

CLUB ESPAÑOL DE CITOLOGÍA HEMATOLÓGICA: LA CÉLULA NK

COORDINADORAS: T. MOLERO. *Hospital de Gran Canaria Doctor Negrín,
Las Palmas de Gran Canaria*

G. RAMÍREZ. *Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Málaga*

Resumen del simposio

La célula *natural killer* (NK) es una célula hematopoyética con morfología de linfocito de gran tamaño y citoplasma pálido abundante conteniendo gránulos azurófilos citoplasmáticos (linfocito grande granular). Estas células suponen un 10-15% de las células mononucleadas en una sangre periférica normal.

Su función e inmunofenotipo son similares a las del linfocito grande granular (LGG)-T pero a diferencia de éste, la célula NK carece de la expresión de CD3 de superficie y del gen receptor de células T (TCR) tanto en la célula normal como en los patrones patológicos. El marcador característico es el CD56 aunque este antígeno lo pueden expresar también las células mielomatosas; células dendríticas; algunos LGG-T; los blastos de ciertas leucemias mieloblásticas agudas y otras células extrahematopoyéticas.

Ontogénicamente la célula NK procede de un progenitor CD34+ de la médula ósea, a partir del cual se diferenciará la célula NK, el linfocito T y la célula dendrítica. Se supone también un origen tímico siendo el complejo IL-7 fundamental para su desarrollo

Los precursores más inmaduros expresan el antígeno CD161 e irán adquiriendo secuencialmente los CD56, CD16 y CD94. Ocurren cambios fenotípicos durante los procesos de activación aguda (aumento de expresión de HLA-DR, CD38, CD11a y CD45RO) y crónica (aumento de la expresión de CD57 y CD2 junto con la disminución de CD7, CD11b, CD11c, CD38, CD45RO y HLA-DR).

La función de los linfocitos NK es matar las células diana. Proliferan de forma controlada para destruir las células infectadas por virus o las células tumorales. La proliferación autónoma refleja la patología tumoral.

El mecanismo de acción asesina se realiza mediante fenómenos de apoptosis activados por la vía fas o por exostosis (mediando las granzimas y perforinas contenidas en sus gránulos citoplasmáticos).

La morfología de la célula NK tumoral es variable, las células más inmaduras muestran una apariencia blástica (parecida al linfoblasto L2) con cromatina hiperromática o vesicular sin gránulos azurófilos prominentes citoplasmáticos. Las más maduras son de diferentes tamaños y contienen gránulos citolíticos en su citoplasma TIA-1 positivos.

En las proliferaciones malignas de la célula NK son características las lesiones histológicas angiodestructivas así como los focos de necrosis y apoptosis. En la médula ósea puede haber hemofagocitosis. El infiltrado cutáneo característico está limitado a la dermis pudiendo extenderse a la grasa subcutánea sin epidermotropismo.

Las neoplasias NK aparecen con más frecuencia en el continente asiático (China y Japón) en México y América del Sur. Se postula que en su patogenia intervienen factores genéticos y ambientales como el virus de Epstein-Barr (VEB) (integración clonal del virus en la célula neoplásica).

La demostración de malignidad es difícil ya que carece de una marca genética propia. En nuestro medio la escasa incidencia del VEB hace difícil la confirmación de la clonalidad del proceso que queda restringido a patrones de expresión génica asociados a la inactivación del cromosoma X en mujeres y sobre células purificadas. Se ha postulado la expresión de un fenotipo aberrante CD56-/+ débil como marcador de clonalidad en los procesos neoplásicos de célula NK. La anomalía cromosómica más característica, aunque de infrecuente aparición, es la pérdida de ADN del cromosoma 6q.

La patología tumoral NK es de muy rara presentación lo que complica aún más el diagnóstico que frecuentemente se realiza por exclusión de otros procesos tumorales de linfocitos T o B o de patología mieloblástica.

La presentación clínica, morfológica e inmunofenotípica es heterogénea. Siguiendo la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) las neoplasias NK se clasifican en tres categorías: linfoma blástico NK; leucemia agresiva NK y linfoma extranodal NK/T. Las formas indolentes se conocen como linfocitosis crónicas de células NK.

Los procesos malignos originados por la célula NK muestran cierta predilección por territorios extranodales, afectando principalmente a la zona nasal (linfoma nasal NK y tipo nasal), piel, tracto gastrointestinal, vías respiratorias altas y testículos.

El diagnóstico diferencial de la patología de precursores NK se debe hacer principalmente con la leucemia de células dendríticas plasmacitoide CD4+/CD56+; con la patología tumoral T que expresa CD56 y con la leucemia aguda mieloblástica CD56+ aunque algunos autores rechazan la existencia de esta última entidad.

La mayoría de los pacientes afectados de proliferación crónica NK se encuentran asintomáticos por lo que está indicada la política de "esperar y ver". Si aparece un síndrome constitucional o sintomatología secundaria a citopenias se puede comenzar un tratamiento. La prednisolona ha demostrado eficacia si coexiste una vasculitis asociada, y fármacos inmunosupresores (ciclofosfamida o ciclosporina A) en el caso de presentar clínica derivada de citopenias. Las formas localizadas pueden remitir temporalmente con radioterapia, combinada o no con quimioterapia.

El curso de las leucemias y linfomas agresivos NK es fatal y la mayoría de regímenes de quimioterapia aplicados han fracasado debido en parte a la hiperexpresión de las células neoplásicas del gen de resistencia a fármacos. Los protocolos que incluyen antraciclínicos parecen ser más efectivos en el tratamiento de estos procesos. La consolidación con quimioterapia a altas dosis seguida de trasplante de progenitores hematopoyéticos puede ser una opción terapéutica. El trasplante no mieloblástico y la terapia con el anticuerpo monoclonal anti-VEB abren una nueva vía en el intento de conseguir remisión este tipo de tumores.

A lo largo de este simposio se desarrollarán los puntos anteriormente referidos con la intención de alcanzar un conocimiento actualizado de la célula NK desde el punto de vista morfológico, ontogénico e inmunofenotípico, así como una aproximación a la clínica que produce su expansión y las actuales pautas de tratamiento.

HUMAN NK CELL RECEPTORS AND THEIR EXPRESSION DURING ONTOGENY

M. LÓPEZ-BOTET

Molecular Immunopathology Unit. DCEXS. Universitat Pompeu Fabra. Barcelona.

Human NK cells are defined as CD3⁻ CD56⁺ lymphocytes capable of mediating cell-mediated cytotoxicity and production of proinflammatory cytokines (i.e. IFN γ , TNF- α). NK cells are involved in the early innate immune response against microbial pathogens and may react as well against tumours and normal allogeneic/xenogeneic cells. A number of functionally different NK cell subsets can be defined according to the expression of surface molecules¹.

It is well established that NK cell activity is repressed upon specific recognition of MHC class I molecules by different inhibitory receptors that belong to the Immunoglobulin or C-type lectin superfamilies, and are shared by some T lymphocyte subsets. Killer immunoglobulin-like receptors (KIR) constitute a gene family located in human chromosome 19q13.4². Different KIR haplotypes that include only partially overlapping sets of genes have been identified, thus determining a remarkable degree of immunogenetic variability. A group of KIRs (i.e. KIR2DL and KIR3DL) display cytoplasmic Immunoreceptor Tyrosine-based inhibition motifs (ITIM) which upon phosphorylation become docking sites for the SHP-1 protein tyrosine phosphatase involved in the inhibitory signalling. Other KIR proteins bear shorter intracytoplasmic domains lacking ITIMs (i.e. KIR2DS/3DS) and contain a charged transmembrane residue (Lys) interacting with DAP12, an Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif (ITAM)-bearing adapter that connects these receptors to protein tyrosine kinase (PTK) activation pathways. Some inhibitory KIR discriminate groups of classical HLA class I allotypes (HLA-C, HLA-B or HLA-A) that share structural features at the α 1 domain. On the other hand, a number of triggering KIR have been shown to interact as well with HLA class I molecules, though with an affinity lower than their corresponding inhibitory counterparts; the ligands for other KIR have not yet been defined. KIR genes are not found in mice and their biological role is undertaken by members of the Ly49 family of C-type lectins, that includes as well inhibitory and activating molecules coupled to signaling pathways, similarly to KIR.

The Ig-like transcript (ILT) or leukocyte Ig-like receptor (LIR) gene family, that flanks the KIR loci at chromosome 19p13.4, encode for surface molecules (CD85) that are preferentially expressed by cells of the myelomonocytic lineage³. Some ILT (LIR, CD85) molecules contain cytoplasmic ITIM that recruit tyrosine phosphatases (i.e. SHP-1), whereas others display a charged transmembrane residue (Arg) and associate to the Fc ϵ R γ chain. Among the first group,

ILT2 (LIR-1) and ILT4 (LIR-2) interact with a broad spectrum of class I molecules³; moreover, ILT2 (CD85j) binds with higher affinity to the UL18 HCMV glycoprotein. ILT2 (CD85j) is detected on subsets of NK cells, T lymphocytes, B cells, and monocytes/macrophages, whereas ILT4 is selectively expressed by the latter. The nature of the ligands for other members of the ILT/LIR family and their murine homologues (PIR) remains unknown.

CD94 and NKG2 are lectin-like type II integral membrane glycoproteins that are encoded together with other members of the C-type lectin superfamily at the NK gene complex (NKC) in human chromosome 12 and mouse chromosome 6. The CD94/ NKG2A heterodimer constitutes an inhibitory receptor that recruits SHP-1 through the ITIM-bearing NKG2A subunit, whereas CD94/NKG2C forms a triggering receptor linked to DAP12. HLA-E is the specific ligand for both CD94/NKG2A and CD94/ NKG2C receptors⁴. This oligomorphous class Ib molecule presents peptides derived from the signal sequences of some HLA class I allotypes, by a process requiring functional TAP and tapasin. Thus, detection of HLA-E by the CD94/NKG2A receptors represents a sensor mechanism that broadly probes the status of HLA class I biosynthesis. Recently, an HSP60-derived peptide was shown to potentially compete with endogenous class I-derived nonamers for binding to HLA-E in transfectants. The corresponding MHC/peptide complex was not recognized by CD94/NKG2A, rendering cells subject to stress conditions vulnerable to an NK-mediated attack. Further studies are required to determine whether this mechanism represents a general feature of immune surveillance against virus-infected and tumor cells. CD94 and NKG2 orthologues have been identified in rodents; the murine CD94/NKG2 receptors interact with the Qa-1b class Ib molecule that constitutes the functional homologue of HLA-E.

The spectra of class Ia HLA molecules covered by inhibitory KIR and, indirectly, by CD94/NKG2A are only partially overlapping and, therefore, both receptor systems complement each other to monitor the surface expression of most class I molecules. Other inhibitory receptors in the control of NK cell function have been identified but their physiological relevance remains uncertain. It is of note that a number of NK cell subsets express different combinations of NKR, thus allowing the system to efficiently react against variable alterations of MHC class I expression. Though acquisition of NKR specific for HLA-class I molecules appears to be a stochastic process that occurs during development, there is evidence that interaction with their ligands may contribute to shape the NKR repertoire⁵. A precise analysis of NKR becomes important for the application of immunotherapy protocols combined with allogeneic stem cell transplantation to treat myeloid leukaemia patients⁶.

Similarly to the well-characterized low-affinity receptor for IgG (Fc γ R-III or CD16) responsible for an-

tibody-dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC), a number of NK-associated triggering receptors belonging to the IgSF have been shown to be connected to PTK signaling pathways through ITAM-bearing adapters⁷. Among them, NKp46 is a natural cytotoxicity receptor (NCR) specifically expressed by NK cells that is coupled to the ζ or γ adapters, activating NK cytotoxicity and cytokine production upon recognition of still undefined cellular ligand(s). Data supporting that NKp46 may specifically recognize some viral antigens (i.e. influenza hemagglutinins) have been reported. The nature of the molecules recognized by the DAP12-associated NKp44 and the ζ -linked NKp30 NCR also remains unknown. NCR ligands may be constitutively expressed by different cell types, and it is believed that these triggering receptors operate when class I molecule expression is down-regulated in tumor and infected cells reducing the control by their specific inhibitory receptors.

NKG2D is a lectin-like receptor conserved in human and rodents that is encoded within the NKC and is expressed by NK cells, T lymphocytes and macrophages⁸. NKG2D alternatively interacts with two different adapters, i.e. DAP12 or DAP10, which respectively couple it to either PTK or PI3-K signalling pathways. In fact, NKG2D has been reported to function in different cell types either as a triggering receptor or, alternatively, as a co-stimulatory molecule that enhances activation in conjunction with other PTK-linked receptors (i.e. CD3/TcR). Human and murine NKG2D receptors promiscuously interact with a variety of stress-inducible class I-related molecules, also detected in transformed and virus-infected cells. Five different ligands have been defined for human NKG2D, including the polymorphic MICA/B molecules and a family of class I-related proteins termed "UL16 binding proteins" (ULBP). Similarly, mouse NKG2D recognizes different stress-inducible molecules, including members of the retinoic acid early inducible-1 (RAE-1) family and H60. The existence of viral escape mechanisms that specifically interfere with the expression of NKG2D ligands indirectly underlines the importance of this receptor in the response against virus-infected cells.

Most families of leukocyte inhibitory receptors include members with an activating function (i.e. KIR2DS and CD94/NKG2C) whose physiological role remains largely undefined. It has been hypothesized that these receptors trigger cytotoxicity and cytokine production when the dominant control by inhibitory receptors falls beneath a critical threshold. As the affinity of stimulatory NKR for class I molecules appears generally lower than that of their inhibitory counterparts, either a preferential down-modulation of the inhibitory ligand and/or an increase of the activating NKR avidity should occur. Remarkably, recent reports support that at least some activating NKR may directly interact with microbial products⁹. In this regard, *Cmv-1* was originally defined as an inherited trait determinant of the variable susceptibility to murine

CMV (MCMV) infection, and was subsequently identified as the Ly49H gene. This member of the lectin-like Ly49 family associates to DAP12 and plays a pivotal role in the defence against MCMV infected cells, triggering NK cell functions upon its interaction with the m157 viral protein. This has prompted the search for virus-derived molecules that may constitute ligands for other "orphan" activating molecules.

A number of studies have addressed the NK cell differentiation/maturation events which take place mainly in the bone marrow during adult life¹⁰. There is evidence that the NK cell lineage originates from committed lymphoid precursors; yet, the picture of the process that leads to the generation of NK cell precursors (NKP) is still incomplete. Human CD34+ cells may differentiate to NKP either upon interaction with stromal cells or in the presence of a cytokine combination including stem cell factor (SCF), FMS-like tyrosine kinase 3 ligand (FLT3L) and IL-7. Transcription factors crucial for hematopoietic differentiation (i.e. PU.1) and lymphopoiesis (Ikaros) are required for NK cell development. NOTCH1 and PAX1 are key regulators for the development of the T and B cell lineages, respectively, whereas an equivalent "switch" for NK cells has not been yet identified. Yet, it has been proposed that some inhibitors of the basic helix-loop-helix (bHLH) family of DNA-binding proteins, that regulate lymphoid development, might have a key role in commitment to the NK cell lineage by diverting T and B cell differentiation. NKP express the IL-2R β chain and differentiate in vitro to NK cells in response to IL-15 or IL-2; IL-15 appears essential for NK cell maturation. The γ chain of the IL-15R, shared by other cytokine receptors, is critical for both NK and T cell differentiation, as illustrated by the phenotype of patients with mutations in the corresponding gene that suffer a severe combined immunodeficiency.

Maturation of NK cells leads to the sequential expression the surface molecules/receptors described above and to the development of effector functions (i.e. cytotoxicity and cytokine production). At the earliest stages, human immature NK cells express NKR-P1 (CD161), a lectin-like molecule of unknown function. Subsequently, CD56 and CD94/NKG2 are displayed, followed at later stages by CD16, NCR and KIR. Immature NK cells mediate cytolytic activity involving TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) whereas perforin- and CD95L-dependent cytotoxicity are only developed upon maturation.

Two major NK cell subsets have been conventionally defined according to the expression intensity of CD56. The CD56 high (CD56hi) subset constitutes a minority of peripheral blood NK cells expressing CD94/NKG2A, which display low cytolytic activity but actively produce cytokines. The CD56hi subset is believed to represent a less differentiated stage than CD56low (CD56lo) and account for the majority of NK cells found in the decidua in close contact with the extravillous cytotrophoblast during pregnancy.

CD56hi cells express L-selectin and CCR7 which promote their homing to lymph nodes; by contrast, the CD56lo subset responds to CXCL8 and fractalkine comparably to neutrophils.

The expanding knowledge on the molecular basis for NK cell differentiation and function is expected to provide clues to better understand their role in the innate response against pathogens, tumors and transplants, as well as in the immune maternal-foetal interaction. These concepts are essential to build up the rationale for eventual immunotherapeutic applications.

References

1. Moretta A, Bottino C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L. What is a natural killer cell? *Nat Immunol* 2002;3:6-8.
2. Vilches C, Parham P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 2002;20:217-51.
3. Colonna M, Nakajima H, Navarro F, López-Botet M. A novel family of Ig-like receptors for HLA class I molecules that modulate function of lymphoid and myeloid cells. *J Leukoc Biol* 1999;66:375-81.
4. López-Botet M, Bellón T. Natural killer cell activation and inhibition by receptors for MHC class I. *Curr Opin Immunol* 1999;11:301-7.
5. Raulat DH, Vance RE, McMahon CW. Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu Rev Immunol* 2001;19:291-330.
6. Velardi A, Ruggeri L, Alessandro, Moretta, Moretta L. NK cells: a lesson from mismatched hematopoietic transplantation. *Trends Immunol* 2002;23:438-44.
7. Moretta L, Biassoni R, Bottino C, Mingari MC, Moretta A. Human NK-cell receptors. *Immunol Today* 2000;21:420-2.
8. Cerwenka A, Lanier LL. Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat Rev Immunol* 2001;1:41-9.
9. Arase H, Lanier LL. Virus-driven evolution of natural killer cell receptors. *Microbes Infect* 2002;4:1505-12.
10. Colucci F, Caligiuri MA, Di Santo JP. What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol* 2003;3:413-25.

DIAGNÓSTICO BIOLÓGICO: INMUNOFENOTIPO DE LAS CÉLULAS NK

M. LIMA¹, J. ALMEIDA^{2,3}, P. BARCENA^{2,3}, A. GARCÍA MONTERO³, M.L. QUEIRÓS¹, A. HELENA SANTOS¹, M. DEL CARMEN ALGUERÓ², I. ABUIN⁴, M. FUERTES⁵, BERMEJO⁶, P. FISAC⁷, N. DE LAS HERAS⁵, P. MAYAYO⁸, F. RUIZ-CABELLO⁹, M. GIRALT⁸, J. SAN MIGUEL^{3,10} Y A. ORFÃO^{2,3}

¹Unidad de Citometría, Hospital Geral de Santo António, Oporto, Portugal; ²Servicio de Citometría y Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca. Salamanca; ³Centro de Investigación del Cáncer, Salamanca; ⁴Servicio de Hematología. HCU Santiago de Compostela. ⁵Servicio de Hematología. Hospital Virgen Blanca de León. ⁶Servicio de Hematología. Hospital Virgen de Altgracia. Ciudad Real. ⁷Servicio de Hematología. Hospital General de Segovia. ⁸Servicio de Hematología. Hospital Miguel Servet. Zaragoza. ⁹Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Virgen de las Nieves. Granada. ¹⁰Servicio de Hematología. Hospital Universitario de Salamanca.

Resumen

En la última década se han alcanzado importantes avances en el estudio de la biología de las células

natural killer (NK), que han llevado a *a*) una mejor comprensión de su función en la respuesta inmune en la que participan una gran variedad de receptores implicados en su función citotóxica, y *b*) conocerse que ésta depende de un fino equilibrio entre señales activadoras e inhibitoras mediadas por estos receptores. Pese a los notables avances en el conocimiento de la biología de las células NK, esto no se ha traducido de forma directa en una mejor comprensión de las neoplasias de células NK, tanto desde el punto de vista diagnóstico, como en relación a la clasificación de las mismas, debido en gran parte a la carencia de marcadores de clonalidad y a la heterogeneidad existente dentro de estos cuadros. En el presente trabajo se revisan brevemente los aspectos más relevantes de la ontogenia de las células NK, el fenotipo de las células NK normales y sus subpoblaciones, tanto en situación basal como en situaciones de activación aguda o crónica, para describir finalmente las características inmunofenotípicas de las neoplasias de células NK identificadas hasta la fecha.

Introducción

Las células NK son células hematopoyéticas con aspecto de linfocito grande granular (LGL) que representan aproximadamente el 10-15% de todos los linfocitos circulantes en sangre y del bazo¹. *In vivo*, las células NK se originan a partir de un precursor hematopoyético CD34+ de médula ósea, posiblemente con capacidad de diferenciación multilineal a linfocito T, célula NK y célula dendrítica^{2,3}. Además, pueden generarse también células NK *in vitro*, a partir de precursores tímicos y de hígado fetal⁴⁻⁶. Desde el punto de vista funcional, las células NK muestran: *a*) mecanismos efectores de la respuesta inmune característicos de respuestas citolíticas mediadas por anticuerpos y antígenos de histocompatibilidad (HLA), entre otras moléculas y, *b*) funciones inmunorreguladoras mediadas por citocinas^{1,7-9}.

Hasta la fecha, se han identificado varios tipos de enfermedad linfoproliferativa de células NK (SLP-NK). En general, los SLP-NK presentan un espectro clínico variable que incluye desde formas indolentes a neoplasias agresivas que, independientemente de las medidas terapéuticas adoptadas, conllevan una evolución fatal. Las formas clínicas más agresivas muestran una distribución geográfica característica, predominando en países asiáticos; además se asocian con infección por virus de Epstein-Barr (VEB) e infiltración extraganglionar acompañada por síndrome hemofagocítico¹⁰. Habitualmente estas neoplasias se distribuyen en dos grandes grupos de acuerdo con su patrón de infiltración¹¹: *a*) linfoma NK nasal y "tipo-nasal"¹²⁻¹⁶, y *b*) leucemia/linfoma agresivo NK¹⁷. Las formas indolentes se conocen como linfocitosis crónicas de células NK o SLPC de LGL-NK^{11,18}. El uso del término linfocitosis (y no leucemia) para designar a los SLPC de LGL-NK está directamente relacionado con la dificultad en: *a*) establecer el carác-

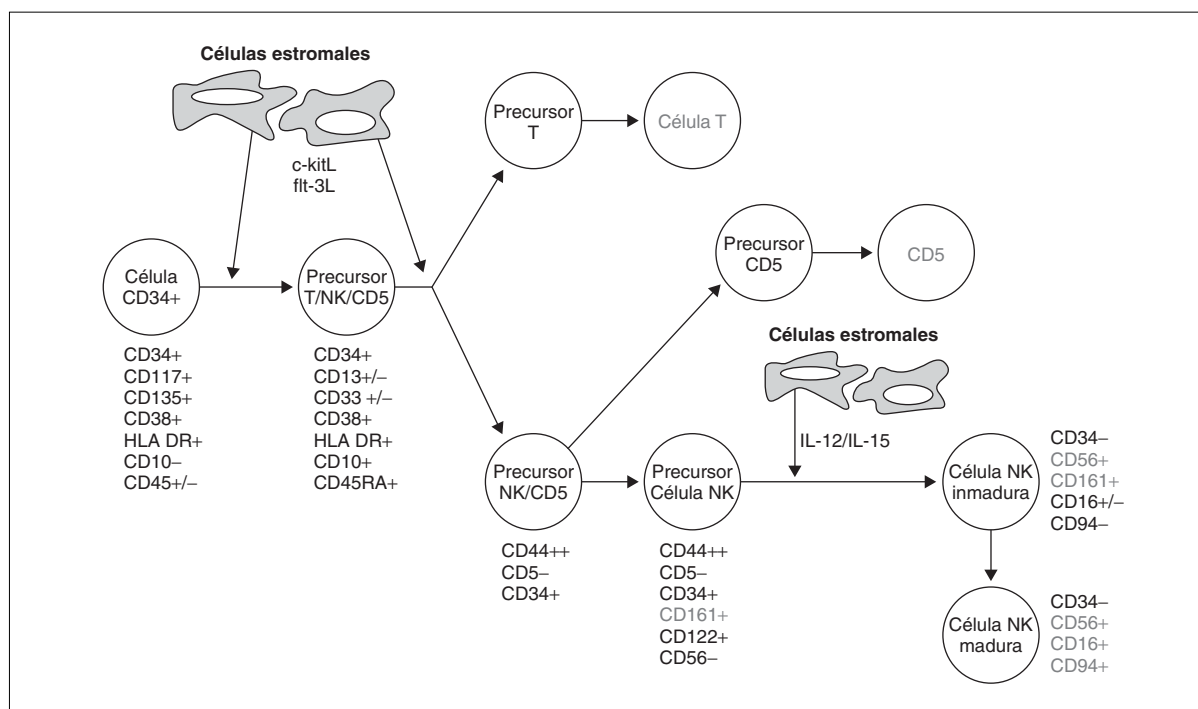


Figura 1. Modelo hipotético de diferenciación NK con los cambios fenotípicos que conllevaría. CD5: célula dendrítica.

ter (mono)clonal de estas expansiones NK, y *b*) hacer el diagnóstico diferencial con procesos reactivos asociados a diferentes enfermedades y situaciones patológicas^{19,20}.

En este trabajo revisaremos la ontogenia y el fenotipo de las células NK normales y activadas y las características fenotípicas más relevantes de las neoplasias de células NK.

Diferenciación de las células NK

En la actualidad los conocimientos sobre la diferenciación *in vivo* de las células NK, a partir de precursores hematopoyéticos CD34+, siguen siendo escasos. Aun así, se sabe que de forma similar a lo que ocurre con los linfocitos T y B, la maduración de células NK ocurre en dos etapas: *a*) diferenciación desde un precursor indiferenciado CD34+ comprometido a célula NK hasta la célula NK madura circulante, y *b*) activación tras el reconocimiento de células diana.

Hoy se cree que la célula NK se origina a partir de un precursor CD34+ común a células T, NK y célula dendrítica. Estudios secuenciales *in vitro* han sugerido un modelo hipotético de diferenciación NK a partir de este precursor CD34+^{3,21,22}. Así, los precursores NK más inmaduros expresarían el antígeno CD161. Posteriormente, en su diferenciación a célula NK madura, estos precursores adquirirían secuencialmente reactividad para CD56, CD16 y finalmente CD94. En la figura 1 se recogen de forma esquemática los rasgos fenotípicos más característicos de cada etapa de la diferenciación NK.

