blood screening, are emerging, or still unknown. Epstein Barr virus and parvovirus B19 are among the first group, TT virus, SEN virus and GBV-C virus are in the second^{5,8}. There is evidence that PI indeed inactivates these viruses but, at least for the three emerging viruses, there is no evidence that they meet the criteria of low prevalence and pathogenicity that are required to justify blood screening, although, they are clearly transmissible by transfusion. Unknown viruses will be likely inactivated by PI but, as the newly discovered viruses, they are likely to be little or not pathogenic.

Bacterial contamination of blood components has been a major subject of concern over the past few years and various methods have been proposed to prevent the transfusion of contaminated blood components. Culture of aerobic and, in some cases, anaerobic bacteria have been implemented in some countries and systems such as Bactalert seems to be rapidly progressing in the blood banking industry. The long delay of up to 48 hours post-collection to obtain a result is an issue that various genomic amplification-based methods of bacterial detection attempted to address. However, none of these methods is currently satisfactory or in routine use.

The prevention of transfusion-related malaria transmission is currently addressed in most developed countries where rare cases of malarial transmission have been described⁹. It relies essentially on a questionnaire asking candidate donors to indicate their country of origin and recent travels. If the answers include a country where malaria is endemic, donors are deferred. This approach is overall effective but presents the considerable disadvantage of deferring a relatively large number of donors whose blood is perfectly safe and who are unlikely to return as donors when their exclusion time is past. NAT and antibody to plasmodium have been proposed and occasionally implemented to address this issue but their cost effectiveness is questionable. Similarly, questions for deferring donors who have lived or traveled to endemic areas for trypanosoma *Cruzi* are asked and donors from Latin America are excluded¹⁰. Antibody screening already implemented in endemic areas are considered for donor screening in non-endemic areas.

GVHD caused by transfusion is a severe although rare complication of transfusion to immunodeficient recipients such as bone marrow or stem cells or organ transplantation patients. Blood products intended for these patients are currently gamma irradiated to inactivate the proliferation of lymphocytes.

The list of potential methods to prevent most remaining side effects of transfusion is long and few of them appear fully effective. Their cumulated cost has not been systematically considered for comparison with predicted PI costs. The bearing of such multiplicity of procedures on blood banking operations and on the potential for errors they may generate has not been fully addressed. Only a direct comparison of cost versus efficacy between PI and other methods intended to limit or eliminate the same risks attached to transfusion can provide the needed evidence to make a rational choice between the various options.

References

1. Van Rhenen D, Gulliksson H, Cazenave JP, et al. Transfusion of pooled buffy coat platelet components prepared with photochemical pathogen inactivation treatment: The euroSPRITE trial. *Blood* 2003;101:2426-33.
2. McCullough J, Coutre S, Vesole DH, et al. Therapeutic Efficacy and Safety of Platelets Treated with a Photochemical Process for Pathogen Inactivation: The SPRINT Trial. *Blood* In press, 2004.
3. Chapman JR, Moore K, Butterworth BE. Pathogen inactivation of RBCs: PEN110 reproductive toxicology studies. *Transfusion* 2003;43:1386-93.
4. Allain JP. Genomic screening for blood-borne viruses in transfusion settings. *Clin Lab Haematol* 2000;22:1-10.
5. Allain JP, Thomas I, Sauleda S. Nucleic acid testing for emerging viral infections. *Transfusion Medicine* 2002;12:275-83.
6. Pennington J, Taylor GP, Sutherland J, Davis RE, Seghatchian J, Allain JP, et al. Persistence of HTLV-I in blood components after leucocyte depletion. *Blood* 2002;100:677-81.
7. Kleinman S, Chan P, Robillard P. Risks associated with transfusion of cellular blood components in Canada. *Transfus Med Rev* 2003;17:120-62.
8. Jordan J, Tiangco B, Kiss J, et al. Human parvovirus B19: prevalence of viral DNA in volunteer blood donors and clinical outcomes of transfusion recipients. *Vox Sang* 1998;75:97-102.
9. Mungai M, Tegmeier G, Chamberland M, et al. Transfusion-transmitted malaria in the United States from 1963-1999. *N Engl J Med* 2001;344:1973-8.
10. Leiby DA, Read EJ, Lenes BA, et al. Seroepidemiology of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas' disease, in US blood donors. *J Infect Dis* 1997;176:1047-52.