Fenotipo de las células NK normales

Las células NK maduras se definen fenotípicamente como linfocitos grandes granulares CD3-/TCR-/CD56+ y/o CD16+. Dentro de las células NK se han identificado dos subpoblaciones claramente diferentes por su fenotipo: células NK CD56+ débil y células NK CD56++²³⁻²⁵. Mientras que la primera subpoblación de células NK predomina en la sangre periférica, las células NK CD56++ son más abundantes en otros tejidos, incluida la placenta^{26,27}. Pese a las similitudes existentes entre ambas subpoblaciones de células NK, algunos autores²⁷ sugieren que éstas podrían originarse a partir de vías de diferenciación distintas. Desde el punto de vista fenotípico, se observan también diferencias entre ambas subpoblaciones que sugieren que las células NK CD56++ podrían corresponder a una subpoblación de células NK previamente activada (muestran una mayor expresión de las cadenas del receptor de la IL2 CD25 y CD122, de HLADR y CD45RO unida a menor reactividad para CD45RA) con mayor granularidad (mayor "sideward light scatter" o SSC), un patrón de reconocimiento de moléculas HLA distinto (las células NK CD56+ débil muestran menor reactividad para CD94 asociada a mayor expresión de CD158a y NKB1 que los linfocitos NK CD56++) y con requerimientos distintos para proliferar o desencadenar funciones citolíticas (las células NK CD56+ débil presentan menor expresión de CD7 y CD2 junto a una mayor reactividad para CD16, respecto a los linfocitos NK CD56++)²⁸. Además se observan importantes

diferencias en el patrón de expresión de moléculas de adhesión entre ambas poblaciones de células NK; estas diferencias podrían contribuir a explicar, al menos en parte, la diferente distribución tisular que presentan. En la tabla 1 se resumen las características fenotípicas de ambas poblaciones de células NK.

Algunos autores han descrito la existencia de una tercera subpoblación de células NK agranulares, escasamente representada en la sangre periférica de adultos con fenotipo CD56-/CD16+²⁹. Su mayor frecuencia en la circulación sanguínea en las primeras etapas de la vida, apoyaría la noción de que esta subpoblación podría corresponder a células NK más inmaduras y/o funcionalmente distintas²⁹.

Fenotipos asociados a activación de las células NK

Desde hace tiempo se conoce que tras su activación *in vitro*, las células NK muestran importantes modificaciones fenotípicas²³⁻²⁵. En los últimos años se han producido además, importantes avances en el conocimiento de los cambios fenotípicos que ocurren durante la activación *in vivo* de células NK^{28,30}. Así, hoy se sabe que las células NK activadas muestran modificaciones en el patrón de expresión de diferentes antígenos de los que merece destacar CD2, CD7, CD11a, CD11b, CD11c, CD38, CD45RO, CD45RA, CD57 y HLADR^{28,30}. Los cambios fenotípicos tempranos que ocurren durante procesos de activación aguda se reflejan en un aumento de la expresión de HLADR, CD11a, CD38 y CD45RO junto con un descenso de la reactividad para CD11b, CD45RA, expresión clara de CD11c y escasa de CD57^{28,30}. Algunas de estas alteraciones, como por ejemplo la expresión de HLADR y CD45RO, luego desaparecen; otras, como la disminución de CD11b, se acentúan y otras sufren cambios opuestos (p. ej., la expresión de CD38 y CD11c después de aumentar transitoriamente, disminuye y la expresión de CD57 tras disminuir inicialmente, se incrementa posteriormente). En estas etapas precoces de la activación NK la expresión de CD7 apenas se modifica, mientras que la proporción de células NK que expresan CD2 suele incrementarse^{28,30}. En etapas tardías de la activación, asociadas a procesos crónicos, las células NK circulantes muestran un aumento de la reactividad para CD2 (homogéneo) y CD57 (fuerte y homogéneo) junto con una disminución acentuada de la expresión de los antígenos CD7 (heterogéneo), CD11b (débil), CD11c (débil y heterogénea), CD38 (débil), CD45RO (negativo) y HLADR (negativo/débil)^{28,30}. En la tabla 2 se resumen los cambios fenotípicos más relevantes que se observan en las células NK de sangre periférica durante los procesos de activación aguda y crónica con respecto a la situación basal.

Análisis fenotípico de clonalidad NK

Uno de los mayores problemas que se plantean en el diagnóstico de las neoplasias de células NK

Tabla 1. Características fenotípicas de las células NK CD56+ débil y CD56++ de SP de sujetos sanos adultos

	Subpoblación CD56+ d	Subpoblación CD56++
CD2	77 ± 11% (+)	94 ± 3 (++)
CD7	99 ± 1 (+++)	94 ± 5 (++++)
CD8	55 ± 16 (+/+)	54 ± 13 (+/+)
CD11a	100 ± 0 (++)	100 ± 0 (+)
CD11b	92 ± 13 (+)	84 ± 8 (+)
CD11c	72 ± 24 (+ d/+)	92 ± 6 (+)
CD16	98 ± 2 (+)	28 ± 16 (+ d)
CD25	1 ± 1 (+ d)	22 ± 9 (+ d)
CD38	99 ± 2 (+)	99 ± 2 (+)
CD44	100 ± 1(+ d)	100 ± 2 (+)
CD45RA	100 ± 0 (++)	98 ± 2 (+)
CD45RO	4 ± 4 (+ d)	12 ± 5 (+)
CD56	100 ± 0 (+)	100 ± 0 (++++)
CD57	66 ± 14 (++++)	1 ± 1
CD62L	14 ± 7 (+ d)	100 ± 0 (+ d/+)
CD94	59 ± 11 (+ d/+)	98 ± 3 (+/+)
CD122	100 ± 0 (+ d)	100 ± 0 (+)
CD158a	18 ± 8 (+ d)	1 ± 0
CD161	83 ± 11 (+ d/+)	59 ± 25 (+ d)
HLA DR	23 ± 13 (+)	83 ± 8 (+)
NKB1	16 ± 16 (++)	0 ± 1

Resultados expresados como media ± desviación estándar del porcentaje de células positivas (intensidad de expresión de las células positivas: + d: positivo débil; + : positivo moderado; ++ : positivo; +++ : positivo fuerte; ++++ : positivo muy fuerte). SP: sangre periférica. Modificada de Lima et al, 2001, ref. 28.

maduras es la demostración de su naturaleza (mono)clonal. Mientras que en el caso de las neoplasias de linfocitos T y B, el estudio de los patrones de reorganización de los genes que codifican para el receptor de célula T (TCR) y las inmunoglobulinas permite asegurar la naturaleza clonal de la enfermedad^{31,32}, no existen marcadores moleculares equivalentes para las células NK. Además, la escasa incidencia de alteraciones citogenéticas recurrentes y, en nuestro medio, de infección por VEB, hacen que desde el punto de vista molecular, las únicas aproximaciones metodológicas capaces de confirmar o descartar el carácter (mono)clonal de una expansión NK queden restringidas al estudio de los patrones de expresión génica asociados a la inactivación del cromosoma X³³, que aún así son aplicables únicamente en mujeres y sobre células purificadas.

Al igual que ocurre con el repertorio de cadenas ligeras de las inmunoglobulinas o de las familias de la región Vbeta del TCR, algunos autores han sugerido la existencia de patrones restringidos y altamente controlados de expresión de receptores asociados a células NK en subpoblaciones específicas de estas células. Hoy se conoce que la formación de conjugados entre las células NK y las células diana constituye un requerimiento para el desarrollo de una función citotóxica eficaz^{7,34-36}. Este reconocimiento depende de un equilibrio finamente controlado entre señales media-

Tabla 2. Características fenotípicas de las células NK maduras de sangre periférica de adultos sanos y con procesos reactivos

	CD2	CD7	CD11c	CD57
Sanos	74 ± 11 (+)	99 ± 1 (++)	74 ± 17 (+)	56 ± 18 (++)
Procesos agudos	79 ± 9 (+)	99 ± 1 (+++)	83 ± 11 (+/+)	21 ± 8 (+)
Procesos crónicos	84 ± 15 (+)	99 ± 2 (+/+)	60 ± 28 (+)	72 ± 16 (++)

Resultados expresados como media ± desviación estándar del porcentaje de células positivas (intensidad de expresión de las células positivas: + d: positivo débil; + : positivo moderado; ++ : positivo; +++ : positivo fuerte). SP: sangre periférica. (Modificada de Lima et al, 2002³⁰.)

das por receptores de muerte celular de la familia de las inmunoglobulinas (KIR) como CD158, NKB1, NKp30, NKp44 o NKp46 o tipo lectina (KLR) como CD94 y CD161^{35,37-39}. Estos receptores inhiben o activan células NK de una forma dependiente (CD94, CD158, NKB1) o independiente (CD161) de su interacción con moléculas HLA de clase I y algunos de ellos tienen expresión habitualmente restringida a algunas subpoblaciones de células NK¹. En este sentido, algunos autores han sugerido que el patrón de expresión de proteínas de algunas familias de estos receptores como p58, podría ser distinto en células NK clonales y reactivas⁴⁰; sin embargo, sus hallazgos preliminares no han podido ser confirmados en otras series⁴¹⁻⁴³.

Una posible alternativa a los estudios de clonalidad convencionales sería la demostración de la expresión de fenotipos aberrantes en células NK monoclonales en contraposición con los fenotipos descritos anteriormente para las células NK normales y reactivas/activadas, al igual que ocurre en otros síndromes linfoproliferativos crónicos T y B⁴⁴⁻⁴⁷. En este sentido, el estudio de los fenotipos de las células NK maduras de sangre periférica de individuos sanos y de las células NK activadas circulantes en procesos agudos y crónicos permiten, además de entender mejor la fisiopatología de las células NK, definir criterios fenotípicos de (mono)clonalidad a través de la identificación de fenotipos NK aberrantes. Así pues, hoy conocemos que una importante proporción de los pacientes con linfocitosis persistentes de LGL-NK muestran expresión anormalmente débil de CD56 (CD56-/+ débil), correspondiendo todos los casos CD56-/+ débil analizados a expansiones monoclonales de células NK⁴³.

Neoplasias de células NK

En general, las neoplasias de células NK son relativamente poco frecuentes y de difícil diagnóstico. Habitualmente podemos encontrar referencia en la literatura médica a neoplasias de precursores NK que incluirían por un lado la leucemia mieloblástica aguda NK (LMA/NK)⁴⁸⁻⁵⁰ y por otra parte, el linfoma blástico NK^{49,51,52} y a enfermedades linfoproliferativas de células NK maduras entre las que se incluyen la leucemia/linfoma agresivo de células NK, el linfoma NK extranodal nasal y "tipo nasal" y las linfocitosis de LGL-NK^{11,18}.

En las neoplasias presumiblemente derivadas de precursores NK, el principal problema diagnóstico radica en la posibilidad de establecer de forma inequívoca el origen NK de las células neoplásicas. La ausencia de marcadores específicos de células NK, junto al escaso conocimiento disponible sobre las etapas tempranas de la diferenciación normal de los precursores NK llevan a que con frecuencia, el diagnóstico de estas entidades se fundamente en criterios de exclusión de un posible origen mielóide o linfóide T y B, junto con la expresión de marcadores que como CD56, aunque son característicos de células NK, son poco específicos de esta línea celular pudiendo expresarse en prácticamente todas las demás series hematopoyéticas (T, B y mielóide) y en células no hematopoyéticas⁵³. Precisamente por este motivo, queda aún por demostrar el poco probable origen NK de las LMA/NK⁴⁸⁻⁵⁰; de forma similar, trabajos recientes han demostrado que al menos una parte importante de los denominados linfomas blásticos de células NK, en realidad corresponden a leucemias/linfomas de células dendríticas que de forma característica muestran un fenotipo CD56+/CD4+/7.1+/HLADR++/CD123++ en ausencia de CD16, CD94, granzima, perforina u otros marcadores específicos de células con funciones citolíticas⁵⁴⁻⁵⁶.

Más evidente es sin duda el origen NK de las neoplasias de células NK maduras que en ausencia de reordenamiento de los genes TCR e IgH muestran positividad para marcadores característicos de célula NK como TIA1, CD94, CD16, granzima B, perforina, CD7 y/o CD2, entre otros^{52,57,58}. Precisamente por la gran similitud fenotípica entre las células NK neoplásicas de estos pacientes y las células NK normales asociada a la ausencia de marcadores de clonalidad universales y bien establecidos, resulta especialmente problemático dentro de este grupo, el diagnóstico de las linfocitosis de LGL-NK.

De todas las neoplasias NK maduras, las linfocitosis de LGL-NK son el proceso más frecuente. Suelen presentarse en adultos aparentemente sanos, a partir de la quinta década de la vida, realizándose con frecuencia su diagnóstico a partir de un hemograma de rutina en el que se observa una linfocitosis leve o moderada (< 20 × 10⁹ linfocitos/l) persistente. En sangre periférica, los linfocitos muestran un aspecto maduro con la presencia de gránulos citoplasmáticos que contienen perforina y granzimas. Fenotípica-

(infecciones virales y/o neoplasias) agudos y crónicos asociados a activación de células NK circulantes

CD11b	CD38	CD11a	HLA-DR	CD45RA	CD45RO
89 ± 7 (+)	89 ± 17 (+)	100 ± 0 (++)	16 ± 14 (+ d)	100 ± 0 (+/+ +)	5 ± 5 (+ d)
66 ± 18 (+ d)	100 ± 0 (+/+ +)	100 ± 0 (+++)	69 ± 12 (+ +)	100 ± 0 (+)	23 ± 12 (+ d)
79 ± 13 (+ d)	80 ± 26 (+ d)	100 ± 0 (+++++)	30 ± 26 (+)	100 ± 0 (+ +)	7 ± 13 (+ d)

mente se distinguen 3 grupos de expansiones de células NK maduras CD16+, por la expresión de CD56 y CD2: a) LGL-NK CD56- o + débil/CD2+, b) LGL-NK CD56+/CD2+, y c) LGL-NK CD56+/CD2-. El primer grupo representa alrededor de 40 % de los casos y suele asociarse con mayor infiltración periférica, mientras que los restantes pacientes suelen corresponder al segundo grupo (50-60%) y los casos CD56+/CD2- son raros (< 5%)⁴³.

En el primer grupo, las células NK muestran un fenotipo aberrante con expresión anormalmente débil de CD56 y CD7 y/o CD16. Este fenotipo aberrante probablemente refleja la existencia de anomalías citogenéticas subyacentes de naturaleza clonal como lo demuestran estudios recientes del patrón de inactivación del cromosoma X⁴³. Por el contrario, en los otros dos grupos, el fenotipo es habitualmente casi superponible al de células NK normales/activadas^{57,58}. Aunque algunos autores⁴⁰ han sugerido que el patrón de expresión de proteínas de algunas familias de receptores NK que como p58, podría ser distinto en células NK clonales y reactivas, sus hallazgos preliminares no han podido ser confirmados en otras series⁴¹⁻⁴³. Ello hace necesaria en estos pacientes, la investigación de clonalidad mediante métodos alternativos, de los que merece destacar por su aplicabilidad, el test HUMARA de inactivación del cromosoma X³³.

Desde el punto de vista clínico, las linfocitosis LGL-NK suelen cursar de forma indolente en ausencia de organomegalias y habitualmente no requieren tratamiento citorreductor específico^{57,58}. No obstante, con frecuencia muestran complicaciones derivadas de las citopenias, infecciones y otras neoplasias que frecuentemente se asocian a la expansión NK, que son las que determinan las manifestaciones clínicas observadas a lo largo de la evolución de la enfermedad⁵⁷⁻⁵⁹.

Bibliografía

1. Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 2002; 100:1935-47.
2. Lotzova E, Savary CA. Human natural killer cell development from bone marrow progenitors: analysis of phenotype, cytotoxicity and growth. *Nat Immunol* 1993;12:209-17.
3. Spits H, Blom B, Jaleco AC, Weijer K, Verschuren MC, Van Dongen JJ, et al. Early stages in the development of human T, natural killer and thymic dendritic cells. *Immunol Rev* 1998;165:75-86.

4. Jaleco AC, Blom B, Res P, Weijer K, Lanier LL, Phillips JH, et al. Fetal liver contains committed NK progenitors, but is not a site for development of CD34+ cells into T cells. *J Immunol* 1997;159:694-702.
5. Carayol G, Robin C, Bourhis JH, Bennaceur-Griscelli A, Chouaib S, Coulombel L, Caignard A. NK cells differentiated from bone marrow, cord blood and peripheral blood stem cells exhibit similar phenotype and functions. *Eur J Immunol* 1998;28:1991-2002.
6. Sato T, Laver JH, Aiba Y, Ogawa M. NK cell colony formation from human fetal thymocytes. *Exp Hematol* 1999;27:726-33.
7. Moretta L, Bottino C, Ferlazzo G, Pende D, Melioli G, Mingari MC, et al. Surface receptors and functional interactions of human natural killer cells: from bench to the clinic. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60:2139-46.
8. Farag SS, Van Deusen JB, Fehniger TA, Caligiuri MA. Biology and clinical impact of human natural killer cells. *Int J Hematol* 2003;78:7-17.
9. Moretta L, Ferlazzo G, Mingari MC, Melioli G, Moretta A. Human natural killer cell function and their interactions with dendritic cells. *Vaccine* 2003;21(Suppl 2):38-42.
10. Kawa K. Diagnosis and treatment of Epstein-Barr virus-associated natural killer cell lymphoproliferative disease. *Int J Hematol* 2003;78:24-31.
11. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting—Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 1999;17:3835-49.
12. Saito T, Morimoto K, Mitamura I, Ohshima T, Sawada U, Horie T. Primary nasopharyngeal lymphoma with CD3- and CD56+ phenotype. *Rinsho Ketsueki* 1995;36:12-7.
13. Chan JK, Sin VC, Wong KF, Ng CS, Tsang WY, Chan CH, et al. Nonnasal lymphoma expressing the natural killer cell marker CD56: a clinicopathologic study of 49 cases of an uncommon aggressive neoplasm. *Blood* 1997;89:4501-13.
14. Van Gorp J, De Bruin PC, Sie-Go DM, Van Heerde P, Ossenkoppele GJ, Rademakers LH, et al. Nasal T-cell lymphoma: a clinicopathological and immunophenotypic analysis of 13 cases. *Histopathology* 1995;27:139-48.
15. Jaffe ES, Chan JK, Su IJ, Frizzera G, Mori S, Feller AC, et al. Report of the Workshop on Nasal and Related Extranodal Angiocentric T/Natural Killer Cell Lymphomas. Definitions, differential diagnosis, and epidemiology. *Am J Surg Pathol* 1996;20:103-11.
16. Harabuchi Y, Imai S, Wakashima J, Hirao M, Kataura A, Osato T, et al. Nasal T-cell lymphoma causally associated with Epstein-Barr virus: clinicopathologic, phenotypic, and genotypic studies. *Cancer* 1996;77:2137-49.
17. Inamura N, Kusunoki V, Kawa K, Yunur K, Hara J, Oda K, et al. Aggressive natural killer cell leukaemia/lymphoma: report of four cases and review of the literature. Possible existence of a new clinical entity originating from the third lineage of lymphoid cells. *Br J Haematol* 1990; 75:49-59.
18. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994;84:1361-92.
19. Okuno SH, Tefferi A, Hanson CA, Katzmann JA, Li CY, Witzig TE. Spectrum of diseases associated with increased proportions or absolute numbers of peripheral blood natural killer cells. *Br J Haematol* 1996; 93:810-2.
20. García-Sanz R, González M, Orfao A, Moro MJ, Hernández JM, Borrego D, et al. Analysis of natural killer-associated antigens in peripheral blood and bone marrow of multiple myeloma patients and prognostic implications. *Br J Haematol* 1996;93:81-8.
21. Bennett IM, Zatspeina O, Zamai L, Azzoni L, Mikheeva T, Perussia B. Definition of a natural killer NKR-P1A+/CD56-/CD16- functionally immature human NK cell subset that differentiates in vitro in the presence of interleukin 12. *J Exp Med* 1996;184:1845-56 (Erratum in: *J Exp Med* 1997;185:1150-1).
22. Spits H, Lanier LL, Phillips JH. Development of human T and natural killer cells. *Blood* 1995;85:2654-70.
23. Sedlmayr P, Schallhammer L, Hammer A, Wilders-Truschnig M, Wintersteiger R, Dohr G. Differential phenotypic properties of human peripheral blood CD56dim+ and CD56bright+ natural killer cell subpopulations. *Int Arch Allergy Immunol* 1996; 110:08-13.
24. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 2001;97:3146-51.

25. Jacobs R, Hintzen G, Kemper A, Beul K, Kempf S, Behrens G, et al. CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol* 2001;31: 3121-7.
26. Geiselhart A, Dietl J, Marzusch K, Ruck P, Ruck M, Horny HP, et al. Comparative analysis of the immunophenotypes of decidual and peripheral blood large granular lymphocytes and T cells during early human pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1995;33: 315-22.
27. King A, Gardner L, Sharkey A, Loke YW. Expression of CD3 epsilon, CD3 zeta, and RAG-1/RAG-2 in decidual CD56+ NK cells. *Cell Immunol* 1998;183:99-105.
28. Lima M, Teixeira MA, Queiros ML, Leite M, Santos AH, Justica B, et al. Immunophenotypic characterization of normal blood CD56+ lo versus CD56+ hi NK-cell subsets and its impact on the understanding of their tissue distribution and functional properties. *Blood Cells Mol Dis* 2001;27:731-43.
29. Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 1986; 136:4480-6.
30. Lima M, Almeida J, Dos Anjos Teixeira M, Queiros ML, Justica B, Orfao A. The "ex vivo" patterns of CD2/CD7, CD57/CD11c, CD38/CD11b, CD45RA/CD45RO, and CD11a/HLA-DR expression identify acute/early and chronic/late NK-cell activation states. *Blood Cells Mol Dis* 2002;28:181-90.
31. Cairns SM, Taylor JM, Gould PR, Spagnolo DV. Comparative evaluation of PCR-based methods for the assessment of T cell clonality in the diagnosis of T cell lymphoma. *Pathology* 2002;34:320-5.
32. Kikuchi M, Kitamura K, Nishio Y, Ishii M, Kawano N, Inayama Y, et al. Diagnosis of B-cell lymphoma. Utility of the polymerase chain reaction for detecting clonality from archival cytologic smears. *Acta Cytol* 2002; 46:349-56.
33. Wu Y, Basir Z, Kajdacsy-Balla A, Strawn E, Macias V, Montgomery K, et al. Resolution of clonal origins for endometriotic lesions using laser capture microdissection and the human androgen receptor (HUMARA) assay. *Fertil Steril* 2003;79(Suppl 1):710-7.
34. Middleton D, Curran M, Maxwell L. Natural killer cells and their receptors. *Transpl Immunol* 2002;10:147-64.
35. Biassoni R, Cantoni C, Marras D, Giron-Michel J, Falco M, Moretta L, et al. Human natural killer cell receptors: insights into their molecular function and structure. *J Cell Mol Med* 2003;7:376-87.
36. Ferlazzo G, Thomas D, Lin SL, Goodman K, Morandi B, Muller WA, et al. The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J Immunol* 2004;172:1455-62.
37. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, et al. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2001;19:197-223.
38. Moretta L, Bottino C, Pende D, Mingari MC, Biassoni R, Moretta A. Human natural killer cells: their origin, receptors and function. *Eur J Immunol* 2002;32:1205-11.
39. Augugliaro R, Parolini S, Castriconi R, Marcenaro E, Cantoni C, Nanni M, et al. Selective cross-talk among natural cytotoxicity receptors in human natural killer cells. *Eur J Immunol* 2003;33:1235-41.
40. Semenzato G, Zambello R, Starkebaum G, Oshimi K, Loughran TP Jr. The lymphoproliferative disease of granular lymphocytes: updated criteria for diagnosis. *Blood* 1997;89:256-60.
41. Kamarashev J, Burg G, Mingari MC, Kempf W, Hofbauer G, Dummer R. Differential expression of cytotoxic molecules and killer cell inhibitory receptors in CD8+ and CD56+ cutaneous lymphomas. *Am J Pathol* 2001;158:1593-8.
42. Melioli G, Semino C, Margarino G, Mereu P, Scala M, Cangemi G, et al. Expansion of natural killer cells in patients with head and neck cancer: detection of "noninhibitory" (activating) killer Ig-like receptors on circulating natural killer cells. *Head Neck* 2003;25:297-305.
43. Lima M, Almeida J, Garcia Montero A, Teixeira MA, Queiros ML, Santos AH, et al. Clinico-biological, immunophenotypic and molecular characteristics of monoclonal CD56-/+ dim chronic NK-cell large granular lymphocytosis. *Am J Pathol* 2004 (en prensa).
44. Lima M, Almeida J, Teixeira MA, Alguero MC, Santos AH, Balanzategui A, et al. TCRalphabeta+/CD4+ large granular lymphocytosis: a new clonal T-cell lymphoproliferative disorder. *Am J Pathol* 2003;163: 763-71.
45. Gorczyca W, Weisberger J, Liu Z, Tsang P, Hossein M, Wu CD, et al. An approach to diagnosis of T-cell lymphoproliferative disorders by flow cytometry. *Cytometry* 2002;50:177-90.
46. Jamal S, Picker LJ, Aquino DB, McKenna RW, Dawson DB, Kroft SH. Immunophenotypic analysis of peripheral T-cell neoplasms. A multiparameter flow cytometric approach. *Am J Clin Pathol* 2001;116:512-26.
47. Sánchez ML, Almeida J, González D, González M, García-Marcos MA, Balanzategui A, et al. Incidence and clinicobiologic characteristics of leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders with more than one B-cell clone. *Blood* 2003;102:2994-3002.
48. CD7+ and CD56+ myeloid/natural killer cell precursor acute leukemia: a distinct hematolymphoid disease entity. *Blood* 1997;90: 2417-28.
49. Suzuki R, Nakamura S. Malignancies of natural killer (NK) cell precursor: myeloid/NK cell precursor acute leukemia and blastic NK cell lymphoma/leukemia. *Leuk Res* 1999;23:615-24.
50. Inaba T, Shimazaki C, Sumikuma T, Ochiai N, Okano A, Hatsue M, et al. Clinicopathological features of myeloid/natural killer (NK) cell precursor acute leukemia. *Leuk Res* 2001;25:109-13.
51. Yoshimasu T, Manabe A, Tanaka R, Mochizuki S, Ebihara Y, Ishikawa K, et al. Successful treatment of relapsed blastic natural killer cell lymphoma with unrelated cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002;30:41-4.
52. Oshimi K. Leukemia and lymphoma of natural killer lineage cells. *Int J Hematol* 2003;78:18-23.
53. Zeromski J, Nyczak E, Dyszkiewicz W. Significance of cell adhesion molecules, CD56/NCAM in particular, in human tumor growth and spreading. *Folia Histochem Cytobiol* 2001;39(Suppl 2):36-7.
54. Feuillard J, Jacob MC, Valensi F, Maynadie M, Gressin R, Chaperot L, et al. Clinical and biologic features of CD4(+)/CD56(+) malignancies. *Blood* 2002;99:1556-63.
55. Jacob MC, Chaperot L, Mossuz P, Feuillard J, Valensi F, Leroux D, et al. CD4+ CD56+ lineage negative malignancies: a new entity developed from malignant early plasmacytoid dendritic cells. *Haematologica* 2003;88:941-55.
56. Bueno C, Almeida J, Lucio P, Marco J, García R, De Pablos JM, et al. Incidence and characteristics of CD4(+)/HLA DRhi dendritic cell malignancies. *Haematologica* 2004;89:58-69.
57. Sokol L, Loughran TP Jr. Leukemia and lymphoma of natural killer lineage cells. *Int J Hematol* 2003;78:18-23.
58. Lamy T, Loughran TP Jr. Clinical features of large granular lymphocyte leukemia. *Semin Hematol* 2003;40:185-95.
59. Go RS, Lust JA, Phylly RL. Aplastic anemia and pure red cell aplasia associated with large granular lymphocyte leukemia. *Semin Hematol* 2003;40:196-200.

CLINICAL AND MORPHOLOGICAL FEATURES OF NATURAL KILLER (NK) CELL DISORDERS

E. MATUTES Y N. OSUJI

Department of Haemato-Oncology. The Royal Marsden Hospital/Institute of Cancer Research. Londres. Inglaterra.

Summary

Natural killer (NK) cell neoplasms comprise a variety of diseases which affect adults and may manifest as primary leukaemias or nodal/extranodal lymphomas. Problems in their definition arise both from the rarity of these diseases and from the lack of a genetic signature. According to the clinical manifestations and disease course two groups can be distinguished: 1- chronic NK proliferations and 2- aggressive NK leukaemias and blastic lymphomas the latter two defined by the WHO. Chronic NK proliferations manifest with similar but not identical symptoms to the T-cell large granular lymphocyte (LGL) leukaemia and have a protracted clinical course. There are uncertainties as to whether they are reactive conditions or instead are clonal expansions of NK cells representing a preceding phase of the more aggressive forms. In contrast, aggressive and blastic NK neoplasms manifest with widespread disease and pursue a rapidly progressive course with refractoriness to therapy and short survival. The morphology of the circulating blood cells and/or that of the tissue infiltrates is either similar to the CD3+ T-cell LGLs or, instead display immature and blastic features resembling lymphoblasts. Progress on disease characterization, particularly in the aggressive forms has not been paralleled by novel therapeutical approaches but it is likely that in the near future the use of monoclonal antibody therapy together with non-ablative stem-cell transplantation will improve the outlook of these patients with a dismal outcome.

Introduction

The natural killer (NK) cell leukemias and lymphomas comprise a diverse group of neoplasms that arise from cells committed to the NK lineage. They are heterogeneous in their clinical, morphological and immunophenotypic features and pose diagnostic difficulties due to the lack of a uniform criterion for their definition as well as for the lack of a genetic signature. The NK cell derived malignancies have been recognised for the last decade^{1,2,3,4}; however, a substantial proportion of documented cases had not been fully investigated and it is possible that some of the neoplasms reported as NK malignancies might represent CD56+ CD4+ plasmacytoid dendritic cell leukaemias, T-cell malignancies with expression of CD56 or even CD56+ acute myeloid leukaemias^{5,6,7}. Within the WHO classification, three categories of NK disorders are recognised under the designations of blastic natural killer lymphomas, aggressive NK leukaemias and extranodal NK/T cell lymphomas (previously designated angiocentric and nasal NK lymphomas under the REAL classification)^{8,9,10}. Indeed, it has been suggested that aggressive NK leukaemias may be the leukaemic counterpart of the nasal NK/T cell lymphomas. Despite the fact that a significant proportion of these patients have an aggressive disease, a few patients with NK neoplasms have a protracted and chronic clinical course similar to that seen in stage A B-cell chronic lymphocytic leukaemia (CLL) or T-cell large granular lymphocyte (LGL) leukaemia. These indolent cases are described as chronic NK proliferations or lymphocytosis.

The incidence of NK cell leukemias is low and they appear to have a distinct geographical distribution. Thus, they are significantly more frequent in the East eg., China and Japan where most of the cases have been reported whilst are rare in the West. This distribution suggests that either genetic or environmental factors, in particular viruses, might play a role in the pathogenesis. The Epstein Barr virus (EBV) has been shown to have a primary pathogenic role in some cases particularly but not exclusively in those originating from the Eastern hemisphere with evidence of

clonal (episomal) integration of this DNA virus in the neoplastic cells^{4,11,12,13}.

We will briefly summarise the clinical features and morphology of both the chronic and aggressive NK-cell disorders focussing on those with blood involvement.

Clinical features, therapy and outcome

NK cell leukaemias affect predominantly middle age adults although rare cases in childhood have been documented^{1,13}. We will consider separately two clinical categories on the basis of a variable disease course: chronic NK cell proliferations and aggressive NK leukaemias

Chronic NK cell proliferations

These represent around 15 % of all cases of LGL proliferations. They affect middle age or elderly patients with a male preponderance and often the disease is discovered by incidental lymphocytosis on routine blood counts. The clinical manifestations are similar to those seen in patients with a T-cell (CD3+) LGL expansion although neutropenia appears to be less frequent. Vasculitis, glomerulonephritis and polyarteritis as well as pure red cell aplasia have been observed^{14,15}. The role of HTLV-II and EBV in chronic NK proliferations is controversial as is its pathogenesis with regards to whether they represent a chronic or preceding phase of the more aggressive forms of NK-cell leukaemias or are instead a reactive disorder.

Most patients are asymptomatic, thus therapy is not indicated and a policy of “watch and wait” seems a reasonable approach. Constitutional symptoms and/or cytopenias if present may warrant treatment. Options include prednisolone for associated vasculitides and immunosuppression with cyclophosphamide or cyclosporin A for cytopenias.

Aggressive NK-cell leukaemias (table 1)

This is the most common form of presentation. The main manifestations include systemic B symptoms such as fever and weight loss, those derived from cytopenias, ie anaemia or thrombocytopenia

Table 1. Clinical features and outcome in aggressive NK-cell disorders

Number	M/F	Age	Liver	Spl	Nodes	Skin	PB/LGL	Survival	Ref
22	7/15	12-80	67%	54%	36%	14%	82%	1day-3.5 y	13
15	7/6	19-64	77%	77%	38%	8%	NA	4-163 days	12
5	3/2	37-54	100%	60%	40%	20%	NA	3-42 days	16
4	1/3	13-30	100%	100%	50%	50%	100%	2-32 months	1
1	M	50	Yes	Yes	Yes	No	Yes	19 days	4
1	F	39	Yes	Yes	No	No	Yes	4 months	2
1	M	30	Yes	Yes	No	No	Yes	23 months	3

Spl: splenomegaly; PB/LGL: peripheral blood/large granular lymphocytes.

and organomegaly, most commonly hepatosplenomegaly^{1,12,13,14,16,17}. Skin lesions are not rare whilst are less frequent in the chronic forms. In a few cases, cutaneous lesions may be the first manifestation preceding for weeks or months overt disease¹⁸. In some patients, the disease evolves with a picture mimicking a virus associated haemophagocytic syndrome whilst in others it presents with extranodal involvement such as serous effusions, ascites, involvement of the lung, kidneys, bowel and/or central nervous system^{11,12,13,14} and concomitantly or subsequently a leukaemic picture becomes apparent. Of interest is that patients without lymphoma developing a familial or sporadic haemophagocytic syndrome exhibit impairment of the NK cells and a defective dendritic cell maturation. Although most patients with NK leukaemias present acutely as described above, there are a minority that manifest with an indolent disease prior the development of an aggressive picture the latter shown to be associated with clonal evolution³. Unlike T-cell LGL leukaemia and, as in chronic NK proliferations, neutropenia is not common nor is reumatoid arthritis or a positive rheumatoid factor. Physical examination shows in most cases of aggressive NK leukaemias, spleen and liver enlargement and in around a half lymphadenopathy and/or skin lesions. The WBC often is higher than in T-cell LGL leukaemia with the presence of circulating atypical cells. Anaemia and thrombocytopenia are relatively frequent. Liver enzymes are usually raised as are the urate and lactate dehydrogenase (LDH) levels. Abnormal clotting with a life-threatening coagulopathy may be detected in some cases with a rapidly downhill course¹².

The clinical course is aggressive with most chemotherapies proving ineffective. It appears that anthracycline based regimens yield better responses versus schedules without an anthracycline^{12,13}. In the largest series published, 3 out of 13 patients treated

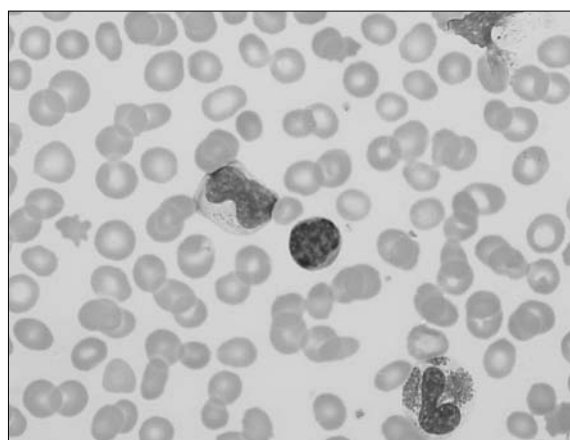


Figure 1. Circulating lymphocytes from a chronic NK-cell case one of which showing an abundant cytoplasm with fine azurophilic granulation

with anthracycline based schedules achieved a complete response¹³. However, all the patients relapsed in a very short period even those who received consolidation with high dose therapy and allogeneic or autologous stem cell transplant¹³. Refractoriness to therapy is thought to be in part related to overexpression of a 80 Kda molecular weight multidrug resistance protein¹⁹. Control of the disease manifestations with immunomodulatory treatment as in T-cell LGL is exceedingly rare. However, we have recently documented a patient with aggressive NK-cell leukaemia in whom control of the disease has been achieved with splenectomy, cyclosporin A and erythropoietin and he is alive 3.5 years from diagnosis²⁰. Significant adverse prognostic factors for survival include B-symptoms, high International prognostic index (IPI) scores and refractory disease while the levels of LDH or type of chemotherapy appear do not have a significant impact¹³.

Survival ranges from days to a few months and is, irrespective of treatment, rarely longer than one year (table 1). In a series of 11 patients reported by Lamy & Loughran, 9 died within two months from diagnosis¹⁴. The median survival in a series of 22 patients reported by the NK-cell Tumour Study group was 58 days; 21 out of these 22 patients died with progressive disease¹³. Another series of 13 patients showed a median survival of 47 days¹². The use of high dose therapy with stem-cell rescue has been contemplated in some patients but does not seem to yield better results^{12,13}. Only anecdotal cases have documented a successful response¹¹ but in a further report the patient relapsed and died at 20 months. It is likely that the use of novel therapies and/or other approaches such as stem-cell transplant with non-myeloablative therapy, antibody therapy and/or therapy directed to kill the EBV + neoplastic cells will improve the outcome and survival particularly in young patients.

Morphology and histology

The morphology of the leukaemic cells is variable. In both chronic and aggressive NK cell leukaemia, the cells are medium sized and have a variable amount of cytoplasm. The nucleus often has a regular outline and there is a variable degree of chromatin condensation. The cytoplasm is pale and may contain azurophilic granules^{1,3,4,8,17}. However, the granules are usually not as prominent as in T-cell LGL leukaemia (fig. 1). In some cases, the cells have a blastic appearance with less condensed chromatin, occasional nucleoli and/or prominent granulation² and may resemble acute lymphoblastic leukaemia blasts¹⁸ (fig 2).

Bone marrow involvement is common in aggressive NK cell leukaemia. The bone marrow aspirate often shows infiltration by the neoplastic cells with a morphology similar to that of the circulating cells. The degree of infiltration is variable from heavy to

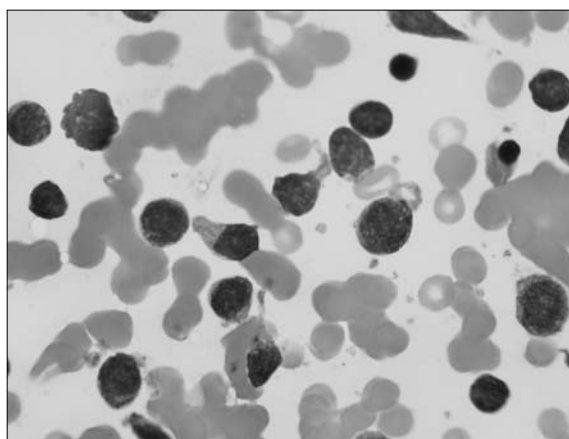


Figure 2. Cells from a patient with an aggressive NK-cell leukaemia showing features of lymphoblasts (hand-mirror cells) without granulation

minor with a very good haemopoietic reserve. Haemophagocytosis may be present and prominent in some cases^{1,12}.

The bone marrow trephine biopsy shows an interstitial or diffuse infiltrate by neoplastic cells (fig. 3); coagulative necrosis, fibrosis and angiocentricity has been noted in some cases^{14,16,17}. However, angioinvasion and necrosis are not specific to NK cell neoplasms and may be seen in T-cell and more rarely B-cell disorders. Occasional non-NK cell lymphoid infiltrates have been noted. Infiltration of other organs is often diffuse and atypia, necrosis and apoptosis may be seen⁴. Descriptions of splenic histology in NK cell disorders are sparse due to the rarity of splenectomy specimens from such patients. Different patterns of involvement have been observed but diffuse infiltration of the red pulp, either, dense or dispersed, as in T-cell LGL is the most common (fig. 4). Colonisation of the peri-arteriolar sheaths may be present. Unlike hairy cell leukaemia, there is a relative sparing of the sinuses. Skin infiltrates are often confined to the dermis with or without extension to the subcutaneous fat but epidermotropism is not a feature

Conclusions

In summary, we have described the clinical manifestations, response to therapy, outcome and morphological/histological features of a rare form of haemopoietic neoplasm designated NK-cell leukaemia. The use of novel therapeutical approaches may result in improved survival in these patients who so far have proven to be refractory to most chemotherapies.

References

1. Imamura N, Kusunoki Y, Kawa-Ha K, Yumura K, Hara J, Oda K, et al. Aggressive natural killer cell leukaemia/lymphoma: report of four cases and review of the literature. Possible existence of a new clinical entity originating from the third lineage of lymphoid cells. *Br J Haematol* 1990;75:49-59.

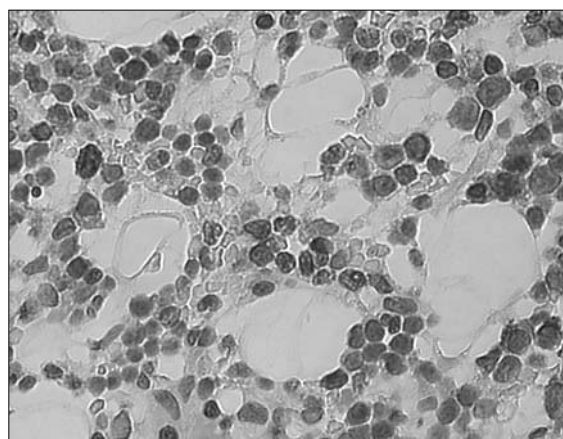


Figure 3. BM trephine biopsy from a case with aggressive NK-cell leukaemia showing heavy interstitial infiltration by CD2+ lymphocytes

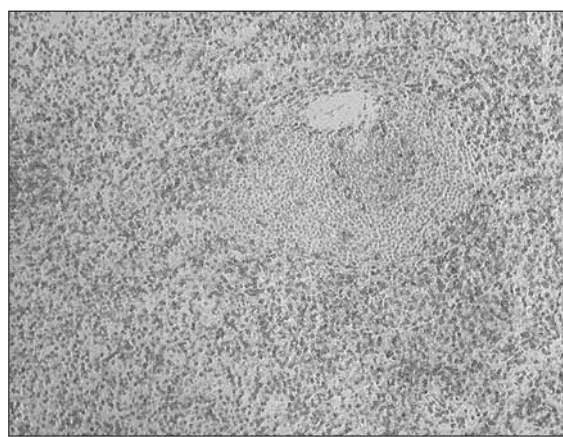


Figure 4. Spleen section from a case with NK-cell leukaemia showing red pulp involvement by CD2+ cells. A residual follicle centre is present

2. Ohno T, Kanoh T, Arita Y, Fuji H, Kuribayashi K, Masuda T, et al. Fulminant clonal expansion of large granular lymphocytes. Characterization of their morphology, phenotype, genotype, and function. *Cancer* 1988;62:1918-27.
3. Ohno Y, Amakawa R, Fukuhara S, Huang C-R, Kamesaki H, Amano H, et al. Acute transformation of chronic large granular lymphocyte leukemia associated with additional chromosome abnormality. *Cancer* 1989;64:63-7.
4. Hart DN, Baker BW, Inglis MJ, Nimmo JC, Starling GC, Deacon E, et al. Epstein-Barr viral DNA in acute large granular lymphocyte (natural killer) leukemic cells. *Blood* 1992;79:2116-23.
5. Feuillard J, Jacob MC, Valensi F, Maynadie M, Gressin R, Chaperot L, et al. Clinical and biological features of CD4+ CD56+ malignancies. *Blood*, 2002;99:1556-63.
6. Suzuki R, Yamamoto K, Seto M, Kagami Y, Ogura M, Yatanabe Y, et al. CD7+ and CD57+ myeloid/natural killer cell precursor acute leukaemia; a distinct hematolymphoid disease entity. *Blood*, 1997;90:2417-28.
7. Pombo de Oliveira MS, Mendes Campos M, Bossa Y E, Alencar DM, Curvelo C, Agudelo DP, et al. Acute leukaemia with natural killer cell antigens in Brazilian children. *Leuk Lymph*, 2004;45:739-43.
8. Chan JKC, Wong KF, Jaffe ES, Ralfkiaer E, et al. Aggressive NK-cell leukaemia. En: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, editors. WHO Classification of Tumours: Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press, 2001; p. 198-200.
9. Chan JKC, Jaffe ES, Ralfkiaer E. Blastic NK-cell lymphoma. En: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, editors. WHO Classification of Tumours: Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press, 2001;214-5.
10. Chan JKC, Jaffe ES, Ralfkiaer E. Extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. WHO Classifi-

- cation of Tumours: Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press, 2001; p. 204-7.
11. Takami A, Nakao S, Yachie A, Kasahara Y, Okumura H, Miura Y, et al. Successful treatment of Epstein-Barr virus associated natural killer cell large granular lymphocytic leukaemia using allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1998; 21:1279-82.
 12. Song S-Y, Kim W S, Ko Y-H, Kim K, Lee M.H, Park K. Aggressive natural killer cell leukaemia: clinical features and treatment outcome. *Haematologica*, 2002;87:1343-5.
 13. Suzuki R, Suzumiya J, Nakamura S, Aoki S, Notoya A, Ozaki S, et al. Aggressive natural killer cell leukaemia revisited: large granular lymphocyte leukaemia of cytotoxic NK cells. *Leukemia*, 2004;18: 763-70.
 14. Lamy T, Loughran TP Jr. Current concepts: large granular lymphocyte leukemia. *Blood Reviews* 1999;13:230-40.
 15. Oshimi K. Lymphoproliferative disorders of natural killer cells. *Int J Hematol* 1996;63:279-90.
 16. Chan JKC, Sin VC, Wong KF, Ng CS, Tsang WY, Chan CH, et al. Non-nasal Lymphoma Expressing the Natural Killer Cell Marker CD56: A Clinicopathologic Study of 49 Cases of an Uncommon Aggressive Neoplasm. *Blood* 1997;89:4501-13.
 17. Foucar K, Matutes E, Catovsky D. T-cell large granular lymphocytic leukemia, T-cell prolymphocytic leukemia and aggressive Natural killer cell leukemia. En: Mauch PM, Armitage JO, Coiffier B, Dalla-Favera R, Harris NL, editors. *Non-Hodgkin's lymphomas*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2004; p. 283-94.
 18. Matutes E, Osuji N, Wotherspoon A, Swansbury J, Morilla R, Taj M, et al. Acute/blastoid natural killer (NK) cell leukaemia. *Haematologica*, 2004 (in press).
 19. Trambas C, Wang Z, Cianfriglia M, Woods G. Evidence that natural killer cells express mini p-glycoprotein but not classic 170 kDa p-glycoprotein. *Br J Haematol* 2001;114:177-84.
 20. Osuji N, Matutes E, Morilla A, Del Giudice I, Wotherspoon A, Catovsky D. Prolonged treatment response in aggressive natural killer cell leukaemia. (submitted).

ACUTE/BLASTIC NATURAL KILLER (NK) CELL LEUKAEMIA

E. MATUTES, N. OSUJI, A. WOTHERSPOON,
J. SWANSBURY, R. MORILLA, M. TAJ
Y K. PRITCHARD JONES

*The Royal Marsden Hospital and Institute of Cancer Research,
Londres, Inglaterra.*

Clinical history

A 13 year old girl presented with a fit when exercising and was admitted into an emergency unit. She had no previous relevant medical history except for mild asthma although, two weeks prior to admis-

sion, she experienced two episodes of "collapse" and, in retrospect, she had been feeling progressively more tired and had noticed a subcutaneous nodule which had not changed in size for five months. She did not have B symptoms.

Physical examination

Hepatomegaly, 4 cm below the costal margin with no evidence of lymphadenopathy or splenomegaly. There was a red skin nodule posterior to the axilla measuring 2 cm in diameter. Chest and heart examination were normal except for a systolic murmur. There were no peripheral and/or central neurological signs.

Radiology

Chest X-ray was normal and an ultrasound confirmed the hepatomegaly and showed an enlarged spleen (16 cm) without lymphadenopathy, and normal kidneys and pancreas.

Laboratory investigations

Peripheral blood counts showed anaemia and leucopenia as follows: Hb = 2.7 g/dl with a normal MCV and MCHC, white blood cell count (WBC) of $2.5 \times 10^9 / l$ with $0.4 \times 10^9 / l$ neutrophils, $1.7 \times 10^9 / l$ lymphocytes and 0.1×10^9 monocytes and, a normal platelet count ($213 \times 10^9 / l$). Review of the blood film did not show abnormal cells. The clotting screen and renal biochemistry including urate and calcium levels were normal and liver function tests showed a mildly raised bilirubin. LDH was raised to 478 IU ($N < 325$). Microbiology screen did not show evidence of an acute viral infection.

Bone marrow aspirate, trephine biopsy and skin biopsy were performed and samples were analysed for morphology, histology, immunophenotyping, cytogenetics and molecular analysis of the immunoglobulin (Ig) and T-cell receptor (TCR) chain genes.

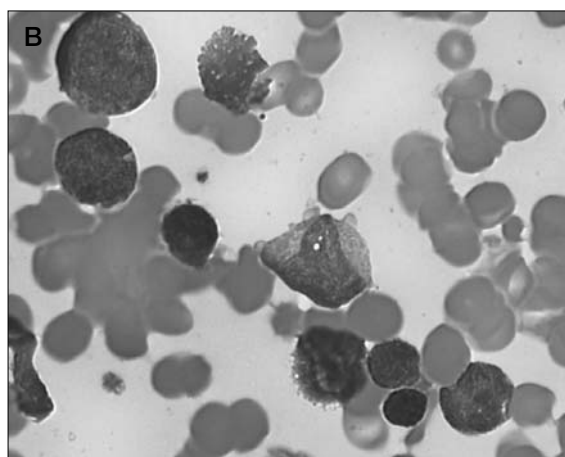
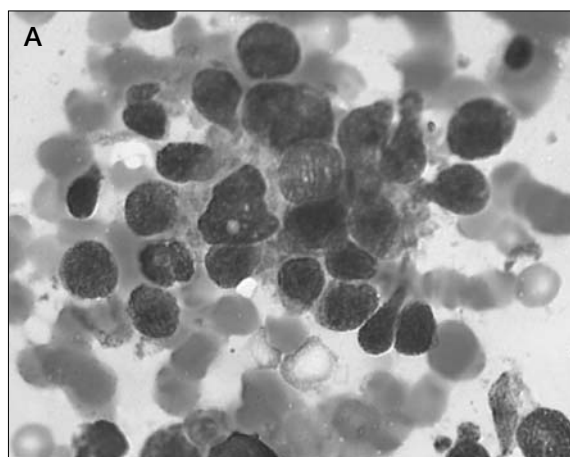


Figure 1 A,B. May Grumwald Giemsa stained bone marrow film showing infiltration by medium to large size lymphoid looking cells some with immature nuclear chromatin and others with abundant basophilic cytoplasm without granules. Note in Figure 1A cell clumping.

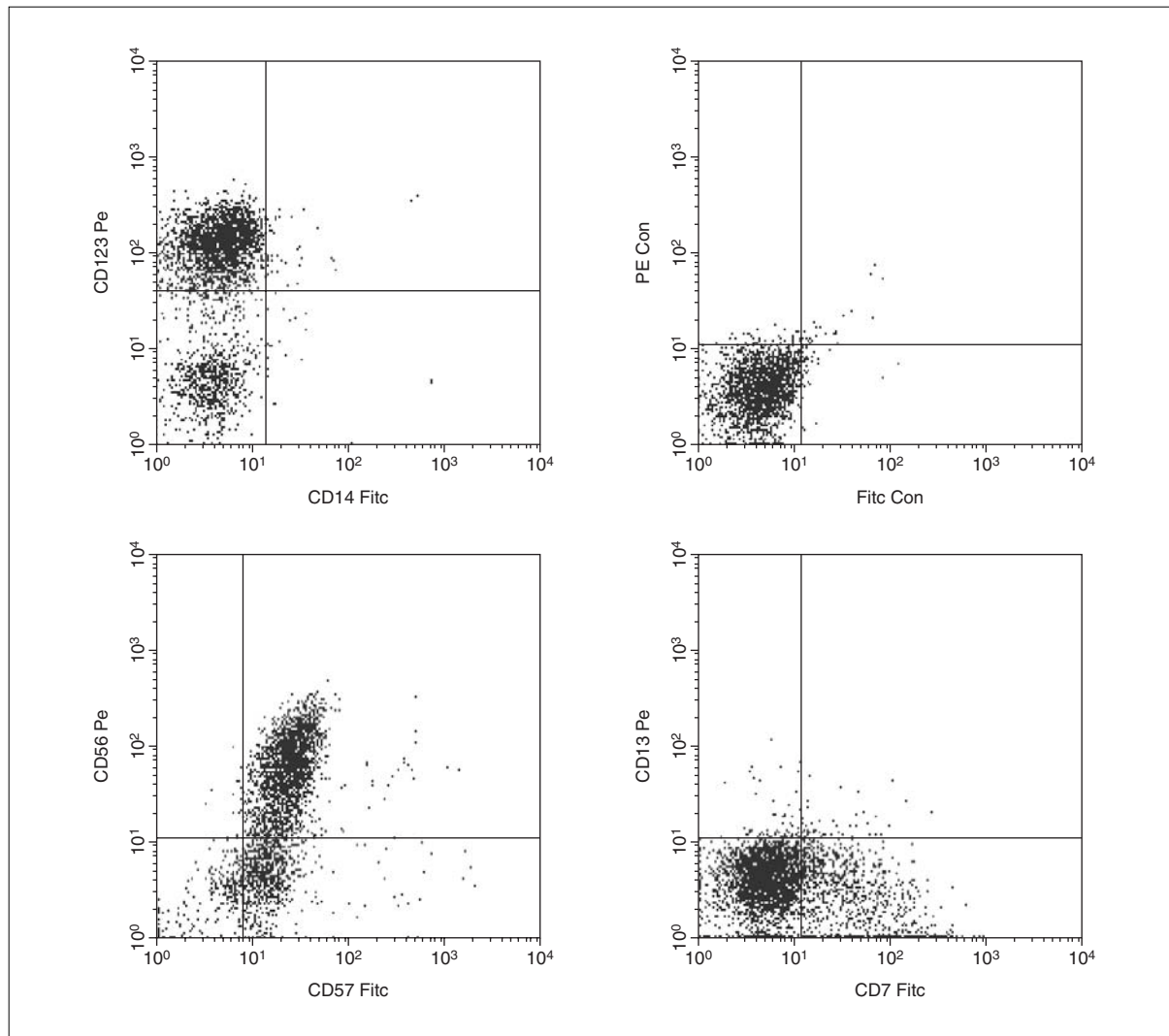


Figure 2. Flow cytometry dot plot showing expression of CD123, CD57 and CD56 in the majority of cells and a weak CD7 expression in a proportion of them.

Morphology and immunophenotype

The bone marrow aspirate showed a hypercellular marrow with heavy infiltration by small to medium size pleomorphic lymphoid cells with open nuclear chromatin and basophilic agranular cytoplasm (fig. 1); normal residual haemopoiesis was scanty. Cytochemistry showed that the abnormal cells were negative for myeloperoxidase (MPO), Sudan Black B and non-specific esterases. A provisional diagnosis of ALL was made. However, immunophenotyping by flow cytometry showed that the majority of cells (> 90%) expressed CD56, CD57, HLA-Dr and CD123 (anti-IL-3 receptor) (fig. 2); in addition, 38% of the cells were TdT positive with weak intensity, and CD2 and CD15 were positive in 32 and 47% of cells respectively. The cells were negative (< 10% + cells) for B-lymphoid (CD19, CD20, CD10, cytCD22, CD79a, CytIgM), myeloid (CD13, CD33, CD14, anti-MPO,

anti-lysozyme, CD117) and T-lymphoid (CD1a, CD4, cytCD3, CD5, CD7, CD8, anti-TCR a/b and anti-TCR g/d) markers as well as for CD16 and CD34.

Histology

The bone marrow trephine biopsy showed a hypercellular marrow without fat spaces. There was a diffuse infiltrate of medium sized cells with irregular nuclei and eosinophilic nucleoli; megakaryocytes were present and scattered within the infiltrate. Immunohistochemistry showed that most cells expressed CD45 and CD56, a few were weakly TdT and CD117 positive whilst they were negative for CD3, CD5, CD4, CD8, CD30 and for myeloid and B-cell markers.

Skin histology showed a dense dermal lymphoid infiltrate extending into the superficial subcutaneous fat with morphological and immunophe-

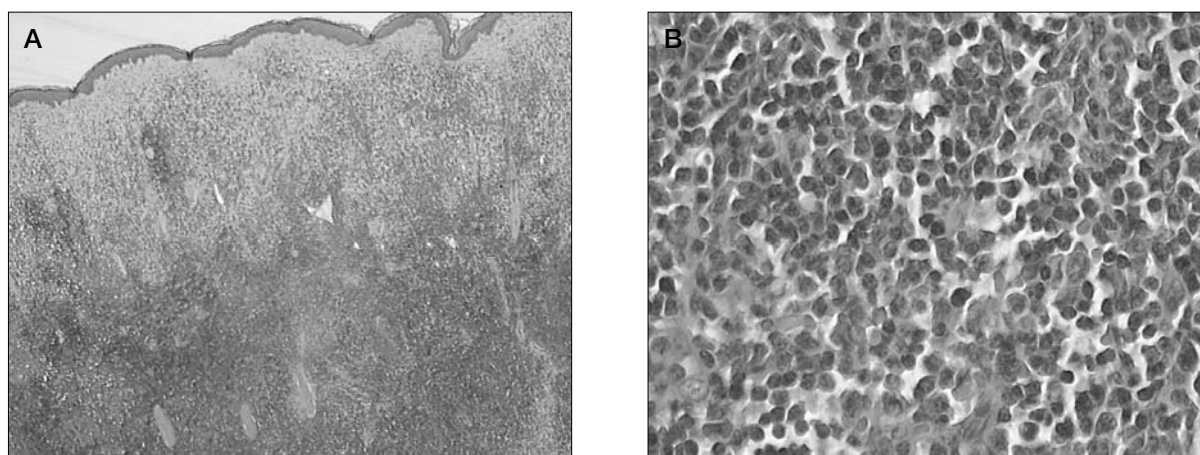


Figure 3. Skin biopsy showing a dense lymphoid infiltrate in the dermis and subcutaneous tissue sparing the epidermis (A). Higher power illustrating in detail the cytological features of the infiltrate.

notypic features similar to the cells from the bone marrow biopsy; there was no evidence of epidermotropism (figs. 3 and 4).

Cytogenetics

Bone marrow cells were cultured for 24 hours and processed following standard techniques. Two thirds of the metaphases showed the presence of a complex clone as follows: 45,XX,del(6)(q1?5q2?7),?inv(6)(p1q2),-8,?add(9)(q34),-13,del(14)(q22),-15, add(17)(p13),add(19)(?p13), + mar,inc(cp9)

Molecular analysis

Molecular analysis applying the polymerase chain reaction (PCR) using primers specific to the Ig and TCR beta and gamma chain genes showed a germ line configuration.

Diagnosis

Acute (blastic) NK cell leukaemia.

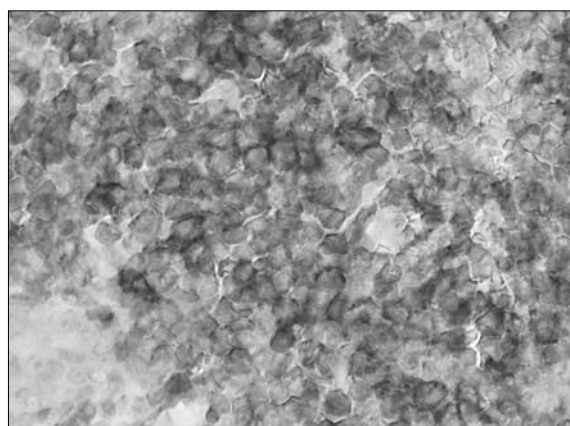


Figure 4. Immunohistochemistry showing strong expression of CD56 in the cutaneous infiltrate.

Follow-up

The patient was started on chemotherapy for high risk ALL according to the Medical Research Council (MRC) ALL 97/99 protocol regimen C with intrathecal CNS prophylaxis. She achieved a complete remission and currently is on maintenance therapy for two years. She remains free of disease two years from presentation but with minimal residual disease positive in the bone marrow

Discussion

The NK leukaemias/lymphomas are rare neoplasms characterised by the proliferation of cells at different stages of differentiation within the NK pathway. In the WHO classification, these neoplasms are recognised under the terms of aggressive NK-cell leukaemias and blastic NK lymphomas despite the fact that not all cases have an aggressive clinical course¹. Patients with a chronic course had been designated in the WHO as indolent NK-cell lymphoproliferative disorders or NK-LGL.

The morphology of the neoplastic cells in NK leukaemias is variable. The cells may be poorly differentiated blasts or lymphoblasts with reticular immature chromatin and agranular cytoplasm as in the present patient; in some cases, coarse azurophilic granules may be visualised in the cytoplasm of the cells. In a proportion of cases, particularly in those with less aggressive clinical course, the cells have an eccentric nucleus with condensed chromatin and pale cytoplasm with fine azurophilic granulation and are indistinguishable from the large granular lymphocytes (LGL) in T-cell LGL leukaemia^{2,3}.

The diagnosis of NK cell leukaemias may be difficult particularly in patients presenting acutely and with blastic morphology; so far, a genetic marker has not been described in this disease. The diagnosis should essentially be based on the immunophenotypic features of the neoplastic cells. In this context,

it is important to use an extensive panel of monoclonal antibodies (McAb) that permit exclusion of a T-cell and/or myeloid commitment of the cells as well as ruling out neoplasms derived from dendritic cells. In addition, molecular analysis of the TCR chain genes is useful to exclude the T-cell nature of the neoplastic cells as NK cells show germ line configuration of the TCR genes.

Considering the immunophenotypic features, expression of the neural adhesion molecule CD56 is the hallmark of the NK neoplasms as, with rare exceptions, the neoplastic NK cells are CD56+. However, this marker is not specific for the NK lineage and can be expressed in a variety of non-haematopoietic and haematopoietic malignancies including acute myeloid leukaemia, multiple myeloma, dendritic cell leukaemias and even in some cases of T-cell LGL leukaemia. In addition to CD56, neoplastic NK cells may express other NK associated markers such as CD16, CD57, CD161 and CD123, the latter a McAb that recognizes the alpha-chain of the IL-3 receptor. According to the expression of CD16, CD56, CD94 and CD161 a pathway of differentiation or maturation of normal and neoplastic NK cells has been recently proposed⁴. However, asynchronies in the expression of these markers may be seen.

From the diagnostic point of view, it is important to complement the results of the NK markers with that of other T-cell specific and myeloid markers. Within this context, NK leukaemias are consistently membrane CD3 negative although some cases, particularly the nasal NK lymphomas, may express the epsilon chain of the CD3 in the cytoplasm like foetal and activated adult NK cells. TCR genes in all these cases are in germ line configuration and the protein products are not detected. NK cells may express non-specific T-cell markers such as CD2 and CD7 and a minority stain weakly for TdT in the nucleus. Myeloid markers such as CD13, CD33 and anti-MPO are consistently negative in "bona fide" NK cell neoplasms.

The differential diagnosis in the present case essentially included T-cell acute lymphoblastic leukaemia (T-ALL) and plasmacytoid dendritic cell leukaemias. T-ALL could be ruled out by immunophenotyping as cells lacked cytoplasmic and membrane expression of specific T-cell markers such as CD3 and TCR; this was further confirmed by molecular studies that showed germ line configuration of the various TCR chain genes. Considering the possible diagnosis of plasmacytoid dendritic cell leukaemia, cells from our patient like neoplastic dendritic cells expressed CD56, CD123 and HLA-Dr; however, unlike the latter they were CD57+, expressed weakly TdT and lacked expression of CD4⁵.

One issue that often arises in NK cell derived disorders is the uncertainty of the neoplastic or clonal nature of the cells, particularly in cases presenting with chronic or indolent disease, as there is no molecular hallmark for this disorder. The clinical mani-

festions and extent of organ involvement in the present case pointed to a neoplastic/clonal disorder. This was further confirmed by cytogenetic analysis that showed a complex karyotype with several numerical and structural chromosomal abnormalities. Of interest, these involved chromosome 6, a finding already reported in acute NK cell neoplasms⁶.

There is no gold standard therapy for acute/blastic NK leukaemias. Data on outcome and response to either high grade lymphoma or ALL directed therapy are scanty but it has been suggested that anthracyclin based schedules are more effective than those without anthracyclin. This in part is due to the rarity of this leukaemia/lymphoma, particularly in Western countries. A review of the literature shows that most cases pursue an aggressive clinical course with multiorgan failure and are thus difficult to manage. Survival is short with only a few cases surviving greater than one year. It seems that in cases like ours with lymphoblast looking cells and clinical manifestations more characteristic of ALL rather than high grade lymphoma, therapy for high risk ALL with consolidation with high dose chemotherapy and stem cell transplant would be appropriate.

In summary, we described a case of acute/blastic NK leukaemia well documented by extensive immunophenotyping and molecular genetics and emphasize the disease features, the differential diagnosis and management of this rare condition.

Remarks

1. Aggressive/blastic NK-cell derived leukaemias are unfrequent and present diagnostic difficulties
2. The diagnosis should be based on immunophenotyping using a wide panel of McAb and if possible molecular analysis
3. They should be distinguished from the chronic or indolent form of NK- leukaemia, T-cell LGL and dendritic plasmacytoid leukaemias
4. Prognosis is poor and therapeutical approaches should be based on schemes for poor risk ALL and/or high grade lymphoma.

References

1. Chan JKC, Wong KF, Jaffe ES, Ralfkiaer E. Aggressive NK-cell leukaemia. In: WHO classification of tumours of haemopoietic and lymphoid tissues. Ed: E.S. Jaffe, N.L. Harris, H. Stein, J.W. Vardiman. Lyon: IARC Press, 2001; p. 198-200.
2. Matutes E. Clinical and morphological features of natural killer (NK) leukaemias. *Haematologica*, 2004 (in press).
3. Foucar K, Matutes E, Catovsky D. T-cell large granular lymphocytic leukemia, T-cell prolymphocytic leukemia and aggressive Natural killer cell leukemia. En: Mauch PM, Armitage JO, Coiffier B, Dalla-Favera D, Harris NL, editors. *Non-Hodgkin's lymphomas*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins., 2004; pp. 283-94.
4. Mori KL, Egashira M, Oshimi K. Differentiation stage of natural killer cell lineage lymphoproliferative disorders based on phenotypic analysis. *Br J Haematol* 2001;115:225-8.
5. Feuillard J, Jacob MC, Valensi F, Maynadie M, Gressin R, Chaperot L, et al. Clinical and biological features of CD4+ CD56+ malignancies. *Blood*, 2000;99:1556-63.
6. Suzuki R, Suzumiya J, Nakamura S, Aoki S, Notoya A, Ozaki S, et al. Aggressive natural killer cell leukaemia revisited: large granular lymphocyte leukaemia of cytotoxic NK cells. *Leukemia* 2004;18:763-70.

LINFOMA BLÁSTICO DE CÉLULAS NK

R. LÓPEZ¹, M. SUBIRÀ¹, F. SANT²,
J. BADAL² Y R. SALINAS¹

¹Servicio de Hematología y Hemoterapia. ²Servicio de Anatomía Patológica. Althaia. Xarxa assistencial de Manresa. Barcelona.

Historia clínica

Se trata de un varón de 72 años de edad que acude a la consulta de dermatología en enero de 2001 por lesiones pruriginosas en el tronco. La primera lesión la observó 6 meses antes de la primera visita y desde entonces las lesiones habían ido en aumento en número y tamaño de manera progresiva. No refería síntomas constitucionales ni síndrome tóxico. En los antecedentes personales no existían alergias medicamentosas conocidas ni hábitos tóxicos actuales aunque había sido fumador importante y bebedor moderado. Como antecedentes patológicos destacaban intervención de prótesis de cadera, intervención de cataratas, apendicectomía, laringectomía por neoplasia de laringe y posterior radioterapia en 1990.

Exploración física

El paciente presentaba numerosas lesiones cutáneas papulonodulares en tronco, de color violáceo, sin ulceración superficial ni adhesión a planos profundos, de unos 5 cm de diámetro (fig. 1). La auscultación cardiorrespiratoria era normal y no presentaba ni adenopatías ni visceromegalias.

Pruebas complementarias

Hemograma: hemoglobina 144 g/l, plaquetas $164 \times 10^9/l$, leucocitos $4,71 \times 10^9/l$ con 18% de células de aspecto blástico, 62% segmentados, 10% linfocitos, 8% monocitos, 2% eosinófilos, velocidad de sedimentación globular, 11. Hemostasia: normal.

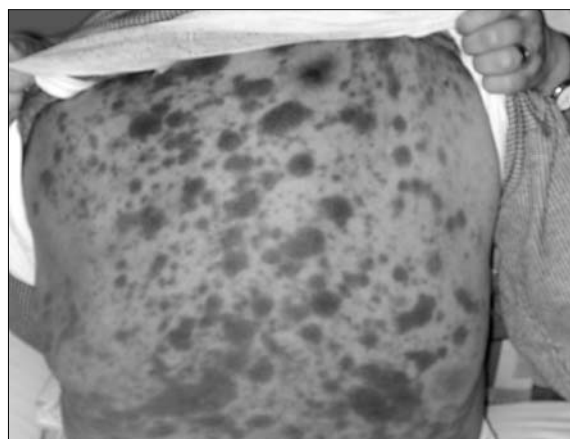


Figura 1. Afectación cutánea extensa.

Bioquímica: iones, función renal, enzimas hepáticas, lactato deshidrogenasa y proteinograma normal, albúmina 35,6 mg/l, β_2 -microglobulina 3,4 mg/l (1,00-2,10).

Serología viral frente a hepatitis B, C y virus de la inmunodeficiencia humana: negativas

Biopsia cutánea: infiltración celular atípica de carácter linfóide afectando a la dermis superficial y profunda. Células de tamaño mediano-grande con escaso citoplasma, núcleos de tamaño mediano-grande e irregulares, de cromatina fina y dispersa y nucléolos poco evidentes (fig. 2). La inmunohistoquímica mostraba positividad para CD4, CD56, CD43, CD45RA (débil), y negatividad para CD20, CD79a, CD3, CD5, CD45RO, Tdt, mieloperoxidasa, CD57. El antígeno CD68 y gránulos TIA-1 eran positivos en algún elemento. El reordenamiento del receptor de células T no fue concluyente. El estudio molecular para virus de Epstein-Barr fue negativo.

Mielograma: infiltración homogénea por un 70% de células atípicas de tamaño mediano y núcleo irregular, escaso citoplasma, cromatina inmadura y nucléolo poco evidente.

Inmunofenotipo de médula ósea: población anómala CD4/CD56 positiva (CD3-, CD4+, CD2-, CD5-, CD7-, CD8-, TCR- (alfa-beta y gamma-delta), CD56+, CD19-, CD79a-, MPO-, CD13-, CD14-, CD117-, CD34-, HLA-DR débil coexpresado con CD4).

Biopsia de médula ósea: infiltración intersticial por células de características previamente descritas en el mielograma (fig. 3).

Tomografía computarizada (TC) toracoabdominal: estudio artefactado por objetos metálicos (prótesis de cadera). Adenopatías superiores a 1 cm en la práctica totalidad de los espacios mediastínicos. Afectación de base pulmonar izquierda probablemente relacionada con la existencia de bronquiectasias. No se observa derrame pleural. Hígado, sistema biliar, páncreas, bazo, suprarrenales y riñones sin hallazgos. No se observan adenopatías abdominopélvicas de tamaños significativos. Atrofia de músculo psoas derecho.

Diagnóstico

En febrero del 2001 se diagnosticó de linfoma cutáneo CD4+/CD56+ en estadio IV-A por afectación de médula ósea y sangre periférica, con presencia de adenopatías mediastínicas

Tratamiento y evolución

El paciente inició en marzo del 2001 tratamiento poliquimioterápico tipo CHOP (ciclofosfamida, adriamicina, vincristina, prednisona) con aceptable tolerancia. En agosto del mismo año se realizó la evaluación de la enfermedad tras 6 ciclos de tratamiento. La superficie cutánea presentaba manchas de coloración pardo-negruzca, de aspecto atrófico. La biopsia cutánea no detectó células atípicas. La biopsia de

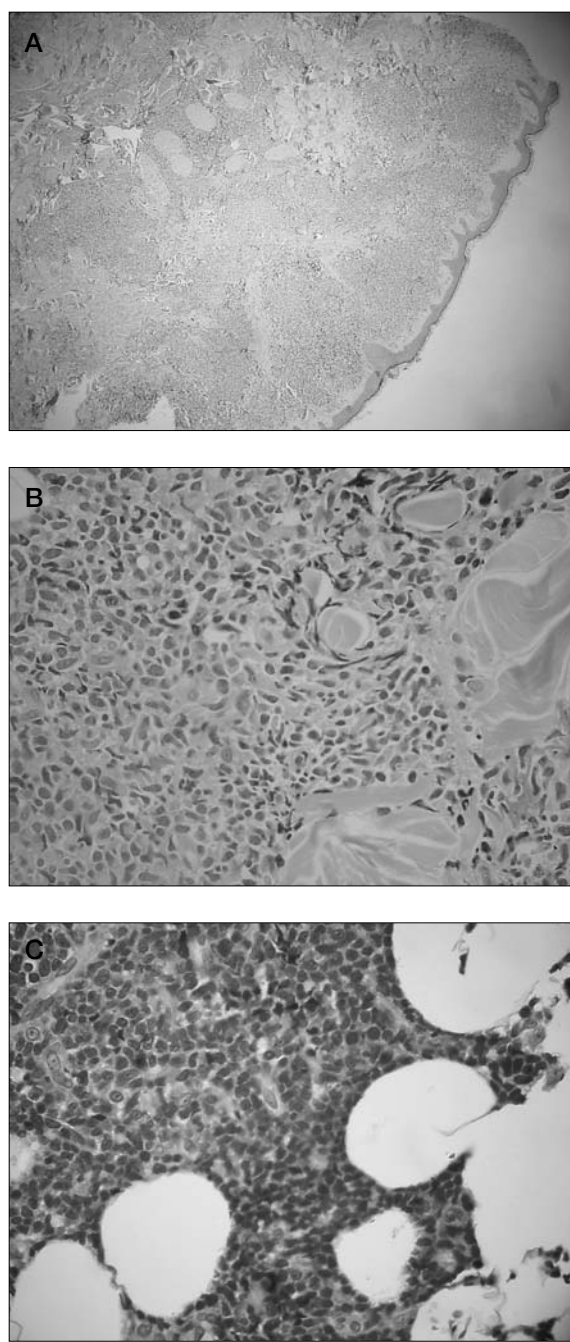


Figura 2. Punch cutáneo. (A) Infiltración de dermis superficial y profunda por celularidad de carácter linfóide (hematoxilina-eosina $\times 100$). (B) Infiltración dérmica por celularidad de aspecto linfóide, tamaño mediano-grande, núcleo irregular sin nucléolo evidente (hematoxilina-eosina, $\times 400$). (C) Infiltración del tejido adiposo hipodérmico (hematoxilina-eosina, $\times 400$).

médula ósea y el mielograma no mostraron infiltración por linfoma. En el inmunofenotipo de médula ósea evidenció una subpoblación de los linfocitos (que representaban el 4% de la celularidad total) de fenotipo patológico idéntico al del diagnóstico. En la

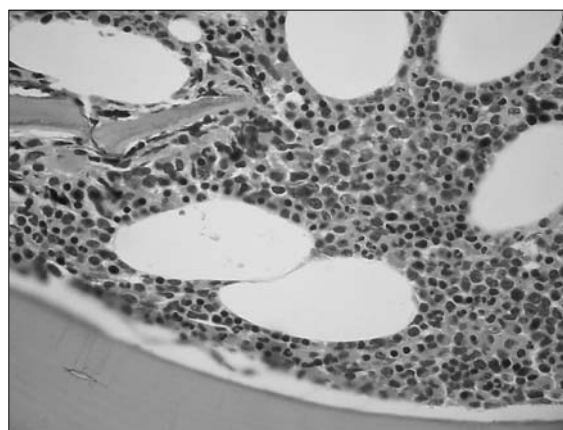


Figura 3. Biopsia de médula ósea: infiltración intersticial por células de aspecto blástico. (Hematoxilina-eosina, $\times 200$.)

TC toracoabdominal no se apreciaron adenopatías significativas. Se consideró remisión completa con enfermedad mínima residual detectable y se suspendió el tratamiento. En abril de 2002 el paciente presentó una reaparición de lesiones papulo-nodulares cutáneas de aspecto similar a las del diagnóstico. En la sangre periférica se halló un 3% de células patológicas y en la médula ósea se objetivó una infiltración por un 40% de células de aspecto inmaduro similares a las del diagnóstico. El estudio inmunofenotípico fue idéntico al del diagnóstico y la citogenética mostró un cariotipo normal. En la TC se observaron múltiples adenopatías mediastínicas y axilares bilaterales, hígado y bazo homogéneos, pequeñas adenopatías retroperitoneales y adenopatías inguinales. Se inició tratamiento de nuevo con ciclofosfamida, vincristina, daunorrubicina liposomal y prednisona recibiendo un total de 6 ciclos alcanzando una respuesta parcial. En enero de 2003 se detectó una progresión de las lesiones cutáneas y a las pocas semanas el paciente ingresó por presentar un síndrome febril de 48 h de evolución acompañado de tos y obnubilación. En la exploración física se observaron múltiples lesiones papulares violáceas diseminadas por toda la superficie cutánea, la auscultación cardiorrespiratoria fue normal y no se palpaban adenopatías ni visceromegalias. En la analítica del ingreso presentaba una pancitopenia grave con: hemoglobina 79 g/l, plaquetas $50 \times 10^9/l$ y leucocitos $1.02 \times 10^9/l$. Se inició tratamiento con antibióticos de amplio espectro, oxígeno y otras medidas de soporte pero a las pocas horas del ingreso presentó un cuadro de insuficiencia respiratoria aguda con intensa agitación. No se consideró al paciente candidato a medidas intensivas debido al mal pronóstico de la enfermedad de base, refractaria al tratamiento, y falleció a las pocas horas.

Discusión

Esta entidad se clasifica según la Organización Mundial de la Salud (OMS)¹ como linfoma blástico

de células *natural killer* (NK). La morfología corresponde a células inmaduras de aspecto linfoide en las que el origen celular se supone NK. Afecta predominantemente a personas de edad avanzada, aunque puede afectar a cualquier década de la vida, con cierta predominancia por el sexo masculino. La afectación extranodal es la norma, principalmente en la piel de forma extensa, pero frecuentemente se presenta de forma diseminada con afectación de los ganglios linfáticos, la médula ósea y la sangre periférica, ya desde su diagnóstico o en su evolución temprana. A pesar de ello no suelen presentar síntomas constitucionales. La afectación cutánea puede presentarse en forma de placas, pápulas o nódulos subcutáneos, y estas lesiones pueden ser eritematosas, hiperpigmentadas o violáceas. Las formas localizadas cutáneas son poco frecuentes. Se han descrito otras afectaciones extra-nodales que pueden localizarse en el pulmón, riñón, músculo, hueso, tracto genito-urinario o sistema nervioso central². En los estudios analíticos se suelen observar citopenias por infiltración medular. En la histología de la lesión cutánea o del ganglio linfático cabe destacar una infiltración por células de aspecto blástico de tamaño variable, con citoplasma escaso y agranular. En la piel la afectación se localiza en la dermis y en los ganglios linfáticos en las áreas T. El inmunofenotipo característico es positivo para CD56 y CD4, y negativo para CD3 de superficie, CD19, MPO, CD33 y CD13. Habitualmente el reordenamiento del gen TCR es negativo. No presenta asociación con el virus de Epstein-Barr. El cariotipo puede ser normal o presentar alteraciones complejas, hasta ahora no se ha descrito una alteración específica^{1,2}.

El curso de la enfermedad es agresivo y aunque puede responder inicialmente al tratamiento, las recaídas son frecuentes y tempranas con pobre res-

puesta a las subsiguientes terapias. Se han intentado diversos enfoques terapéuticos, desde esquemas similares o próximos a los de los linfomas no hodgkinianos, a tratamientos de leucemia aguda e incluso trasplante alogénico que parece ser hasta el momento actual la única opción curativa. En la serie de Feuillard et al³ la mediana de la supervivencia libre de progresión fue de 9 meses (rango, 3-18 meses), la supervivencia estimada a un año del 52% y la estimada a 2 años tan solo del 25%. Las formas localizadas cutáneas tienen mejor pronóstico.

Recordar que:

1. El inmunofenotipo característico del linfoma blástico NK es positivo para CD56 y CD4, y negativo para CD3 de superficie, CD19, MPO, CD33, CD13. El reordenamiento del gen del TCR habitualmente es negativo.

2. La afectación inicial es principalmente cutánea pero se disemina rápidamente hacia los ganglios linfáticos, la médula ósea y la sangre periférica.

3. Esta entidad presenta respuesta transitoria a los tratamientos utilizados hasta el momento y el trasplante alogénico podría ser la única opción curativa, por lo que en pacientes de edad avanzada debería plantearse el trasplante alogénico con acondicionamientos no mieloablativos.

Bibliografía

1. Chan JKC, Jaffe ES, Ralfkiaer E. Blastic NK-cell lymphoma. WHO classification. Tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon 2001.
2. Jacob M, Chaperot L, Mossuz P et al. CD4+/CD56+ lineage negative malignancies: a new entity developed from malignant early plasmacytoid dendritic cells. *Haematologica* 2003;88:941-55.
3. Feuillard J, Jacob M, Valensi F, et al. Clinical and biological features CD4+/CD56+ malignancies. *Blood* 2002;99:1556-63.

AVANCES EN EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LA LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA

COORDINADOR: F. BOSCH. *Barcelona*

FACTORES PRONÓSTICOS EN LA LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA

E. MONTSERRAT

*Instituto de Hematología y Oncología.
Departamento de Hematología. Hospital Clínic. IDIBAPS.
Universidad de Barcelona. Barcelona.*

El pronóstico de los enfermos con leucemia linfática crónica (LLC) es sumamente variable. En la actualidad, la mediana de supervivencia global es de unos 10 años, pero junto a enfermos cuya esperanza de vida no se ve acortada por la enfermedad, hay otros en los que la leucemia se muestra muy agresiva y fallecen a los pocos meses de haberse diagnosticado.

Durante más de dos décadas, la herramienta fundamental para establecer el pronóstico de los enfermos con LLC ha sido los estadios clínicos de Rai et al¹ y Binet et al². Si bien los estadios clínicos, al permitir aislar grupos de enfermos con pronóstico distinto, han contribuido notablemente al progreso en el estudio de la LLC y su tratamiento, las limitaciones de los estadios clínicos se hicieron pronto evidentes. Así, los estadios clínicos no permiten diferenciar los casos que van a permanecer estables durante años y aquellos otros en los que la leucemia va a mostrar un curso rápidamente agresivo. Por otro lado, el origen de las citopenias (infiltración medular, agresión autoinmune, hiperesplenismo) no se tiene en cuenta a la hora de clasificar a un enfermo en estadio avanzado; sin embargo, el pronóstico de las formas en las que la citopenia no se debe a la existencia de una médula ósea intensamente infiltrada por linfocitos es bastante mejor que la de aquellos en los que éste sí es el mecanismo de la citopenia³. Además, la mayoría de enfermos con LLC se diagnostican en la actualidad de forma accidental, en fase asintomática, y, por ello, en estadio precoz; ello invalida el valor pronóstico de los estadios clínicos. Finalmente, los estadios clínicos no hacen más que reflejar la heterogeneidad biológica de la enfermedad⁴.

Tras unos años en los que el valor pronóstico de los estadios clínicos ha intentado complementarse mediante otros parámetros (p. ej., grado de infiltración de la médula ósea, proporción de células linfoides atípicas en sangre periférica, tiempo de duplicación linfocitario), los parámetros biológicos han ido cobrando una importancia cada vez mayor en la valoración pronóstica de los pacientes con LLC. Así pues, una serie de marcadores serológicos (p. ej., β_2 -microglobulina sérica, CD23 libre en suero) poseen cierta importancia pronóstica^{4,5}. De mayor utilidad son las alteraciones citogenéticas detectadas por hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH). Los pacientes con del(13q) como única alteración tienen un excelente pronóstico, mientras que aquellos con alteraciones complejas, del(11q) o del(17p) tienen muy mal pronóstico. Es importante resaltar que el valor predictivo de las alteraciones citogenéticas es independiente de los estadios clínicos⁶.

Un importante avance en el conocimiento de la biología de la LLC fue el descubrimiento de que, en contra de la idea sostenida durante años, aproximadamente la mitad de los pacientes con esta forma de leucemia presentan mutaciones de los genes *IgVH* y que el estado mutacional de los genes *IgVH* tiene, per se, un gran valor pronóstico. Así, los enfermos con mutaciones de *IgVH* (LLC mutada) suelen tener una enfermedad poco avanzada, de curso benigno, sin otros factores pronósticos negativos, no suelen requerir tratamiento y presentan una supervivencia muy prolongada. Por el contrario, los pacientes en los que los genes *IgVH* no están mutados (LLC no mutada) suelen presentar enfermedad avanzada, sintomática, con otros factores pronósticos desfavorables y su esperanza de vida es corta^{7,8}.

Por desgracia todavía no es posible estudiar las mutaciones de *IgVH* de forma rutinaria: la técnica es compleja, precisa de equipamiento especial, requiere tiempo y es costosa. Por ello, se han efectuado numerosos estudios encaminados a encontrar un parámetro fácil de estudiar y que se correlacionase con las mutaciones de *IgVH*. La expresión de CD38 en las células neoplásicas mantie-

ne cierto grado de correlación con las mutaciones de IgVH, de tal forma que en las formas no mutadas la expresión de CD38 tiene a ser alta (> 30%). Sin embargo, la correlación no es muy estrecha y la expresión de CD38 puede variar a lo largo del tiempo. Estudios mediante microarrays pusieron de manifiesto que las formas mutadas y no mutadas de LLC expresan básicamente los mismos genes, pero que la expresión de unos pocos genes, y particularmente de ZAP-70, permitía distinguir las formas mutadas (con baja expresión de ZAP-70) de las no mutadas (con marcada expresión de ZAP-70)⁹. La puesta a punto de una técnica citofluorométrica para estudiar la expresión de ZAP-70 ha supuesto un notable avance en la valoración pronóstica de la LLC y este marcador, que debiera de incluirse en la rutina de estudio de todos los enfermos con LLC, ofrece importante información pronóstica que complementa aquella aportada por los estadios clínicos^{10,11}.

Por último, los factores pronósticos de los tumores pueden variar a lo largo del tiempo, cuando su tratamiento se vuelve más eficaz. La mayoría de los factores pronósticos clásicos en la LLC fueron identificados en una época en la que el tratamiento de esa enfermedad era muy poco eficaz. Es por ello verosímil que muchos de aquellos factores pronósticos no sean importantes en los pacientes tratados con quimioterapias basadas en los análogos de las purinas y anticuerpos monoclonales. Por tanto, identificar los actuales factores pronósticos en la LLC –más de 25 años después de la introducción de los estadios clínicos– y cuando la terapia de esa enfermedad era ineficaz– es una tarea necesaria y urgente.

Bibliografía

- Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975; 46:219-34.
- Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguat H, Goasguen, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981;48:198-206.
- Mauro FR, Foa R, Cerretti R, Giannarelli D, Coluzzi S, Mandelli F, et al. Autoimmune hemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia: Clinical, therapeutic, and prognostic features. *Blood* 2000;95:2786-92.
- Montserrat E. Classical and new prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia: where to now? *Hematol J* 2002;3:7-9.
- Molica S. Prognostic value of biological variables in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Can we improve upon clinical parameters? *Haematologica* 1997;82:705-9.
- Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000;343:1910-6.
- Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1840-7.
- Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1848-54.
- Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukaemia. *J Exp Med* 2001;194:1639-47.
- Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2003; 348:1764-75.
- Orchad JA, Ibbotson E, Davis Z, Wiestner A, Rosenwald A, Thomas PW, et al. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 2004;363:105-11.

TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS EN LA LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA

D. CABALLERO, M.^aV. MATEOS Y M. GONZÁLEZ DÍAZ
Servicio de Hematología. Hospital Universitario de Salamanca.
Salamanca.

Introducción

La leucemia linfática crónica-B (LLC-B) es la leucemia más frecuente en los países occidentales. Lo habitual es que la LLC-B se diagnostique en un análisis de rutina; según la descripción hecha por Rai¹, al diagnóstico suele ser un paciente asintomático, en la edad media de la vida, casi finalizando su vida laboral, dispuesto a iniciar un nuevo período y a disfrutar de su tiempo libre; el médico le explicará que tiene una enfermedad enigmática con un curso muy variado de unos pacientes a otros; le dirá que podrá vivir décadas con su enfermedad y morir de otra causa o por el contrario, comenzar con complicaciones debidas a la enfermedad al poco del diagnóstico, necesitando diferentes tratamientos para al final sucumbir de la misma.

La dificultad para predecir el camino que el paciente seguirá representa un dilema tanto para el médico como para el paciente. Desde hace tres décadas, el manejo de los pacientes con LLC-B se ha basado en los sistemas de estadiaje de Rai¹ y Binet que han sido capaces de clasificar a los enfermos en grupos pronósticos, pero no de predecir el curso de la enfermedad de una forma individual.

Durante la última década los avances en el conocimiento de la biología de la LLC-B han cambiado el concepto de enfermedad homogénea de larga supervivencia a considerarla como una enfermedad con un pronóstico bien diferente dependiendo de factores biológicos y genéticos de las células leucémicas. Así, basado en estos estudios, sabemos que la ausencia de mutaciones somáticas en la región variable de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas, la elevada expresión en la membrana del antígeno CD38 o de la proteína ZAP-70 o la presencia de alteraciones citogenéticas como la delección del 11q– y especialmente del 17p– indican un pronóstico adverso^{1,2}.

Aunque la mediana de aparición de la LLC-B son los 65 años y es considerada una enfermedad de “edad avanzada”, el 30% de los pacientes tienen menos de 60 años y 10-15% de los pacientes son menores de 50 años^{3,4}. A pesar de que los pacientes jóvenes y viejos tienen una probabilidad de supervivencia de 10 años, la causa de muerte es diferente y así mientras que los pacientes mayores fallecen de causas diferentes a la LLC-B, la probabilidad de fallecer debido a la LLC-B es mayor en los pacientes jóvenes⁴.

Así pues, aunque la LLC-B se sigue considerando una enfermedad incurable, es lícito plantear en los

Tabla 1. Trasplante autólogo convencional en LLC-B

Autor	Tipo de estudio	N.º de pacientes	MRT	SG 4a	SLE 4a	Plateau	Factores pronósticos favorables
Dreger et al ⁶	Retrospectivo EBMT	370	10%	69%	n.a.	No	RC al trasplante No refr. a fludarabina < 36 meses desde el diagnóstico al trasplante
Montserrat et al ¹¹	Retrospectivo International Projet	124	6% (día +100)	65%	37%	No	RC al trasplante
Dreger et al ¹³	Prospectivo Grupo de Kiel	77	4%	94%	69%	No	< 50 × 10 ⁹ /l VDJH mutada
GCLC et al ¹⁴	Prospectivo Multicéntrico	105	5%	No alcanzada	No alcanzada	No	RC al trasplante No 11q-
Krackhardt et al ¹⁰	Prospectivo	137	9%	Mediana de seguimiento 9,5 años		-	
Milligan et al ²⁴	Prospectivo	94*	1,5% (día +100)	77% (5 años)	51%	No	No enfermedad molecular postrasplante

*115 pacientes; de ellos, 94 respondieron a fludarabina.

LLC-B: leucemia linfática crónica-B; SG: supervivencia global; SLE: supervivencia libre de enfermedad; EBMT: European Bone Marrow Transplant; MRT: mortalidad relacionada con el trasplante; RC: remisión completa; VDJH: ?????.

pacientes jóvenes terapias intensivas como son el trasplante autólogo y el trasplante alogénico puesto que aún basándose sólo en criterios clínicos la esperanza de vida para pacientes diagnosticados o que progresan a estadio C no excede los 3 años; sin embargo, la avanzada edad de los pacientes con LLC-B junto a la ausencia de fármacos que erradiquen la infiltración de la médula ósea ha hecho que hasta hace pocos años un escaso número de pacientes con LLC-B fueran sometidos a trasplante alogénico o autólogo; sin embargo, la actividad trasplantadora en los últimos años según datos del European Bone Marrow Transplant (EBMT) muestra un claro aumento en el número de trasplantes en esta enfermedad tanto en cuanto al trasplante autólogo como al alogénico.

A continuación revisaremos los resultados y el posible papel del trasplante autólogo y alogénico en el enfermo con LLC-B.

Trasplante autólogo

¿Puede el trasplante autólogo curar la enfermedad?

Es la pregunta fundamental. Para que una estrategia terapéutica sea curativa es necesario que sea capaz de inducir una remisión completa (RC), es decir, conseguir la eliminación de las células tumorales de la médula ósea, tejidos periféricos y mantener dicha remisión. En este sentido, el primer problema que se plantea en el contexto de la LLC-B es a qué llamamos RC; los criterios más empleados para definir la mis-

ma son los criterios de Cheson et al⁵, según los cuales, en la mejor de las situaciones, es decir, en lo que se denomina RC, se permite la persistencia en la médula ósea de hasta un 29% de linfocitos; así pues, cuando la respuesta al trasplante autólogo se evalúe con estos criterios, muchos, si no todos los pacientes que luego se interpretan como recaídas, probablemente nunca han conseguido una erradicación de la enfermedad en el momento de máxima respuesta. Parece obvio que cuando se le aplica al paciente con LLC-B, una terapia con fines curativos, se le deba reevaluar, como sucede en los linfomas o en las leucemias agudas, con las técnicas más sensibles de que dispongamos (tomografía computarizada [TC], tomografía por emisión de positrones [PET], estudios de enfermedad mínima residual [EMR] por citometría de flujo [CMF] y/o biología molecular).

Aunque los primeros estudios indicaban que la LLC-B podía curarse con trasplante autólogo, los estudios posteriores muestran que los pacientes continúan recayendo sin una evidencia de *plateau* en las curvas de supervivencia libre de enfermedad señalando la incapacidad de las altas dosis por sí solas de erradicar el clon leucémico⁶⁻¹³. En la tabla 1 se reseñan las series publicadas que incluyen un mayor número de enfermos; como se puede observar en la misma, aunque la tasa de mortalidad es aceptable y comparable a la de otros pacientes sometidos a trasplante autólogo por una enfermedad hematológica (4-10%) y la supervivencia global (SG) a los 2 años está por encima del 65%, no hay evidencia de *plateau*

en las curvas de supervivencia, evidenciándose una continua recaída⁶⁻¹². Una de las primeras series publicadas que incluía un gran número de pacientes fue la publicada por Krackhardt et al¹⁰ del Dana-Farber C.I con 154 pacientes; la mortalidad fue baja, del 4 %, estando 132 pacientes en RC mantenida con una supervivencia libre de evento del 65 %; estos prometedores resultados no han sido, sin embargo, confirmados en publicaciones posteriores.

En cuanto a la capacidad de las altas dosis de quimiorradioterapia de conseguir la erradicación de la enfermedad determinada por técnicas sensibles, los resultados son contradictorios. En general, los estudios publicados señalan la persistencia de la enfermedad en un buen número de pacientes. Así el grupo de Kiel analiza mediante oligonucleótidos específicos de alelo-reacción en cadena de la polimerasa (ASO-PCR) con *primers* CDR3 específicos la presencia de EMR en 35 pacientes con LLC-B de mal pronóstico que reciben un trasplante autólogo con células sometidas a *purging in vitro* con anticuerpos monoclonales (AcMo) estando los pacientes en fase precoz¹³. Pues bien, en el 80 % de los pacientes analizados (28 de 35), se detectaba enfermedad por dicha técnica. Los autores no indican la capacidad de predecir la recaída en base a la persistencia o no de EMR, sin embargo sí señalan como la técnica empleada (ASO-PCR) fue más sensible que la PCR utilizando cebadores consenso o la detección por citometría multiparamétrica de células CD5/CD19. Es importante recordar que las técnicas de EMR deben ser sensibles pero sobre todo deben ser capaces de predecir la recaída clínica y si son demasiado sensibles esto no sucede¹⁴. A diferencia del grupo de Kiel, Meloni et al¹⁵ comunican que de 20 pacientes en primera o segunda RC tras fludarabina +/- otros fármacos, la mayoría (79 %) alcanzaron remisión molecular postrasplante. De los pacientes PCR negativos, 12, con una mediana de 17 meses continúan siendo negativos, mientras que los tres que se repositivizan y dos de los cuatro que no habían negativizado, han recaído. De los estudios de enfermedad mínima residual se podría concluir que, aunque la LLC B no sea curable con trasplante autólogo, sí es posible conseguir eliminar la EMR determinada por las técnicas habituales, sobre todo si los pacientes van en RC al trasplante¹⁵. Además en este estudio la negativización en la mayoría de los pacientes podría justificarse porque la técnica molecular empleada (PCR con cebadores consenso) es menos sensible (10^{-3}) que la ASO-PCR (10^{-5} - 10^{-6}) o la CMF multiparamétrica (1.5×10^{-5}). En cuanto a la técnica a elegir, probablemente la más sencilla y asequible a todos los laboratorios y con una sensibilidad suficiente sea la CMF¹⁶.

Si consideramos beneficiosa la obtención de una "buena remisión" tras el trasplante¹⁴⁻¹⁶ es lógico plantear la posible utilidad de la limpieza del producto a infundir en el trasplante autólogo ya sea mediante selección positiva o negativa con AcMo.

Ambos métodos producen una reducción de 1 o 2 logaritmos en la contaminación del producto a infundir, sin embargo, el posible beneficio sólo se ha observado en la experiencia de un centro¹⁷. La crítica que siempre se ha hecho a los defensores del *purging* es que probablemente las recaídas sean debidas a la enfermedad residual que queda en el paciente y no en la del producto a infundir. Por otra parte, es importante resaltar que de acuerdo al análisis de factores pronósticos llevados a cabo en los estudios del EBMT y del Internacional Project^{6,11} el estar en RC clínica al trasplante influye favorablemente en la evolución postrasplante; por tanto, el primer paso para que el paciente con LLC-B pueda beneficiarse de un trasplante autólogo sería conseguir que el enfermo llegue a trasplante en un estado no de enfermedad visible sino de enfermedad mínima residual. Quizá la potencial utilidad del *purging in vitro* se vea superada por la utilización *in vivo* de AcMo como el Campath I (anti-CD52)¹⁸⁻²⁰ o el anti-CD20 (rituximab)²¹ que permitirían ir al autotrasplante, con enfermedad visible sólo por técnicas de EMR.

¿Tiene el trasplante autólogo impacto en la supervivencia?

Hasta aquí hemos dicho que el trasplante autólogo produce un elevado porcentaje de respuestas pero que la enfermedad recae en la mayoría de los pacientes, ¿podría sin embargo tener un impacto beneficioso en la supervivencia como sucede en otras hemopatías como el mieloma múltiple? Aunque no tenemos estudios prospectivos que ayuden a contestar esta pregunta y la comparación con series históricas es difícil debido a la ausencia de homogeneidad en los criterios de inclusión al trasplante y el diferente pronóstico de los pacientes, una publicación reciente del grupo alemán apunta a una ventaja en la supervivencia de pacientes sometidos a trasplante frente a aquellos que reciben tratamiento convencional. Dreger et al²² analizan los resultados del estudio comparativo entre 66 pacientes que recibieron trasplante autólogo como parte de la terapia de primera línea en un estudio prospectivo frente a un grupo de 291 enfermos que habían recibido tratamiento convencional. De estos grupos seleccionan 44 pacientes en cada uno con similares características y con una mediana de seguimiento de 70 y 86 meses, respectivamente; pues bien, los pacientes sometidos a trasplante autólogo como parte de la terapia de primera línea tenían significativamente una mayor supervivencia que los enfermos que habían recibido terapia convencional (no alcanzada en la rama del trasplante y 119 meses en la de la terapia convencional) ($p = 0,03$). Además, el tiempo para requerir un nuevo tratamiento fue significativamente mayor para los pacientes que habían recibido trasplante (90 frente a 15 meses; $p < 0,001$). En el análisis multivariante, el trasplante predice mejor supervivencia mientras que la presencia de 11q- y el estadio clínico son factores

desfavorables en los 2 grupos de pacientes. El beneficio en la supervivencia se mantuvo también cuando el análisis quedó restringido a los 58 pacientes en los que la célula tumoral era “no mutada” (mediana de supervivencia de 139 meses frente a 73 meses; $p < 0,2$), a pesar de que, como ya había sido publicado previamente por estos autores²³ estos enfermos con LLC “no mutada” muestren un tiempo a la recaída clínica y molecular significativamente más corto que el grupo de pacientes con mutación de VDJ (a 2 años 19 frente a 0%). Por tanto, aunque la ausencia de mutaciones continúa siendo un factor pronóstico desfavorable tras el trasplante autólogo, estos pacientes también parecen beneficiarse del mismo. Sin embargo, la coexistencia de LLC-B no mutada y de la presencia de 11q- predice baja posibilidad de remisión tras trasplante autólogo, sugiriendo los autores que en esta situación deben plantearse otras estrategias.

Finalmente comentar el estudio prospectivo del grupo inglés que en breve será publicado²⁴ en el que se analiza en un grupo de 117 pacientes la eficacia inicial a la fludarabina y del trasplante autólogo. La respuesta a la fludarabina fue del 82% (RC, 24/65, 37%); de los 94 pacientes que respondieron, llegando al trasplante 65 pacientes. De ellos, 48 (74%) alcanzan RC. La SG y supervivencia libre de enfermedad (SLE) a los 5 años es del 77 y 51%. Además de los 20 pacientes en los que se hizo un seguimiento de la enfermedad residual por PCR, 16 alcanzaron RC en los 6 meses postrasplante siendo la presencia de enfermedad a nivel molecular un factor que claramente predice la recaída. Estos resultados apuntan pues, también a una mejora en la SG del trasplante autólogo, sin embargo, los autores advierten de la aparición de un síndrome mielodisplásico (SMD) en un 8% de los pacientes.

Movilización de células progenitoras y régimen de acondicionamiento

Diversos trabajos indican que la obtención de precursores hematopoyéticos para realizar un autotrasplante es complicada en pacientes que han recibido alquilantes y/o fludarabina¹⁴. Así pues, en el estudio comentado anteriormente²⁴, se intentó la movilización en 88 pacientes de los 114 evaluables y se consiguió en 59 (67%). En cuanto a los factores que influyen en el éxito de movilización tras fludarabina, según datos del EBMT en 29 pacientes, el haber recibido más de 6 ciclos o iniciar la movilización antes de 2 meses del último ciclo son factores desfavorables²⁵. Cuando los pacientes reciben fludarabina y ciclofosfamida la movilización parece ser peor y así en el estudio de Tournilhac et al²⁶ de 38 pacientes que habían recibido factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) como agente movilizador, sólo en 12 se consiguió un número suficiente de células progenitoras. Quizás en pacientes con pocas posibilidades de ser movilizados deban

recibir otros esquemas. Así recientemente se ha comunicado que las dosis intermedias de arabinósido de citocina consiguieron obtener un número suficiente de células progenitoras en pacientes que habían recibido alemtuzumab y fludarabina y en los que falló la movilización tras G-CSF²⁷.

En cuanto al régimen de acondicionamiento un gran número de pacientes recibe radioterapia corporal total (RTCT) aunque no existe una verdadera justificación y con resultados discordantes; así mientras que en un estudio retrospectivo del EBMT⁶ la RTCT parece beneficiosa, este efecto no ha sido observado por el grupo internacional¹¹. Por último, comentar la advertencia en el uso de la RTCT hecha por Milligan et al²⁴ ya que en su serie, todos los pacientes que desarrollan SMD tras trasplante habían recibido RTCT. Otros estudios en linfoma (EBMT, GELTAMO) indican un mayor riesgo de SMD²⁸ y menos SG²⁹ en pacientes que reciben RTCT.

Trasplante alogénico en LLC-B

El pronóstico adverso de los pacientes con LLC-B en progresión (entre 2 y 6 años) que empeora aún más para los pacientes refractarios a la fludarabina (supervivencia media de un año)³⁰ junto a la falta de terapias alternativas (la infiltración de médula ósea en la mayoría de casos impide la realización de un trasplante autólogo) ha hecho que en los últimos años el número de pacientes sometidos a trasplante alogénico sea mayor^{7,8,12,31-36}. Como se indica en la tabla 2, donde se analizan las series más relevantes comunicadas, el trasplante alogénico se sigue de una mayor mortalidad que el trasplante autólogo (30-50%) pero a diferencia de éste, se observa *plateau* en las curvas (con un 20-55% de los pacientes que permanecen en RC mantenida. Estos datos sugieren un efecto beneficioso del injerto contra leucemia (ICL) de las células alogénicas, que no puede achacarse al régimen de acondicionamiento dado que en general es similar al empleado en el trasplante autólogo. Así pues, el beneficio adicional del trasplante alogénico se debería al ICL que se ha puesto de manifiesto por la respuestas observadas tanto por la infusión de linfocitos del donante (ILD) como por la retirada de la inmunosupresión y/o de la aparición de enfermedad injerto contra huésped (EICH)^{37,38}. Este procedimiento es capaz de producir remisiones prolongadas en pacientes trasplantados con enfermedad avanzada y así, según los datos del MD Anderson, en una serie de 28 pacientes con enfermedad avanzada y muy tratada, el síndrome linfoproliferativo (SLP) a los 5 años es del 78% para los pacientes quimiosensibles y del 26% para los refractarios en el momento del trasplante³⁴. También Michallet et al³⁹ ha actualizado recientemente los datos del estudio del EBMT/IBMTR previamente publicados: la probabilidad de estar vivo y libre de enfermedad a los 10 años para este grupo de 54 pacientes con LLC-B, la mayoría (70%) qui-

Tabla 2. Trasplante alogénico convencional en LLC-B

	Tipo de estudio	N.º de pacientes	MRT	SG	Plateau
Esteve et al ¹²	Retrospectivo International Project	46	31 %	56 % (5 años)	Sí
Pavletic et al ³⁶	Único centro	38	30 %	62 % (2 años)	Sí
Rondon et al ³⁷	Registro solo donante No emparentado	23	39 %	51 % (2 años)	No seguimiento
Khoury et al ³⁴	Prospectivo Único centro	28		SLP 78 % (5 años)	Sí
Michallet et al ³⁹	Retrospectivo EBMT/IBMIR	41	50 %	41 % (10 años)	Sí

LLC-B: leucemia linfática crónica-B; MRT: mortalidad relacionada con el trasplante; SG: supervivencia global; SLP: síndrome linfoproliferativo.

miorrefractarios al trasplante, es de 41 y 37 %, respectivamente, lo que confirma la capacidad curativa de esta estrategia terapéutica. Sin embargo, la mortalidad para este grupo de pacientes jóvenes con LLC-B (mediana 41 años) es del 50 %, por lo que a pesar de su capacidad curativa, el trasplante alogénico debe demostrar la ventaja en cuanto a supervivencia frente a otras estrategias agresivas como puede ser el trasplante autólogo. En este sentido, una actualización del estudio retrospectivo del International Project Group comparando el trasplante autólogo y el alogénico (Montserrat et al¹¹, comunicación personal) muestra que mientras hasta los 5 años el grupo sometido a trasplante autólogo, debido a su menor mortalidad tóxica, presenta una mejor supervivencia, la supervivencia estimada a los 10 años es superior para los pacientes que recibieron un trasplante alogénico.

Ante la elevada mortalidad del trasplante alogénico debida principalmente a la EICH, una de las estrategias dirigidas a reducirla es la depleción de células T del injerto, ya sea con selección negativa de los linfocitos T o con selección positiva de las células progenitoras CD34⁺⁴⁰. Los resultados del trasplante alogénico deplecionado de células T son escasos. En un grupo de 26 pacientes con una mediana de edad de 46 años que recibieron un trasplante alogénico con depleción de células T (selección de CD34⁺ o elutriación en varios centros de nuestro país (datos no publicados), con una mediana de seguimiento de 38 meses, la mortalidad global es del 23 % y la de recaída del 11 %. La baja mortalidad observada por nosotros ha sido también comunicada por Gribben et al⁴¹ (16 % de mortalidad en un grupo de 25 pacientes quimiosensibles); sin embargo, en este estudio casi el 50 % de los pacientes recaen (12 de 25) aunque es interesante reseñar la eficacia de la ILD dado que 8 de los 12 son rescatados con este procedimiento. Los autores⁴¹ comparan los resultados en este grupo con 137 pacientes que recibe un trasplante autólogo, también todos quimiosensibles.

Con una mediana de seguimiento de 9,5 y 7,2 años para los pacientes de autólogo y alogénico, respectivamente, la mortalidad y la tasa de recaídas son similares (3, 16, 43, y 48 %, respectivamente).

En resumen, los datos de que disponemos en trasplante alogénico en la LLC-B sugiere que esta enfermedad incurable puede dejar de serlo gracias a este tratamiento, incluso cuando se trata de pacientes refractarios a la quimioterapia³² o con características biológicas de mal pronóstico como la ausencia de mutaciones somáticas⁴². Sin embargo, la elevada mortalidad asociada al procedimiento junto a la edad avanzada de los pacientes con LLC-B hace que el trasplante alogénico sea accesible sólo a un pequeño porcentaje de pacientes.

Trasplante con acondicionamiento de intensidad reducida (TIR)

La experiencia acumulada en otras enfermedades con trasplante utilizando acondicionamiento de intensidad reducida^{43,44} ha hecho que la LLC-B sea una de las enfermedades en las que dicha estrategia esté siendo explorada siempre en el contexto del área de investigación. No hay que olvidar que al tratarse de una neoplasia de crecimiento relativamente lento, la hace sobre todo atractiva para explorar áreas de trasplante en las que el efecto fundamental sea el ICL.

En la tabla 3 se muestran algunas de las series publicadas con TIR en la LLC-B⁴⁵⁻⁵⁰. Como se puede observar, comparándolo con la mortalidad de hasta el 50 % publicado tras trasplante alogénico con acondicionamiento convencional, la mortalidad global es inferior (15-25 %) y la SG está en torno al 70 % a los 2 años, con una supervivencia libre de evento por encima del 56 % en todas las series. Debemos destacar además que en general la edad es superior y así, mientras la edad media en la serie publicada por Michallet et al³⁹ era de 41 años o la del grupo retrospectivo español al que nos hemos referido anteriormente era de 46 años, la edad media de los pacientes que reciben un TIR está por encima de los 50 años.

A primera vista la eficacia del trasplante no mieloablato no parece inferior a la del trasplante alogénico con acondicionamiento mieloablato, evidenciando el efecto contra leucemia existente en esta enfermedad. Queda por demostrar si los pacientes de peor pronóstico como aquellos con alteraciones de p53(17 p-), que tienen una supervivencia de sólo 32 meses² o los que presentan delección del 11q y ausencia de mutaciones, que de acuerdo a los resultados de Ritgen et al²³ no se ven beneficiados por otras estrategias como el trasplante autólogo, pueden ser rescatados con este tratamiento. En este sentido, comentar brevemente que en un estudio llevado a cabo en 31 pacientes con LLC-B y edad media de 53 años que han recibido un trasplante alogénico con intensidad reducida en varios centros de nuestro país (datos no publicados). Con una mediana de seguimiento para la serie global de 36 meses (1-63), 7(22%) pacientes han fallecido de toxicidad y de entre los 24 restantes, en 21 se han realizado estudios biológicos que permiten seleccionar 16 pacientes con una o más características desfavorables: no mutaciones somáticas, 3 (19%), no mutaciones y 17p-, 1(6,3%), no mutaciones y 11q-, 2(12,5%), no mutaciones, CD38 elevado y 11q-, 1(6,3%), no mutaciones y CD38 elevado, 1 (6,3%), expresión de CD38 superior a 30%, 2 (12,5%), delección de 11q-, 3 (19%), cariotipo complejo, 1(6,3%), CD38 elevado y 17p-, 1(6,3%) y CD38 elevado y cariotipo complejo, 1(6,3%).

Aún aceptando el efecto alogénico curativo en la LLC-B quedan muchas preguntas que contestar, la primera de ellas es si el trasplante no mieloablato tiene realmente menos mortalidad. En este sentido, el estudio aun no publicado⁵¹ del grupo de Seattle en el que se comparan 73 pacientes sometidos a trasplante mieloablato (incluidas 12 LLC-B) con un grupo de 73 pacientes (11 LLC-B) que recibe un TIR (fludarabina + 200 cGy de RTCT) muestra que a pesar de la edad superior y la mayor comorbilidad del grupo que recibe un TIR, la mortalidad al día +100 y al año es significativamente menor en el grupo que recibe trasplante no mieloablato. Obviamente además de reducir la mortalidad, el trasplante no mieloablato tiene que ser igual de eficaz que el mieloablato en erradicar la enfermedad. En este sentido, recientemente en un estudio retrospectivo del EBMT que incluye 448 pacientes, 224 sometidos a trasplante mieloablato y 224 que reciben un acondicionamiento de intensidad reducida, éstos con una edad significativamente superior, Dreger et al⁵² han comunicado que en el análisis ajustado por edad, situación, etc., la tasa de recaída es similar en ambos, mientras que la mortalidad es inferior y la SG es superior para los pacientes que reciben un trasplante con acondicionamiento de intensidad reducida.

En cuanto a la elección del mejor régimen de acondicionamiento de intensidad reducida, todos ellos incluyen fludarabina y un alquilante como melfalán, busulfán, ciclofosfamida o RCTC, siendo el de menor

Tabla 3. Trasplante no mieloablato en la LLC-B

Autor	Tipo de estudio (n.º de pacientes)	Empleo/no empleo		EICH		REC		
		Edad (med)	Acondicionamiento	Aguda/crónica	MRT	PGR	SG	SLP
Schetelig et al ⁴⁶	Prospectivo (n = 30)	15/15 50	Flu-Bu ATG	56%/75%	15%		72 (2 años)	67 (2 años)
Caballero et al (datos no publicados)	Prospectivo (n = 31)	31/0 53	Flu + Mel: 64% Flu-Bu-ATG: 16% Flu-TBI: 3,2% Flu-TBI-ATG: 13% Flu-Mel-C1H: 3,2%	64%/66%	22%	6% (2 años)	66 (2 años)	68 (2 años)
Dreger et al ⁵	Retrospectivo EBMT (n = 79)	65/14 58	Flu + Cy: 56% Flu + Mel o Bu:44% (40% + CIH)	34%/72%	18% (12 meses)	31% (2 años)	58% (2 años)	56% (2 años)
Sorror et al ⁴⁹	(n = 14)	0/14 58	Flu 90 + 200 TBI	-/57% 6 p	22%	16% (2 fallos injerto)	70% (2 años)	62% (2 años)
Khouri et al ⁵⁷	Prospectivo (n = 17)	17/0	Flu 90 + Cy 750 x 3 + Ritux x 3 (10p)	-/36% si Ritux y 81% si no Ritux	¿	0	100% si Ritux 14% si no Ritux	¿

LLC-B: leucemia linfática crónica-B; EICH: enfermedad injerto contra huésped; REC: ??????; MRT: mortalidad relacionada con el trasplante; PGR: ??????; SG: supervivencia global; SLP: síndrome linfoproliferativo; EBMT: European Bone Marrow Transplant.

intensidad del del grupo de Seattle⁵¹. Es difícil precisar si uno es mejor que los otros pero *a priori*, si existe enfermedad activa, cabe esperar que el acondicionamiento del grupo de Seattle, como ya ha sido comunicado en otras hemopatías se asocie a un menor efecto antitumoral. La morbimortalidad del trasplante alogénico no mieloablato es debida casi exclusivamente a la EICH presente en un buen número de enfermos, que en casi el 100% de los casos se realiza a partir de células de sangre periférica. Así la incidencia de EICH aguda II-IV y de EICH crónica es de 34 y 68% según los datos del estudio prospectivo español que ha reclutado más de 200 pacientes en diferentes hemopatías^{43,53}; es de reseñar, sin embargo, que en un estudio comparativo⁵³ llevado a cabo entre 135 pacientes incluidos en dicho protocolo y 85 que durante el mismo período recibieron un trasplante alogénico mieloablato, a pesar de la edad superior del primer grupo, la incidencia de EICH agudo grado II-IV y el tiempo que permanecen bajo tratamiento inmunosupresor debido a EICH crónica son significativamente menores en los pacientes que reciben un trasplante con acondicionamiento de intensidad reducida.

Dada la morbimortalidad de la EICH se han empleado diferentes estrategias encaminadas a reducirla, siendo la más frecuente la incorporación en el acondicionamiento de algún tipo de globulina anti-linfocítica o asociar alemtuzumab (anti-CD52). Así, recientemente, Pérez Simón et al⁵⁴ han comparado los resultados de dos estudios prospectivos con trasplante no mieloablato en síndromes linfoproliferativos que incluía 15 pacientes con LLC-B y de los que 78 (8 LLC-B) habían recibido alemtuzumab y CSA y 51 (7 LLC-B) metotrexato + CSA como profilaxis del EICH. El alemtuzumab, de acuerdo con este estudio, reduce significativamente la incidencia de EICH pero se asocia a una mayor reactivación de la infección por citomegalovirus. Además, más pacientes en el grupo del anti-CD52 requirieron ILD para control de la enfermedad o para alcanzar una hematopoyesis completa del donante. Sin embargo, la gran morbilidad que produce la EICH crónica hace al anti-CD52 una estrategia atractiva a explorar, sobre todo en neoplasias de lento crecimiento como la LLC-B donde, de acuerdo con los datos existentes^{55,56} la RC tras trasplante alogénico se alcanza tarde sin que por ello la enfermedad progrese. Además la ILD a dosis escalantes ayuda a alcanzar la quimera completa o a erradicar la enfermedad en algunos pacientes, con un menor riesgo de desarrollar EICH⁵⁴.

Otro anticuerpo monoclonal, el anti-CD20 (rituximab) se ha añadido al acondicionamiento no mieloablato en 17 pacientes con LLC-B⁵⁷. Aunque los resultados son preliminares, los autores apuntan hacia un posible papel del rituximab como inmunomodulador, mejorando el efecto ICL del trasplante, que en su experiencia tiene aparente influencia en la supervivencia (100 y 14% dependiendo de que hayan o no recibido rituximab).

Respecto al tipo de donante, la mayoría de los pacientes han recibido un trasplante de un donante familiar, aunque en los últimos años más y más pacientes con SLP se trasplantan de donante no emparentado con acondicionamiento no mieloablato algunos con LLC-B y la mortalidad de las series que incluyen diferentes enfermedades está en torno al 20%^{58,59}.

Factores que influyen en el éxito del trasplante en la LLC-B

Como hemos visto anteriormente aunque diferentes de unas series a otras, varios factores influyen desfavorablemente en el pronóstico de los pacientes sometidos a trasplante autólogo: la situación al trasplante, intervalo mayor a 36 meses entre el diagnóstico y el trasplante, no recibir RTCT^{6,11,13,14}, alteraciones cromosómica como 11q^{-22,23}, ausencia de mutaciones somáticas de la región VDJ, estadio de Binet avanzado o linfocitos superior a $50 \times 10^9/l$ ^{22,23}. En el estudio de Milligan et al²⁴ en el que los pacientes reciben el trasplante autólogo como parte de la terapia de primera línea, variables como la edad, o el estadio no influyen en la SG ni en la SLE, sin embargo, la presencia de enfermedad a nivel molecular postrasplante predecía la reaparición de la enfermedad.

En cuanto a los factores pronósticos en pacientes que reciben trasplante alogénico, de acuerdo con el reciente estudio retrospectivo del EBMT⁵², se asocian a menor mortalidad el acondicionamiento no mieloablato y trasplante precoz; a una mejor SG estar en RC o RP al trasplante y a una menor recaída la situación al trasplante, menos de 47 años y donante emparentado.

Eficacia del tipo de trasplante en la eliminación de la EMR

Como ya se ha comentado previamente la persistencia o reaparición de enfermedad residual determinada por técnicas de biología molecular (PCR) o CMF multiparamétrica se asocia a recaída de la LLC-B postrasplante^{13,15-17}. De hecho, tras trasplante autólogo, la mayoría de los enfermos van a continuar con enfermedad a nivel molecular y esto se va a seguir de una recaída clínica. Sin embargo, tras trasplante alogénico la enfermedad es indetectable en la mayoría de los enfermos, lo que indica la capacidad curativa de dicho procedimiento.

Existen dos trabajos que comparan el diferente comportamiento de la persistencia de la EMR en el trasplante autólogo y alogénico. En la serie de Esteve et al⁵⁵ que analiza la EMR mediante CMF, de 18 pacientes que reciben trasplante autólogo, seis de los siete con EMR a los 3 meses, progresan a una mediana de 15 meses, con una probabilidad de recaída significativamente mayor que aquellos con EMR negativa. Frente a esto, la persistencia de EMR tras trasplante alogénico no es sinónimo de recaída ya que la EMR progresivamente va disminuyendo.

Igualmente, Ritgen et al⁵⁶ han comunicado un estudio por PCR cuantitativa comparando los resultados entre un grupo de 12 pacientes que reciben un trasplante alogénico no mieloablativo (11 no mutados y uno mutado) y 49 que reciben trasplante autólogo (35 no mutados y 10 mutados). En los pacientes que reciben trasplante alogénico se observa una reducción progresiva de la EMR hasta la completa desaparición del clon tumoral, que además se hace muy evidente al suspender la inmunosupresión; sin embargo, tras altas dosis seguida de rescate autólogo, la máxima reducción se obtiene en el día +100 y después va en aumento. Así los 8 pacientes que son PCR negativos tras TIR permanecen en RC mientras que en el trasplante autólogo, 14 pacientes ya han presentado una recaída franca.

En resumen, estos estudios sugieren la capacidad erradicadora de la enfermedad por el trasplante alogénico y no por el autólogo. Es más, como se ha comunicado recientemente⁴², el trasplante alogénico sería también capaz de erradicar la enfermedad en pacientes con pronóstico adverso de la LLC no mutado y así de acuerdo con este estudio, la posibilidad de recaída a los 3 años tras trasplante autólogo en 12 pacientes con LLC no mutada es del 48% mientras que ninguno de los 6 pacientes que reciben un trasplante alogénico ha recaído.

Indicaciones del trasplante autólogo y alogénico

En la toma de decisiones terapéuticas en cualquier hemopatía es imprescindible disponer de los factores pronósticos de la misma². En la LLC-B en la actualidad, además de los datos clínicos básicos (estado clínico, patrón de infiltración de biopsia ósea, tiempo de duplicación linfocitaria, etc.) se debe realizar un estudio citogenético y de hibridación *in situ* que incluya el análisis de los genes Rb (13 q-) ATM (11q), p53 (17p-) y cromosoma 12, así como el estudio de los antígenos CD38 y ZAP-70 y de la existencia de mutaciones somáticas de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulinas.

Tomando en cuenta estas consideraciones, las indicaciones del trasplante autólogo y alogénico serían las siguientes:

El trasplante autólogo, aunque no cure la enfermedad puede, como se ha dicho, tener un impacto en la supervivencia por tanto parece un opción adecuada para pacientes con características de mal pronóstico y datos clínicos que requieren tratamiento (estadios B, C, no mutados, expresión elevada de ZAP-70 o de CD38 elevada); es recomendable que el paciente se encuentre con la mínima enfermedad antes del trasplante, mejor en RC, lo que en la actualidad puede conseguirse gracias a la asociación a la quimioterapia de AcMo como el rituximab o el alemtuzumab^{21,60}. No sabemos sin embargo, si con el empleo de estos fármacos en asociación o combinados a alquilantes y análogos de las purinas y quizá como

mantenimiento no se pueden alcanzar los mismos resultados que con el trasplante autólogo y sin el riesgo de la aparición de síndrome mielodisplásico. Así pues, parece aconsejable que el trasplante autólogo, aunque forma parte de la terapia habitual de los síndromes linfoproliferativos, en el caso de la LLC, se realice sólo en el contexto de ensayos clínicos.

Respecto a qué pacientes se les debe ofrecer un trasplante alogénico y que tipo, pacientes con factores de mal pronóstico como no alcanzar RP con un régimen que incluya fludarabina, aquellos que requieren tratamiento y presentan datos biológicos de mal pronóstico como ausencia de mutaciones somáticas y alteraciones citogenéticas como el 11q- o 17p-, generalmente no consiguen larga supervivencia con el trasplante autólogo, por lo que, si tienen un donante familiar o edad para tolerar un trasplante no emparentado ésta es probablemente la mejor opción para ellos. Respecto al tipo de acondicionamiento de trasplante alogénico, aunque los datos son preliminares, la experiencia actual apunta a que el acondicionamiento mieloablativo no parece imprescindible para erradicar el clon leucémico ya que el régimen de intensidad reducida puede conseguirlo igualmente. La EICH tanto aguda como crónica sigue siendo un problema que conlleva todavía una mortalidad no desdeñable y una gran morbilidad por lo que deben continuar los esfuerzos para disminuir el efecto desfavorable, manteniendo el efecto alogénico beneficioso.

En resumen, todavía quedan abiertas muchas cuestiones por resolver pero sí queremos hacer algunas recomendaciones aplicables a pacientes por debajo de 70 años, que puedan ser en el futuro candidatos a terapias agresivas, deben tenerse en cuenta una serie de recomendaciones: la decisión de iniciar el tratamiento debe basarse en la existencia de enfermedad sintomática y no en la presencia exclusiva de datos pronósticos. La reevaluación de la enfermedad debe hacerse con los métodos más sensibles y reproducibles, en la LLC-B, probablemente la citometría de flujo. Por último, si el paciente es candidato a trasplante, siempre que sea posible, debería incluirse a los pacientes en estudios prospectivos; cuando la terapia considerada "estándar" haya fracasado se debe ofrecer a los pacientes la posibilidad de entrar en ensayos clínicos que le permitan beneficiarse de fármacos en investigación.

Bibliografía

1. Rai K, Chiorazzi N. Determining the clinical course and outcome in chronic lymphocytic leukaemia. *N Engl J Med* 2003;348:1797-9.
2. Shanafelt TD, Geyer M, Kay NE. Prognosis at diagnosis: Integrating molecular biologic insights into clinical practice for patients with CLL. *Blood* 2004;103:1202-10.
3. Montserrat E, Gomis F, Vallespi T, Ríos A, Romero A, Soler J, et al. Presenting features and prognosis of chronic lymphocytic leukemia in younger adults. *Blood* 1991;78:1545.
4. Mauro FR, Foa R, Giannarelli D, Cordone I, Crescenzi S, Pescarmona E, et al. Clinical characteristics and outcome of young chronic lymphocytic

- tic leukaemia patients: a single institution study of 204 cases. *Blood* 1999;94:448-54.
5. Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, O'Brien S, et al. National Cancer Institute-sponsored working group guidelines for chronic lymphocytic leukaemia: Revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 1996;87:4990-7.
 6. Dreger P, Van Biezen A, Brand R, et al. Prognostic factors for survival after autologous stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia (CLL). The EBMT experience. *Blood* 2000;96:482a.
 7. Rabinowe SN, Soiffer RJ, Gribben JG, Daley H, Freedman AS, Daley J, et al. Autologous and allogeneic bone marrow transplantation for poor prognosis patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Blood* 1993;82:1366-76.
 8. Khouri IF, Keating MJ, Vriesendorp HM, Reading CL, Przepiorka D, Huh YO, et al. Autologous and allogeneic bone marrow transplantation for chronic lymphocytic leukaemia: Preliminary results. *J Clin Oncol* 1994; 12:748-58.
 9. Dreger P, Von Neuhoff N, Kuse R, Sonnen R, Glass B, Uharek L, et al. Early stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukaemia: A chance for cure? *Br J Cancer* 1998;77:2291-7.
 10. Krackhardt AM, Gribben JG. High dose therapy and stem cell support in chronic lymphocytic leukaemia. En: Cheson BD, editor. *Chronic lymphoid leukemias*. Marcel Dekker, 2001; p. 393-415.
 11. Montserrat E, Esteve J, Schmitz N, et al. Autologous stem cell transplantation for CLL: Analysis of the impact on overall survival in 107 patients from the international Project for CLL/transplants. *Blood* 1999;94:397a.
 12. Esteve J, Montserrat E, Dreger P, et al. Stem cell transplantation (SCT) for chronic lymphocytic leukaemia (CLL): Outcome and prognostic factors after autologous and allogeneic transplants. *Blood* 2001;98:482a.
 13. Dreger P, Von Neuhoff N, Sonnen R, et al. Feasibility and efficacy of early autologous stem cell transplantation for poor-risk CLL. *Blood* 2000;96:483a.
 14. Dreger P, Montserrat E. Autologous and allogeneic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 2002;16:985-92.
 15. Meloni G, Proia A, Mauro F, Amaranto P, Capria S, Cimino G, et al. Unmanipulated peripheral blood stem cell autograft in chronic lymphocytic leukaemia: clinical findings and biological monitoring. *Hematologica* 2000;85:952-60.
 16. Rawstron AC, Kennedy B, Evans PA, Davies FE, Richards SJ, Haynes AP, et al. Quantification of minimal residual disease levels in chronic lymphocytic leukaemia using a sensitive flow cytometric assay improve the prediction of outcome and can be used to optimise therapy. *Blood* 2001;98:29-35.
 17. Schultze JL, Donovan JW, Gribben JG. Minimal Residual Disease detection after myeloablative chemotherapy in chronic lymphatic leukaemia. *J Mol Med* 1999;77:259-65.
 18. O'Brien SM, Gribben JG, Thomas DA, et al. Alembuzumab for minimal residual disease in CLL. *Blood* 2003;102:109a.
 19. O'Brien SM, Kantarjian HM, Thomas DA, Cortes J, Giles FJ, Wierda WG, et al. Alemtuzumab as treatment for residual disease after chemotherapy in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2003;98:2657-63.
 20. Montillo M, Cafro AM, Tedeschi A, Brando B, Oreste P, Veronese S, et al. Safety and efficacy of subcutaneous Campath-1H for treating residual disease in patients with chronic lymphocytic leukaemia responding to fludarabine. *Hematologica* 2002;87:696-70.
 21. Keating M.K, Manshour T, O'Brien S, et al. A high proportion of true complete remission can be obtained with a fludarabine, cyclophosphamide, rituximab combination (FCR) in chronic lymphocytic leukaemia. *Blood* 2003;22:569.
 22. Dreger P, Stilgenbauer S, Benner A, Ritgen M, Krober A, Kneba M, et al. The prognostic impact of autologous stem cell transplantation in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a risk-matched analysis based on the VH gene mutational status. *Blood* 2004;103:2850-8.
 23. Ritgen M, Lange A, Stilgenbauer S, Dohner H, Bretscher C, Bosse H, et al. Unmutated immunoglobulin variable heavy chain gene status remains and adverse prognostic factor after autologous stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukaemia. *Blood* 2003;101:2049-53.
 24. Milligan DW, Fernandes S, Dasgupta R, Davies FE, Matutes E, Fegan CD, et al. Autografting for younger patients with chronic lymphocytic leukaemia is safe and achieves a high percentage of molecular responses. Results of the MCR Pilot study. *Blood* (En prensa, 2004).
 25. Michallet M, Thiebaut A, Dreger P, Remes K, Milpied N, Santini G, et al. Peripheral blood stem cell mobilization and transplantation after fludarabine therapy in chronic lymphocytic leukaemia (CLL): A report of the blood and marrow transplantation (EBMT) CLL subcommittee on behalf of the EBMT Chronic Leukaemias working party. *Br J Haematol* 2000;108:595-601.
 26. Tournilhac O, Cazin B, Lepretre S, Divine M, Maloum K, Delmer A, et al. Impact of frontline fludarabine and cyclophosphamide combined treatment on peripheral blood stem cell mobilization in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Blood* 2004;103:363-5.
 27. Montillo M, Tedeschi A, Rossi V, Cairoli R, Pungolino E, Intropido L, et al. Successful CD34+ cell mobilization by intermediate-dose ARA-C in chronic lymphocytic leukemia patients treated with sequential fludarabine and Campath 1H. *Leukemia* 2004;18:57-62.
 28. Milligan DW, Ruiz de Elvira MC, Kolb HJ, Goldstone AH, Meloni G, Rohatiner AZ, et al. Secondary leukemia and myelodysplasia after autografting for lymphoma. Results from the EBMT. EBMT lymphoma and late effects working parties. European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Br J Haematology* 1999;106:1020-6.
 29. Caballero MD, Pérez-Simón JA, Iriondo A, Lahueta JJ, Sierra J, Marín J, et al. High dose therapy in diffuse large cell lymphoma: Results and prognostic factors in 452 patients from the GEL-TAMO Spanish Cooperative. *Annals of Oncology* 2003;14:140-51.
 30. Perkins JG, Flynn JM, Howard RS, Byrd JC. Frequency and type of serious infections in fludarabine-refractory B-cell chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma. *Cancer* 2002;94:2033-9.
 31. Jarque I, Palau J, Sanz GF, Guinot M, Gomis F, Martin G, et al. Delayed complete response after allogeneic bone marrow transplantation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1993;82:1036-7.
 32. Michallet M, Archimbaud E, Bandini G, Rowlings PA, Deeg HJ, Gahrton G, et al. HLA identical sibling bone marrow transplantation in younger patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Ann Int Med* 1996;124:311-5.
 33. Khouri IF, Przepiorka D, Van Besien K, O'Brien S, Palmer JL, Lerner S, et al. Allogeneic blood or marrow transplantation for chronic lymphocytic leukaemia timing of transplantation and potential effect of fludarabine on acute graft versus host disease. *Br J Haematol* 1997;97: 466-73.
 34. Khouri IF, Keating MJ, Saliba RM, Champlin RE. Long term follow-up of patients with chronic lymphocytic leukaemia treated with allogeneic hematopoietic transplantation Cytotherapy 2001;4:217-23.
 35. Michallet M, Carreras E, Cornelissen JJ, et al. Allo transplant and auto-transplant in CLL. *Bone Marrow Transplant* 1999;23(Suppl 1):53.
 36. Pavletic ZS, Arrowsmith ER, Bierman PJ, Goodman SA, Vose JM, Taranoto SR, et al. Outcome of allogeneic stem cell transplantation for B cell chronic lymphocytic leukaemia. *Bone Marrow Transplant* 2000;25: 717-22.
 37. Rondon G, Giral S, Huh Y, Khouri I, Andersson B, Andreoff M, et al. Graft vs leukaemia effect after allogeneic bone marrow transplantation for chronic lymphocytic leukaemia. *Bone Marrow Transplant* 1996;18:669-72.
 38. Espanol I, Buchler T, Ferrá C, Gallardo D, Reyes P, Sarra J, et al. Richter's syndrome after allogeneic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukaemia successfully treated by withdrawal of immunosuppression and donor lymphocyte infusion. *Bone Marrow Transplant* 2003;31:215-8.
 39. Michallet M, Michallet AS, Bandini G, et al. Conventional HLA-identical sibling bone marrow transplantation is able to cure chronic lymphocytic leukemia. A study from the EBMT and IBMT Registries. *Bone Marrow Transplant* 2004;33:611.
 40. Urbano-Ispizua A, Rozman C, Martínez C, Marín P, Briones J, Rovira M, et al. Rapid engraftment without significant GVHD after allogeneic transplantation of CD 34 positive selected cells from peripheral blood. *Blood* 1997;89:3967-73.
 41. Gribben JG, Sequist L, Zahrieh D, et al. Outcome following Autologous or Allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukaemia. *Blood* 2003;102:3649a.
 42. Moreno C, Colomer D, Villamor N, et al. Allogeneic but not autologous stem cell transplantation overcomes the negative impact of unmutated VH genes in patients with CLL. *Blood* 2003;102:522a.
 43. Martino R, Caballero MD, Simón JA, Canals C, Solano C, Urbano-Ispizua A, et al. Evidence for a graft versus leukemia effect of allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with reduced intensity conditioning in acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Blood* 2002;100:2243-5.
 44. Khouri IF, Keating M, Korbling M, Przepiorka D, Anderlini P, O'Brien S, 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.
 45. Dreger P, Brand R, Hansz J, Milligan D, Corradini P, Finke J, et al. Treatment-related mortality and graft-versus-leukemia activity after allogeneic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia using intensity-reduced conditioning. *Leukemia* 2003;17:841-8.
 46. Schetelig J, Thiede C, Bornhauser M, Schwerdtfeger R, Kiehl M, Beyer J, et al. Evidence of a graft-versus-leukemia effect in chronic lymphocytic leukaemia after reduced-intensity conditioning and allogeneic stem-cell transplantation: The cooperative German transplant study group. *J Clin Oncol* 2003;21:2747-53.
 47. Caballero MD, Martino R, Mateos MV, et al. Reduced intensity conditioning on patients with B- chronic lymphocytic leukaemia (B CLL). Results of a perspective multicenter trial. *Bone Marrow M Transplant* 2004;33:498a.
 48. Khouri IF, Lee MS, Saliba RM, Andersson B, Anderlini P, Couriel D, et al. Nonablative allogeneic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukaemia: Impact of rituximab on immunomodulation and survival. *Exp Hematol* 2004;32:28-35.
 49. Sorror ML, Maris M, Storer B, et al. Nonmyeloablative (NM) conditioning and allogeneic hematopoietic cell transplantation (HCT) with HLA-matched Unrelated donor (URD) for patients (Pts) with chemotherapy refractory chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Blood* 2003;102:1757a.
 50. García-Marco JA, García-Vela J, Ruiz E, et al. Long-term clinical remission and minimal residual disease eradication after fludarabine phosphate-based reduced-intensity allogeneic stem cell transplantation in patients with chronic lymphocytic leukaemia and mantle cell lymphoma. *Blood* 2003;102:5599a.
 51. Diaconescu R, Flowers CR, Storer B, Sorror ML, Maris MB, Maloney DG, et al. Morbidity and mortality with non myeloablative compared to myeloablative conditioning before hematopoietic cell transplantation from HLA matched related donors. *Blood* (En prensa, 2004).

52. Dreger P, Biezen A, Brand R, et al. Reduced-intensity conditioning lowers treatment-related mortality (TRM) of allogeneic stem cell transplantation (SCT) for CLL: A retrospective study on 448 patients. *Blood* 2003;102:689a.
53. Pérez-Simón JA, Ocio E, Caballero MD, et al. GvHD after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: Comparison between conventional and reduced-intensity conditioning regimens. *Bone Marrow Transplantation* 2004;33:694a.
54. Pérez-Simón JA, Kottaridis PD, Martino R, Craddock C, Caballero D, Chopra R. Non myeloablative transplantation with or without Campath 1H: comparison between 2 prospective studies in patients with lymphoid disorders. *Blood* 2002;100:3121-7.
55. Esteve J, Villamor N, Colomer D, Montserrat E. Different clinical value of minimal residual disease after autologous and allogeneic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;99:1873-4.
56. Ritgen M, Humpe A, Stilgenbauer S, et al. Quantitative minimal residual disease assessment demonstrate disease control by graft versus-leukaemia effect in chronic lymphocytic leukaemia after non-myeloablative allogeneic in contrast to autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2004;33:406a.
57. Khouiri I, Lee MS, Saliba RM, et al. Impact of rituximab on immunomodulation and survival after non-Myeloablative allogeneic stem cell transplantation (NST) for chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Blood* 2003;102:2690a.
58. Pavletic SI, Kouri I, King R, et al. HLA matched unrelated donor (MUD) bone Marrow Transplantation for B-cell chronic lymphocytic leukaemia (results from the CLL working group, national marrow donor program). *ASCO* 2000;19:40.
59. Maris MB, Niederwieser D, Sandmaier BM, Storer B, Stuart M, Maloney D, et al. HLA-matched unrelated donor hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning for patients with hematologic malignancies. *Blood* 2003;102:2021-30.
60. Rawstron AC, Kennedy B, Moreton P, Dickinson AJ, Cullen MJ, Richards SJ, et al. Early prediction of outcome and response to alemtuzumab therapy in chronic lymphocytic leukaemia. *Blood* 2004;103: 2027-31.

PLASTICIDAD DE LAS CÉLULAS MADRE HEMOPOYÉTICAS: APLICACIONES EN LA PRÁCTICA CLÍNICA

COORDINADOR: F. PRÓSPER. *Falta centro??, Pamplona*
J.A. BUEREN. *Falta centro??, Madrid*

Resumen del simposio

Como algunas veces ocurre en distintas áreas del conocimiento, las expectativas generadas por algunos descubrimientos, son cuando menos desproporcionadas y prematuras, y a medio plazo conducen a producir un efecto contrario del que inicialmente se esperaba. Desde que hace ahora 6 años, los descubrimientos seminales del grupo de Thomson^{1,2}, demostraran la posibilidad de generar líneas celulares pluripotenciales e inmortales a partir de blastocistos humanos, se ha desarrollado un sentimiento generalizado e intenso de que un número incontable de enfermedades incurables tienen los días contados. Por desgracia, nada más lejos de la realidad. No cabe duda de que se han abierto nuevas expectativas, tanto en cuanto a la posible utilización de las células madre en terapia regenerativa, como en cuanto a que su estudio nos permita entender en mayor profundidad algunos de los mecanismos que condicionan la aparición de enfermedades como el Parkinson o la diabetes mellitus o por qué, mientras que animales inferiores como planarias o reptiles son capaces de regenerar tejidos e incluso organismos enteros, en humanos, esta capacidad es cuando menos muy limitada.

En el centro del debate nos encontramos con las células madre adultas y las células madre embrionarias. Independientemente de aspectos éticos, tanto unas como las otras ofrecen ventajas e inconvenientes. Dejaremos a los distintos conferenciantes que nos presenten las fortalezas y debilidades de cada tipo de células madre. Indudablemente, deben ser los méritos científicos y no políticos los que nos demuestren cuáles son las posibilidades clínicas y terapéuticas reales de las células madre. Por desgracia, la presión social, política y mediática está desvirtuando el debate y llevándolo a terrenos ajenos a la ciencia.

Un último comentario, antes de describir algunos aspectos de las presentaciones que vamos a escuchar a continuación: es esencial que seamos capaces de transmitir tranquilidad y paciencia a nuestros enfermos y a sus familias. Las células madre están todavía lejos de constituir una realidad en el campo de las terapias regenerativas de enfermedades actualmente incurables, y solamente la investigación constante, bien diseñada y sin prejuicios permitirá llegar a conclusiones que a medio y largo plazo puedan dar respuesta a nuestros enfermos.

Nuestra intención con este simposio, ha sido tratar de dar una visión actual de las posibilidades de la terapia celular con células madre en algunas de las áreas más significativas. Para ello contamos con algunos de los investigadores, que en la actualidad constituyen la vanguardia en sus respectivas especialidades.

La Dra. Beatriz Pelacho nos describirá cuáles son las perspectivas de la utilización de las células madre adultas derivadas de la médula ósea en el campo de la regeneración cardíaca. Más concretamente nos hablará de las células MAPC, descritas hace 2 años por el grupo de Catherine M. Verfaillie del que forma parte la Dra. Pelacho³. Utilizando modelos *in vitro*, así como modelos experimentales de infarto de miocardio, veremos hasta qué punto las células MAPC contribuyen a mejorar la función cardíaca en estos modelos y cuáles son los posibles mecanismos que contribuyen a esta mejoría.

La capacidad de autorregeneración del hígado a partir de los propios hepatocitos maduros o de las células ovales ha sido claramente demostrado en distintos modelos animales. Sin embargo, de forma reciente, se ha sugerido que las células madre hematopoyéticas podrían ser capaces de diferenciarse a hepatocitos maduros y contribuir a la regeneración hepática. El grupo del Dr. Segovia ha trabajado extensamente en un modelo de cirrosis hepática en ratón. Mediante la utilización de ratones Ly5.1 y Ly5.2-GFP ha podido demostrar qué células de la médula ósea son capaces de diferenciarse a hepatocitos. Aunque el porcentaje de hepatocitos derivados de células madre hematopoyéticas es muy pequeño, es posible incrementar dicho porcentaje gracias a la utilización de factores de crecimiento, capaces de movilizar células hematopoyéticas desde la médula ósea a la sangre periférica.

Las enfermedades neurodegenerativas y más concretamente la enfermedad de Parkinson figuran entre las enfermedades "favoritas" como modelo para la terapia celular. Como bien nos explicará la Dra. Luquin, autoridad internacional en el tratamiento de esta enfermedad, la enfermedad de Parkinson se caracteriza por la degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra y por tanto se trata de un modelo particularmente atractivo, ya que la sustitución por nuevas neuronas dopaminérgicas al menos, teóricamente contribuiría a curar la enfermedad. En el laboratorio de la Dra. Luquin, han desarrollado modelos animales de Parkinson en ratas y en monos⁴. En estos modelos, han examinado la posibilidad de que células derivadas del cuerpo carotídeo sean capaces de restaurar los síntomas motores de la enfermedad. Además de profundizar en algunos de los mecanismos responsables de estos efectos, estos estudios nos sugieren que tal vez, no es necesario la utilización de células pluripotenciales sino solamente con la potencialidad necesaria para tratar una enfermedad concreta.

Esperamos que estas cuatro presentaciones, enormemente interesantes, estimulen el interés de la audiencia en este apasionante campo de la medicina regenerativa y de las células madre.

Bibliografía

1. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145-7.
2. Shambloott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:13726-31.
3. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002;418:41-9.
4. Luquin MR, Montoro RJ, Guillen J, Saldise L, Insausti R, Del Rio J, et al. Recovery of chronic parkinsonian monkeys by autotransplants of carotid body cell aggregates into putamen. *Neuron* 1999;22:743-50.

REGENERACIÓN HEPÁTICA CON CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS

O. QUINTANA-BUSTAMANTE^{1,4},
A. ÁLVAREZ-BARRIENTOS², I. FABREGAT³,
J.A. BUEREN¹ Y J.C. SEGOVIA¹

¹Programa de Terapia Génica de la Hematopoyesis. CIEMAT. Madrid.

²Unidad de Citometría. Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares. Madrid.

³Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

⁴OQB es becario predoctoral del Programa de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Ciencia y Tecnología.

Resumen

En los últimos años se ha descrito que las células madre hematopoyéticas (CMH), aparte de generar y mantener las células sanguíneas tienen la capacidad, bajo determinadas condiciones, de generar células funcionalmente activas de otros tejidos no hematopoyéticos, tales como el hígado, corazón, músculo. La proliferación y diferenciación de las CMH están finamente regulada por múltiples factores de crecimiento e interacciones célula-célula con el estroma medular. Algunos de estos factores de crecimiento tienen la capacidad de movilizar CMH desde la médula ósea al torrente sanguíneo. En el presente tra-

bajo, hemos establecido condiciones para el estudio de esta nueva funcionalidad de las CMH y hemos investigado si la movilización de CMH mediante factores de crecimiento hematopoyéticos puede incrementar la generación de hepatocitos derivados de la médula ósea (HDMO). Para su estudio se estableció un modelo murino de cirrosis crónica en ratones cuyas células derivadas de la médula ósea expresaban la proteína verde fluorescente (EGFP). En los ratones tratados para inducir daño hepático se observó un marcado desequilibrio en los parámetros hepáticos plasmáticos y una estructura hepática alterada. La presencia de HDMO se evaluó mediante técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. En los animales cirróticos, el porcentaje de HDMO fue de uno cada 250.000 hepatocitos totales. Sin embargo, la movilización con factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), provocó un aumento significativo en el porcentaje de HDMO. Estos resultados demuestran que la movilización de CMH desde la médula ósea a sangre periférica incrementa significativamente la presencia de HDMO en hígados dañados.

Introducción

Las células madre, o células *stem*, se definen como células con capacidad de autorrenovación, multidiferenciación y mantenimiento a lo largo de toda la vida del individuo. En el organismo adulto diferen-

tes tejidos mantienen una pequeña población de células multipotenciales con capacidad de proliferar y diferenciar hacia los diversos tipos celulares del tejido al que pertenecen. Estas células se encargan de regenerar el órgano o tejido conforme las células que lo componen mueren o tras un daño tisular¹. Sin embargo, recientemente se han obtenido datos que rompen el dogma de que una célula madre adulta está restringida al órgano en el que se aloja. A este fenómeno se la ha dado en llamar transdiferenciación o plasticidad de células madre y se ha definido como la conversión de una célula de un linaje tisular a una célula de otro tejido completamente distinto, con pérdida de marcadores específicos y de función del tejido original, y la adquisición de marcadores y funciones del tipo al que se ha transdiferenciado².

La médula ósea se ha revelado como la población con un mayor potencial de transdiferenciación. La demostración de que células de médula ósea enriquecidas en CMH, pueden contribuir a generar células funcionales de multitud de tejidos no hematopoyéticos se ha llevado a cabo después de transferir CMH a huéspedes letalmente irradiados, y a menudo dañados en el tejido a estudiar^{2,3}. Así pues, se ha descrito la expresión de marcadores genéticos derivados del donante en células no hematopoyéticas en la piel⁴, epitelio pulmonar^{4,5}, epitelio intestinal⁴, epitelio renal⁶, parénquima hepático^{4,7-10}, páncreas¹¹, músculo esquelético^{12,13}, endotelio¹⁴, miocardio¹⁵ y neuronas del sistema nervioso central en la corteza y cerebelum¹⁶. La incidencia de este fenómeno presenta una gran variabilidad, desde menos del 0,1 % a casi el 20 % de células transdiferenciadas del total del tejido diana^{2,3}. En la mayor parte de los casos ha sido necesario que existiera daño en los tejidos diana para que se observaran fenómenos de transdiferenciación⁷. Además, en determinados casos han sido capaces de restaurar enfermedades del receptor de las células^{7,17,18}.

Las primeras evidencias sobre la existencia de fenómenos de plasticidad se llevaron a cabo en el tejido hepático. El análisis de los hígados de ratones hembra letalmente irradiados y trasplantados con células de médula ósea procedente de ratones macho singénicos reveló la presencia de hepatocitos con el cromosoma Y en su genoma⁹. Estos resultados fueron corroborados posteriormente en humanos que habían sido sometidos a trasplante de médula ósea como tratamiento de enfermedad hematológica¹⁹. Sucesivos abordajes demostraron que una población altamente purificada de CMH no sólo reconstituía la hematopoyesis de ratones letalmente irradiados y defectivos en una enzima hepática –fumaril acetoacetato hidrolasa– necesaria para la vida del animal, sino que además repoblaba el hígado enfermo y restauraba valores normales de transaminasas⁷. Esta repoblación del tejido hepático ha sido también demostrada en otros modelos de daño hepático^{8,20,21}. Aunque estudios posteriores han ex-

plicado estos procesos como resultado de fusión *in vivo* entre células exógenas normales y endógenas enfermas, se han abierto grandes expectativas sobre la posibilidad de utilizar CMH, de las que se dispone de un gran conocimiento, para curar tanto enfermedades hematológicas como no hematológicas.

Es bien conocido que el tratamiento con determinados fármacos o factores de crecimiento hematopoyético produce una movilización de progenitores hematopoyéticos y CMH de la médula ósea a la sangre periférica²². Este tratamiento se ha utilizado extensivamente para la obtención de productos hematopoyéticos para trasplante. También se utilizan tratamientos con factores de crecimiento para paliar determinadas anemias y leucopenias inducidas como resultado de un trasplante de médula ósea o debidas a enfermedades hematológicas como leucemias, anemia de Fanconi. En el presente estudio nos hemos planteado la evaluación de la contribución de células derivadas de la médula ósea en la recuperación de daño hepático crónico y la posibilidad de que un incremento en el número de precursores hematopoyéticos y CMH circulantes, inducido por factores de crecimiento hematopoyético, aumente la incidencia de transdiferenciación hepática en un modelo murino de cirrosis crónica.

Desarrollo de un modelo murino de cirrosis crónica con células de la médula ósea marcadas genéticamente

Para la identificación de las células procedentes de la médula ósea, ratones expresando el marcador panleucocitario murino Ly-5.1 fueron trasplantados con 10⁷ células totales de médula ósea procedentes de ratones que expresaban el marcador panleucocitario Ly-5.2 y transgénicos expresando la EGFP bajo el promotor de la β -actina, de expresión ubicua. De esta forma, se generan unos ratones quiméricos donde todas las células derivadas de la médula ósea, tanto hematopoyéticas como no hematopoyéticas son identificables por la expresión de la EGFP. Tres meses después del trasplante los animales presentaron una hematopoyesis estable y positiva para el marcador hematopoyético exógeno (Ly-5.1) y para la EGFP.

La inducción de cirrosis se llevó a cabo mediante la administración intraperitoneal continuada (una vez por semana durante 3 meses) de tetracloruro de carbono (CCl₄)²³. Se evaluaron parámetros plasmáticos de transaminasa glutamicopirúvica, enzima transaminasa glutamicooxalacética y bilirrubina, comprobándose su alteración respecto a valores normales, que reflejaban un claro daño hepático (tabla 1). El análisis histológico de los hígados de ratones cirróticos mostró la presencia de grandes células con inclusiones celulares, incremento de infiltración linfocitaria y áreas de inflamación y pérdida de glucógeno celular (fig. 1A). En conjunto, se demostraba que el tratamiento a los ratones trasplantados con CCl₄ indu-

Tabla 1. Valores plasmáticos de enzimas hepáticas en ratones normales y tratados con tetracloruro de carbono

	GPT		GOT		Bilirrubina	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE
-CCl ₄	6,17	1,17	49,33	1,91	0,138	0,037
+ CCl ₄	89,80*	9,99	197,55*	25,11	0,309*	0,018

*Valores estadísticamente significativos ($p < 0,05$) usando test de Wilcoxon Mann-Whitney.
 GPT: transaminasa glutamicopirúvica; GOT: transaminasa glutamicooxalacética; DE: desviación estándar; CCl₄: tetracloruro de carbono.

cía un daño hepático grave que se asemejaba a una enfermedad cirrótica crónica.

Identificación de células derivadas de la médula ósea en los hígados enfermos

Nuestro siguiente objetivo fue identificar la presencia de derivadas de la médula ósea exógena trasplantada en los ratones cirróticos. Para ello, cortes de tejido hepático fueron marcados con anticuerpos que reconocían células hematopoyéticas y la proteína transgénica EGFP. Se observó una presencia de células exógenas muy elevada, en torno al 30%, debido fundamentalmente a los procesos de necrosis hepática y procesos inflamatorios asociados. Esta presencia de células hematopoyéticas en el hígado de los ratones cirróticos aumentó hasta un 50% de las células del hígado cuando los ratones fueron sometidos a un protocolo de movilización utilizando el factor de crecimiento G-CSF, comprobándose que el incremento de células y precursores hematopoyéticos circulantes se reflejaba en un claro incremento de las células hematopoyéticas infiltradas en los hígados dañados (fig. 1B).

Dadas las evidencias descritas sobre la capacidad plástica de las células de la médula ósea, nos propusimos determinar si el aumento en el número de células hematopoyéticas influía también en la aparición de células hepáticas procedentes de la médula ósea trasplantada (células transdiferenciadas). Para contabilizar una célula como transdiferenciada, se establecieron los siguientes requisitos: a) expresar el transgén EGFP (analizado por inmunofluorescencia); b) poseer morfología de hepatocito (células grandes con un citoplasma regular, núcleos grandes y en ocasiones varios núcleos); c) no expresar marcadores de diferenciación hematopoyética tales como el antígeno panleucocitario CD45 (analizado por inmunofluorescencia), y d) poseer funcionalidad hepática, tal como la capacidad de almacenar glucógeno (analizado por tinción con ácido peryódico de Schiff [PAS]). Siguiendo estas estrictas condiciones encontramos que en los hígados dañados la presencia de HDMO era muy baja, en torno a 1/250.000 hepatocitos. Estos datos están en consonancia con los comunicados por otros autores²⁴ y confirman que aun-

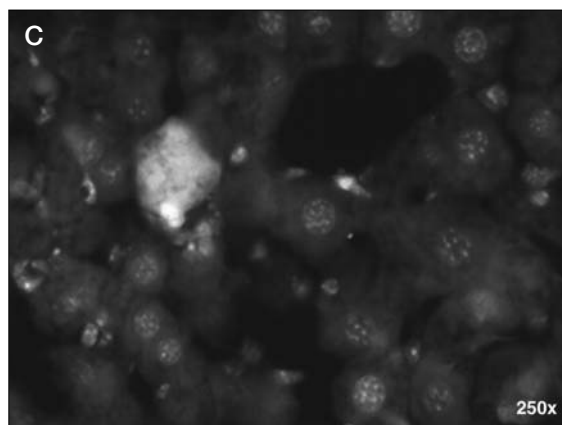
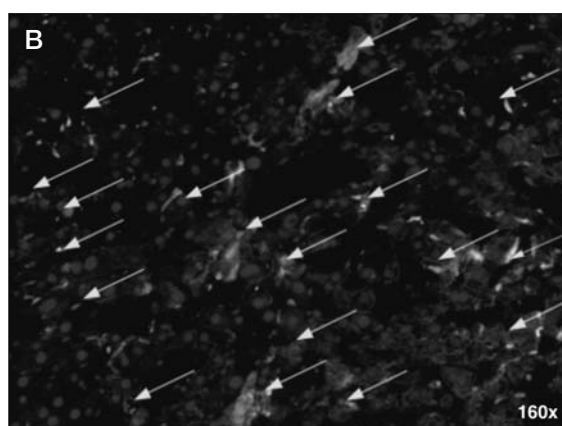
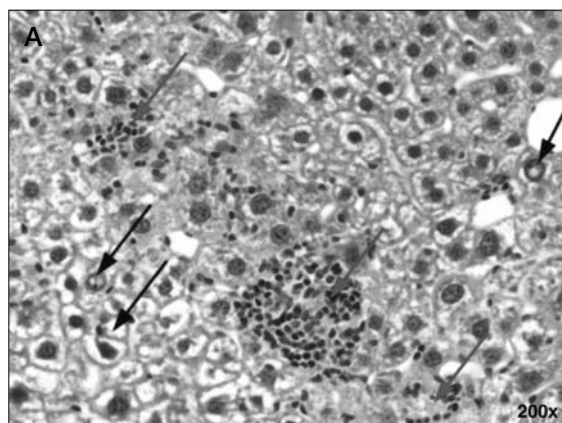


Figura 1. Análisis de daño tisular hepático y de injerto de células derivadas de la médula ósea en ratones tratados con CCl₄. A) Secciones hepáticas de hígados dañados teñidas con hematoxilina-eosina; se observan focos de infiltración hematopoyéticas y células hepáticas aberrantes; B) presencia de células hematopoyéticas, y C) de hepatocitos derivados de la médula ósea en ratones con daño hepático y movilizados con G-CSF. Criocortes analizados mediante inmunofluorescencia para la identificación de EGFP, Ly-5 y núcleos celulares con DAPI.

que existente, la generación de HDMO es un suceso de muy baja incidencia. Cuando se analizaron los animales tratados con G-CSF, se observó un incremento de HDMO directamente proporcional al nú-

mero de semanas de tratamiento con el factor de crecimiento (fig. 1C). Estos resultados sugieren que la movilización de CMH a la circulación favorece la aparición de hepatocitos funcionales derivados de la médula ósea. Si los hepatocitos generados en este modelo experimental son fruto de la capacidad plástica de las CMH o se deben a fenómenos de fusión *in vivo* está siendo evaluado en la actualidad.

El desarrollo de protocolos de potenciación de estos procesos podría facilitar la regeneración hepática en situaciones en las que los mecanismos hepáticos *per se* se hubiesen agotado. Asimismo, la introducción de genes terapéuticos en CMH mediante protocolos de terapia génica podría facilitar la expresión de proteínas de interés en hígado o en cualquier otro tejido al que pudiesen derivarse las CMH.

Bibliografía

1. Kaji EH, Leiden JM. Gene and stem cell therapies. *JAMA* 2001;285:545-50.
2. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell* 2004;116:639-48.
3. Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003;102:3483-93.
4. Krause DS, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001;105:369-77.
5. Theise ND, et al. Radiation pneumonitis in mice: a severe injury model for pneumocyte engraftment from bone marrow. *Exp Hematol* 2002;30:1333-38.
6. Kale S, et al. Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule. *J Clin Invest* 2003;112:42-9.
7. Lagasse E, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat Med* 2000;6:1229-34.
8. Petersen BE, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999;284:1168-70.
9. Theise ND, et al. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 2000;31:235-40.
10. Wang X, et al. Albumin expressing hepatocyte-like cells develop in the livers of immune-deficient mice transmitted with highly purified human hematopoietic stem cells. *Blood* 2003.
11. Ianus A, Holz GG, Theise ND, Hussain MA. *In vivo* derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest* 2003;111:843-50.
12. LaBarge MA, Blau HM. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell* 2002;111:589-601.
13. Brazelton TR, Nystrom M, Blau HM. Significant differences among skeletal muscles in the incorporation of bone marrow-derived cells. *Dev Biol* 2003;262:64-74.
14. Grant MB, et al. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med* 2002;8:607-12.
15. Jackson KA, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001;107:1395-402.
16. Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000;290:1775-9.
17. Gussoni E, et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999;401:390-4.
18. Davidoff AM, et al. Bone marrow-derived cells contribute to tumor neovasculation and, when modified to express an angiogenesis inhibitor, can restrict tumor growth in mice. *Clin Cancer Res* 2001;7:2870-9.
19. Theise ND, et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000;32:11-6.
20. Terai S, et al. An *in vivo* Model for Monitoring Trans-Differentiation of Bone Marrow Cells into Functional Hepatocytes. *J Biochem (Tokyo)* 2003;134:551-8.
21. Jang YY, et al. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol* 2004.
22. Molineux G, Pojda Z, Dexter TM. A comparison of hematopoiesis in normal and splenectomized mice treated with granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1990;75:563-9.
23. Rudolph KL, et al. Inhibition of experimental liver cirrhosis in mice by telomerase gene delivery. *Science* 2000;287:1253-8.
24. Kanazawa Y, Verma IM. Little evidence of bone marrow-derived hepatocytes in the replacement of injured liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(Suppl 1):11850-3.

TERAPIA CELULAR EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

M.^aR. LUQUIN PIUDO

Departamento de Neurología y Neurocirugía. Clínica Universitaria de Navarra. Pamplona.

Introducción

La enfermedad de Parkinson es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por una degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra¹, responsable de la aparición de los signos y síntomas característicos de la enfermedad². Los mecanismos que subyacen a la degeneración neuronal dopaminérgica permanecen desconocidos si bien se ha postulado la existencia de un incremento del estrés oxidativo, una hiperactividad de las vías excitadoras glutamatérgicas (excitotoxicidad), una disfunción del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial y en algunos casos factores genéticos^{2,3}.

El tratamiento más eficaz y mayoritariamente utilizado en la enfermedad de Parkinson consiste en la administración de levodopa conjuntamente con inhibidores de la dopadecarboxilasa central, produciéndose una reducción importante (aproximadamente del 70%) de todos los síntomas de la enfermedad. Este tratamiento es particularmente efectivo durante los estadios iniciales de la enfermedad. Sin embargo, a medida que la enfermedad progresa el tratamiento pierde eficacia y comienzan a aparecer complicaciones motoras y psiquiátricas que disminuyen la calidad de vida de los pacientes y dificultan enormemente su tratamiento clínico⁴.

La utilización de células con capacidad de sintetizar y liberar dopamina y restablecer los circuitos neuronales dañados, se perfila como una posible alternativa en el tratamiento de los pacientes con enfermedad de Parkinson^{5,6,7}.

Tipo de célula

Una de las grandes limitaciones para que la terapia celular sea una realidad en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson es encontrar una fuente de células donantes. Estas células deben además tener la capacidad de sobrevivir e integrarse en el cerebro del huésped durante un tiempo prolongado y poder obtenerse en el laboratorio en cantidades suficientes.

Terapia celular con células de mesencéfalo ventral fetal

Las células de origen fetal son las más ampliamente estudiadas en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson tanto en modelos experimentales como en humanos^{8,9}. En pacientes con enfermedad de Parkinson, diversos grupos han demostrado que el trasplante de células de mesencéfalo ventral fetal produce una mejoría clínica significativa, asociada a un incremento de la captación estriatal de fluorodopa

que se mantiene hasta 10 años después de la realización del implante, lo que sugiere que la mejoría clínica es probablemente debida a la supervivencia y funcionalidad de las células implantadas¹⁰. Además, los estudios *post-mortem* de pacientes con enfermedad de Parkinson que recibieron un trasplante fetal han mostrado la supervivencia de un número importante de neuronas tirosina hidroxilasa positivas en el lugar del implante, una reinervación dopaminérgica parcial del estriado y el desarrollo de nuevas conexiones sinápticas con las células estriatales del huésped¹¹. Sin embargo, estudios más recientes realizados en Estados Unidos por dos diferentes investigadores han demostrado en un estudio doble ciego, que los pacientes que recibieron un implante de células dopaminérgicas fetales presentaban una mejoría clínica muy discreta a pesar de que existía un incremento significativo de la captación estriatal de fluorodopa y un número importante de células tirosina hidroxilasa positivas en el lugar del implante. Además de la escasa mejoría clínica que presentaron los pacientes implantados, un porcentaje importante de los pacientes desarrollaron discinesias invalidantes durante los períodos "off" que requirieron tratamiento quirúrgico en algunos de los casos. Todos estos resultados han llevado a reconsiderar la utilidad de los implantes de células dopaminérgicas fetales en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

A pesar de los aparentes buenos resultados, los implantes de células fetales tienen una serie de limitaciones¹². En primer lugar problemas de tipo ético y legal limitan la utilización de tejido fetal en clínica. En segundo lugar, solamente un 5-10% de las células implantadas sobreviven lo que implica que deben utilizarse un número importante de "donantes" para obtener una mejoría clínica significativa. En tercer lugar, los pacientes requieren inmunosupresión al menos durante 6 meses para evitar el rechazo. Finalmente, los implantes de células dopaminérgicas fetales producen una reinervación parcial del putamen que nunca excede el 50% del estriado, por lo que la pérdida de la inervación dopaminérgica en otras estructuras de los ganglios basales (p. ej., globo pálido, núcleo subtalámico) no es restablecida por las células implantadas. Esta reinervación dopaminérgica incompleta podría explicar por qué la mayoría de los pacientes que reciben implantes de células dopaminérgicas fetales requieren posteriormente tratamiento farmacológico con levodopa, el desarrollo de discinesias en "off" después del implante y la falta de eficacia de esta terapia para mejorar otros síntomas motores como los trastornos de la marcha o de la postura.

Alternativas a los tejidos fetales

Antes de su aplicación a pacientes con enfermedad de Parkinson, debe explorarse de forma crítica la seguridad y la eficacia de las posibles células donantes en modelos animales de enfermedad de Parkinson.

Con relación a la seguridad, debe prestarse especial atención a la posibilidad de que las células implantadas puedan generar tumores o infecciones en el cerebro del huésped. Por otro lado, las células implantadas deben garantizar una mejoría clínica mantenida y una supervivencia prolongada de las mismas. Solamente cuando estos requerimientos se cumplan, las células podrán ser exploradas en ensayos clínicos.

Injertos autólogos con células derivadas de médula adrenal

Las células de médula adrenal son capaces de sintetizar y liberar dopamina lo que justifica que hayan sido utilizadas como una fuente alternativa de células donantes. Los pacientes que recibieron un implante de células adrenales, muestran una mejoría clínica discreta y transitoria debido a que las células adrenales implantadas tienen una supervivencia muy baja. Con la finalidad de aumentar la supervivencia de estas células, se han realizado diferentes técnicas como el pretratamiento de las células adrenales con factores tróficos o el coimplante de células adrenales y nervio periférico. Sin embargo, la alta morbilidad y mortalidad de esta técnica ha hecho que los implantes adrenales se hayan abandonado por la mayoría de los clínicos¹³.

Xenoinjertos de origen porcino

Células procedentes del mesencéfalo ventral de cerdo se han implantado en el estriado de pacientes con enfermedad de Parkinson, con moderada mejoría sintomática a los 12 meses de la cirugía. El examen del cerebro de un paciente que falleció mostró la existencia de células fetales porcinas en el lugar del implante, sin evidencia de reacción glial. Sin embargo, la limitación del uso de este tipo de células en la clínica radica en la posibilidad de que las células porcinas puedan transmitir infecciones por retrovirus al cerebro del huésped¹⁴.

Injertos autólogos con células de cuerpo carotídeo

Los implantes estriatales de agregados celulares de cuerpo carotídeo revierten los déficit motores inducidos por la denervación dopaminérgica nigroestriada en roedores y primates^{15,16}. En nuestro laboratorio hemos realizado autoimplantes unilaterales y bilaterales en 12 macacos con parkinsonismo grave inducido por MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina). Estos animales presentan una mejoría de los síntomas motores que se mantiene al menos 12 años después de la cirugía. Aunque el número de animales no permite establecer varios grupos con relación al grado de parkinsonismo, la mejoría del parkinsonismo es mayor en aquellos animales con un grado de parkinsonismo ligero. Resultados similares se ha descrito en roedores y en humanos tratados mediante esta técnica quirúrgica. El mecanismo por el cual estos implantes de agregados celulares induce esta recuperación motora se desconoce. Es poco probable que sea debido a la supervivencia de

las células dopaminérgicas que contienen los agregados celulares de cuerpo carotídeo ya que el número de células tirosina hidroxilasa que se encuentran en el estriado implantado, no supera las 100-200 células, número insuficiente para explicar la reinervación estriatal dopaminérgica que se observa en el estriado de los animales implantados. Como posibles alternativas para explicar la recuperación motora de estos animales, estamos estudiando la posibilidad de que el cuerpo carotídeo contenga células neurales progenitoras o factores neurotróficos que induzcan la proliferación de células dopaminérgicas en el estriado, fenómeno que se ha descrito para el factor neurotrófico derivado de la glía.

Utilización de células madre

Se denominan células madre a aquellas células capaces de proliferar extensamente y de forma indefinida produciendo células idénticas a sí mismas, y con capacidad de diferenciarse hacia distintos tipos de células maduras y funcionales. Existen distintos tipos de células madre definidas en función de su potencialidad o capacidad de diferenciarse a distintos tejidos.

Células madre embrionarias

Las células madre embrionarias son una de las fuentes celulares que más expectativas están generando en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Diversos estudios han puesto de manifiesto que es posible diferenciar células embrionarias humanas y de animales a neuronas y más concretamente a neuronas dopaminérgicas. Además estudios *in vivo* han demostrado que las células madre embrionarias son capaces de diferenciarse a neuronas dopaminérgicas y mejorar los déficit motores inducidos por la degeneración nigroestriada en modelos animales de enfermedad de Parkinson^{17,18,19,20}. Sin embargo, aproximadamente un 30 % de los animales trasplantados desarrollan tumores cerebrales (teratomas y teratocarcinomas) como consecuencia de la proliferación anormal de las células embrionarias. De forma muy reciente el grupo de Ron McKay ha demostrado en un modelo de rata parkinsoniana que las células embrionarias parcialmente diferenciadas hacia tejido ectodérmico son capaces de sobrevivir en el estriado de la rata y mejorar los síntomas derivados de la degeneración nigroestriada, sin desarrollar teratomas²¹.

Células madre adultas

Se han identificado células madre en múltiples tejidos adultos incluido el sistema nervioso central²². Las células madre adultas mejor caracterizadas son las células hematopoyéticas derivadas del mesodermo^{23,24}. También se han caracterizado ampliamente las células madre neurales identificadas fundamentalmente en la región subventricular y en el bulbo olfatorio. En modelos murinos y en primates no humanos, estas células son capaces de proliferar

tanto *in vivo* como *in vitro* y de diferenciarse a neuronas y células gliales.

Células adultas multipotenciales (MAPC)

Esta población celular de la médula ósea ha sido descrita recientemente por el grupo de la Dra. Verfaillie^{25,26,27,28}. Su descubrimiento ha suscitado la atención del mundo científico ya que se han descrito como auténticas células pluripotenciales con una capacidad diferenciadora muy similar a las células madre embrionarias. Las MAPC han sido aisladas tanto de médula humana como murina. Estas MAPC son capaces de proliferar *in vitro* más de 120 divisiones celulares sin un aparente envejecimiento ya que mantienen unos niveles altos de telomerasa durante todo el tiempo de cultivo. *In vitro*, las MAPC son capaces de diferenciarse hacia tejido derivado ectodérmico y más concretamente hacia neuronas dopaminérgicas funcionales. Estudios *in vivo* en un modelo de infarto cerebral en la rata han demostrado que el implante de células MAPC humanas produce una mejoría de los déficit motores y que histológicamente las MAPC se diferencian en células que expresan marcadores tanto de astrocitos, oligodendrocitos como neuronas²⁹.

Diana quirúrgica

Los resultados del estudio doble ciego publicado recientemente por el grupo americano 10 han demostrado que el implante estriatal de células dopaminérgicas embrionarias en pacientes con enfermedad de Parkinson induce una mejoría significativa de las escalas de incapacidad funcional exclusivamente en los pacientes con una edad inferior a los 60 años, a pesar de que en ambos grupos de pacientes existía un incremento en la captación de fluorodopa estriatal. Sin embargo, un 20 % de los pacientes experimentaron una mejoría clínica significativa desarrollaron discinesias coreicas en "off" que no se redujeron al disminuir o suspender la medicación antiparkinsoniana. En estos pacientes, la captación estriatal de [¹⁸F] fluorodopa fue significativamente mayor que en los que no desarrollaron discinesias, lo que sugiere que la aparición de movimientos involuntarios puede estar relacionado con una liberación de dopamina excesiva y no controlada por parte las células implantadas en un área reducida del estriado. No obstante, una explicación alternativa para el desarrollo de discinesias en estos pacientes podría radicar en que quizás el estriado no sea el lugar idóneo para realizar los implantes de células dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson.

Un de las ventajas adicionales de las células inmaduras es su capacidad de migración desde el lugar del implante, lo que supondría en el caso de la enfermedad de Parkinson la posibilidad de proporcionar una restauración del contenido de dopamina estriatal más homogéneo que el que se pudiera conseguir realizando implantes de agregados de células dopaminérgicas fetales que provocarían una liberación masiva e incontrolada de dopamina en una región estriatal.

Bibliografía

- Hirsch E, Graybiel AM, Agid YA. Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* 1988;334:345-8.
- Olanow CW, Tatton WG. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci* 1999;22:123-44.
- Mouradian MM. Recent advances in the genetics and pathogenesis of Parkinson disease. *Neurology* 2002;58:179-85.
- Olanow CW, Watts RL, Koller WC. An algorithm (decision tree) for the management of Parkinson's disease: treatment guidelines. *Neurology* 2001;56, S1-S88.
- Akerud P, Canals JM, Snyder EY, Arenas E. Neuroprotection through delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor by neural stem cells in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 2001;21:8108-18.
- Arenas E. Stem cells in the treatment of Parkinson's disease. *Brain Res Bull* 2002;57:795-808.
- Kordower JH, Emborg ME, Bloch J, Ma SY, Chu Y, Leventhal L, et al. Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science* 2000;290:67-73.
- Fischbach GD, McKhann GM. Cell therapy for Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2001;344:763-5.
- Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, et al. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2001;344:710-9.
- Piccini P, Brooks DJ, Björklund A, Gunn NR, Grasby PM, Rimoldi O, et al. Dopamine release from nigral transplants visualized *in vivo* in a Parkinson's patient. *Nat Neurosci* 1999;2:1137-40.
- Kordower JH, Rosenstein JM, Collier TJ, Burke MA, Chen E-Y, Martel L, et al. Functional fetal nigral grafts in a patient with Parkinson's disease: chemoanatomic, ultrastructural, and metabolic studies. *J Comp Neurol* 1996;370:203-30.
- Dunnett SB, Björklund A, Lindvall O. Cell therapy in Parkinson's disease - stop or go? *Nat Rev Neurosci* 2001;2:365-9.
- Date I, Imaoka T, Miyoshi Y, Ono T, Asari S, Ohmoto T. Chromaffin cell survival and host dopaminergic fiber recovery in a patient with Parkinson's disease treated by cogafts of adrenal medulla and pretransected peripheral nerve. Case report. *J Neurosurg* 1996;84:685-9.
- Fink JS, Schumacher JM, Elias SL, Palmer EP, Saint-Hilaire M, Shannon K, et al. Porcine xenografts in Parkinson's disease and Huntington's disease patients: preliminary results. *Cell Transplant* 2000;9:273-8.
- Luquin MR, Montoro RJ, Guillén J, Saldise L, Insausti R, Del Río J, et al. Recovery of chronic parkinsonian monkeys by autotransplants of carotid body cell aggregates into putamen. *Neuron* 1999;22:743-50.
- Toledo-Aral JJ, Méndez-Ferrer S, Pardal R, Echevarría M, López-Barneo J. Trophic Restoration of the Nigrostriatal Dopaminergic Pathway in Long-Term Carotid Body-Grafted Parkinsonian Rats. *J Neurosci* 2003;23:141-8.
- Shambloott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13726-31.
- Björklund LM, Sánchez-Pernaute R, Chung S, Andersson T, Chen IY, McNaught KS, et al. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:2344-9.
- Daadi MM, Weiss S. Generation of tyrosine hydroxylase-producing neurons from precursors of the embryonic and adult forebrain. *J Neurosci* 1999;19:4484-97.
- Kawasaki H, Suemori H, Mizuseki K, Watanabe K, Urano F, Ichinose H, et al. Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:1580-5.
- Kim JH, Auerbach JM, Rodríguez-Gómez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, et al. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 2002;418:50-6.
- Poulsom R, Alison MR, Forbes SJ, Wright NA. Adult stem cell plasticity. *J Pathol* 2002;197:441-56.
- Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 2000;100:157-68.
- Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:387-403.
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-González XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 2002.
- Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 2002;30:896-904.
- Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 2002;109:337-46.
- Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001;98:2615-25.
- Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol* 2002;174:11-20.

PERSPECTIVAS ACTUALES EN ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

COORDINADORES J.A. PÁRAMO. *Servicio de Hematología, Laboratorio de Aterosclerosis, Pamplona*
J. COSÍN. *Investigación Cardiocirculatoria. Hospital Universitario la Fe, Valencia*

Resumen del simposio

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de mortalidad en los países desarrollados y en vías de desarrollo, siendo responsables de 17 millones de fallecimientos anualmente. Las previsiones para el año 2020 son que estas enfermedades representarán la principal causa de mortalidad mundial.

La aterotrombosis, principal sustrato fisiopatológico de las enfermedades cardiovasculares, es un proceso inflamatorio crónico difuso con episodios agudos de trombosis intravascular afectando diferentes lechos arteriales (coronario, carotídeo, aorta, arteria femoral, arteria renal, etc.), que progresa a lo largo de la vida y que, tras una etapa silente de duración variable, se manifiesta clínicamente como síndrome coronario, iclus isquémico o arteriopatía periférica. Al impacto sanitario de estos procesos se une una indudable repercusión socioeconómica: se estima que el coste total por cardiopatía isquémica en Estados Unidos en el año 2002 alcanzó 111,8 billones de dólares. Se puede predecir que este impacto sociosanitario continuará creciendo de forma imparable debido a: *a*) mayor supervivencia tras el episodio agudo (disminución de la mortalidad e incremento de la morbilidad); *b*) envejecimiento progresivo de la población, y *c*) estilo de vida "occidental" (tabaco, diabetes, obesidad, dieta, estrés, etc.).

La Dra. Corella et al detallan los aspectos epidemiológicos diferenciados relacionados con la enfermedad cardiovascular en la Unión Europea y en España (a nivel general y por comunidades autónomas), así como la prevalencia de los factores tradicionales y emergentes de riesgo cardiovascular y polimorfismos genéticos asociados a un mayor riesgo de enfermedad isquémica arterial. Si bien las tasas de mortalidad por cardiopatía isquémica en España son inferiores a las de otros países de la Unión Europea, existe un incremento progresivo de la morbilidad hospitalaria y, por consiguiente, de la demanda sanitaria.

Para la moderna medicina clínica la aportación de la genómica (estudio del genoma) y de la proteómica (estudio de la expresividad proteica, consecuencia de aquélla) van a permitir profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares, celulares, bioquímicos, genéticos y fisiopatológicos de las enfermedades cardiovasculares, así como establecer estrategias para su prevención y tratamiento. A diferencia del genoma, la expresión de ARN (transcriptoma) y de las proteínas (proteoma) pueden depender de circunstancias concretas de naturaleza fisiológica o patológica. El Dr. Díez aborda un grupo de genes-proteínas relacionados con el estrés oxidativo vascular, centrándose en alteraciones de la expresión y actividad del sistema NAD(P)H oxidasa (principal fuente de anión superóxido) en pacientes hipertensos, que determinan su predisposición a desarrollar aterosclerosis. A partir del conocimiento de estas alteraciones se pueden diseñar estrategias diagnósticas y terapéuticas encaminadas a inhibir la actividad de dicho sistema enzimático.

La activación del sistema hemostático se considera clave en la patogenia de las complicaciones trombóticas de la aterosclerosis. La trombina es una enzima central de este sistema, pero su actividad no se limita exclusivamente al mecanismo de la coagulación, ya que interviene en el proceso aterogénico a través de sus acciones mitogénicas para células musculares lisas, macrófagos y células endoteliales. La trombina es, asimismo, responsable de la liberación de citocinas proinflamatorias, componentes vasoactivos y factores quimiotácticos; aumenta la permeabilidad vascular, promueve la adhesión de células endoteliales e induce angiogénesis. Muchas de estas acciones están mediadas por su unión a receptores específicos (PAR). El Dr. Lane profundizará en los mecanismos que regulan las acciones de la trombina, así como las complejas interacciones con sus sustratos. El conocimiento de la relación estructura-función de la trombina no sólo permitirá entender mejor su papel en las enfermedades cardiovasculares de naturaleza aterotrombótica, sino que posibilitará nuevas aproximaciones terapéuticas.

El tratamiento con inhibidores directos de la trombina (heparina no fraccionada y de bajo peso molecular) seguido de anticoagulantes y/o antiplaquetarios ha constituido la base terapéutica de los síndromes arteriales isquémicos. El desarrollo de nuevos inhibidores directos de la trombina activos por vía oral (p. ej., xi-

melagatran) puede representar una auténtica revolución en el tratamiento antitrombótico. El Dr. Korin expone el papel actual de estos agentes en la patología isquémica arterial, planteando asimismo varios interrogantes relacionados con la dosis a emplear, monitorización, seguridad, efectos adversos, antídotos y coste.

Cabe aventurar que el desarrollo del conocimiento en el terreno de la epidemiología, genómica, proteómica y del papel de proteinasas en procesos biológicos fundamentales para la homeostasis del organismo humano va a suponer un avance fundamental para entender mejor las bases fisiopatológicas de las enfermedades cardiovasculares de naturaleza aterotrombótica. Estudios en curso permitirán establecer la relevancia clínica de los nuevos inhibidores directos de la trombina, su impacto sanitario y su relación coste-beneficio en patología isquémica arterial.

EPIDEMIOLOGÍA DE LA PATOLOGÍA ISQUÉMICA ARTERIAL. PERSPECTIVAS ACTUALES

D. CORELLA, M.L. GUILLÉN Y O. PORTOLÉS

Unidad de Epidemiología Genética y Molecular.

Departamento de Medicina Preventiva.

Facultad de Medicina. Universitat de València. Valencia.

Introducción

La isquemia arterial es una interrupción aguda o crónica del flujo sanguíneo a una determinada zona del organismo debida fundamentalmente a trombo- sis arterial, embolismo arterial, lesión directa de la arteria debida a un traumatismo, lesiones iatrogénicas, o al desarrollo de lesiones ateromatosas vasculares. La isquemia arterial se manifiesta, entre otros signos y síntomas, con dolor, que puede estar ausente en las isquemias incompletas, presentándose también hormigueo, parálisis y enfriamiento de la extremidad afectada, cianosis, etc. No obstante, los síntomas dependen de la arteria que haya sido afectada así como de la amplitud de la región isquémica. La causa más frecuente de lesiones obstructivas coronarias es la aterosclerosis, consistente en el depósito de ciertas sustancias, principalmente lípidos y calcio en la pared de las arterias. En estos últimos años ha surgido el concepto de aterotrombosis como una forma mixta de explicar la oclusión arterial considerando los dos procesos interdependientes: la aterosclerosis y la trombosis. La aterotrombosis es pues un proceso crónico dinámico de la pared vascular durante el cual también se pueden presentar los síndromes coronarios agudos¹. Por ello, se puede afirmar que la disfunción endotelial y la inflamación son las piedras angulares que promueven la enfermedad aterosclerótica isquémica. En esta nueva concepción son fundamentales los trabajos de Ross² quien supo aunar a su visión de la lesión endotelial, como iniciadora del proceso ateroscleroso, el de disfunción endotelial, que se produce por la acción de efectos sos-

tenidos no sólo de tipo reológico sino también por el efecto tóxico de muchas sustancias circulantes, de forma aguda o crónica. En 1993, las teorías trom- bótica y lipídica se aunaban en la teoría de la disfunción endotelial, hoy ampliamente aceptada².

La isquemia arterial es una condición patológica que se convierte en el frecuente origen de un grupo amplio de enfermedades altamente prevalentes tal como reflejan los datos de morbimortalidad de los países desarrollados³. Actualmente, estas enfermedades se incluyen dentro del capítulo IX en la décima revisión de la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE-10), bajo el epígrafe general de Enfermedades del sistema circulatorio que incluye: Fiebre reumática (I00-I099); Enfermedad hipertensiva (I11-I15), Enfermedad Isquémica del Corazón (I20-I25), Enfermedades de la circulación pulmonar (I26-28), Otras enfermedades cardíacas (I39-I52), Enfermedades de la circulación cerebral (I60-I69), Enfermedades de las arterias, arteriolas y capilares (I70-I79), Enfermedades de las venas y de los vasos linfáticos (I80-I89), Otras enfermedades del sistema circulatorio (I95-I99).

En el estudio de la incidencia de estas enfermedades, la dificultad radica en la inexistencia de registros globales, lo que implica que haya que acudir a registros o proyectos específicos internacionales y nacionales basados en submuestras poblacionales. Uno de los proyectos más conocidos internacionalmente es el MONICA (MONItoring of trends and determinants in Cardiovascular diseases), promovido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y realizado en 38 poblaciones de 21 países con el objetivo de obtener y comparar datos de incidencia y de los factores de riesgo asociados en las distintas enfermedades cardiovasculares⁴. Dentro de los segundos podemos señalar los estudios REGICOR (REgistre Glroní del COR), IBERICA (Investigación, Búsqueda Específica y Registro de Isquemia Coronaria Aguda), RIETE (Registro Informatizado de pacientes con Enfermedad TromboEmbólica), estudio RICVAL (Registro de pacientes con Infarto Agudo de miocardio de la Ciudad de Valencia) entre otros (Marrugat et al, 2002). Es por ello que para estudiar

la evolución global y la distribución de dichas enfermedades haya que recurrir a datos de mortalidad extraídos de las estadísticas de defunción.

Seguidamente, se estudiarán las tendencias en la morbimortalidad de las principales enfermedades isquémicas, así como su distribución nacional y comparación internacional, y se revisarán los principales factores de riesgo propuestos para las mismas.

Morbimortalidad por patología isquémica arterial

Existe gran dificultad en la obtención de datos específicos que permitan conocer no sólo la incidencia de la patología isquémica arterial, sino también la mortalidad por patología isquémica arterial. La mortalidad poblacional se establece a partir del boletín estadístico de defunción, utilizando la CIE para la clasificación de las causas de defunción. Concretamente, su última revisión (CIE-10), criticada por su gran extensión que dificulta su utilización en la clasificación de mortalidad. Además, la validez de los datos procedentes del certificado respecto a la causa de defunción depende de la validez del diagnóstico que depende a su vez tanto de las técnicas disponibles como de la enfermedad de que se trate, ya que ésta puede ser mal caracterizada independientemente de las técnicas (ictus hemorrágico frente a ictus isquémico, infarto agudo de miocardio frente a otros síntomas coronarios). En general este problema de mala clasificación puede evitarse utilizando, para elaborar las estadísticas de mortalidad, los grupos amplios en vez de las causas específicas⁵.

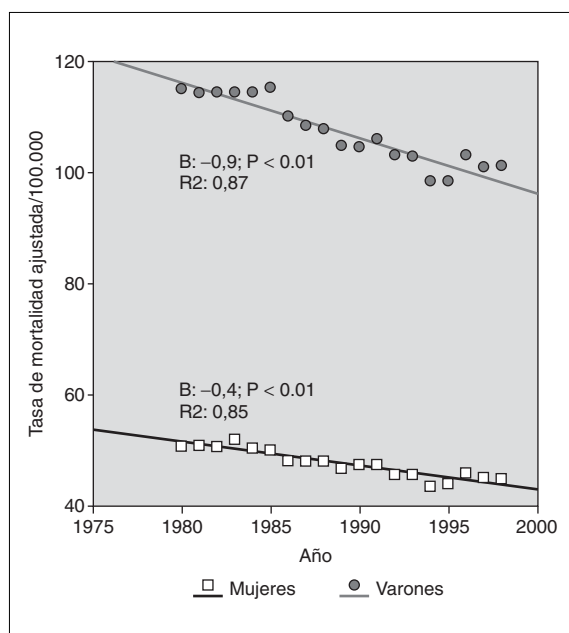


Figura 1. Evolución de las tasas de mortalidad por cardiopatía isquémica en España (1980-1998) en varones y mujeres. Tasas ajustadas por 100.000 según la población europea.

Ante la dificultad de obtener datos específicos sobre la patología isquémica arterial con las consideraciones anteriores, se analizará la situación actual y la evolución de los dos grandes grupos de mortalidad más prevalentes relacionados con estas patologías: la enfermedad isquémica del corazón y las enfermedades cardiovasculares. La isquemia arterial periférica es también altamente prevalente, pero el estudio de su mortalidad es mucho más complejo ya que a su vez constituye un importante factor de riesgo de cardiopatía isquémica o de enfermedad cerebral isquémica, codificándose muchas veces dentro de estos grandes grupos⁶. A lo largo del período de estudio se han sucedido distintas revisiones de la CIE, las rúbricas consultadas han sido: 410-414 en la revisión novena, y rúbricas I20-I25 de la décima (para la cardiopatía isquémica) y rúbricas 430-414 en la novena y (I60-I69) en la décima, para las enfermedades cerebrovasculares (ECV).

De acuerdo con ello, los datos más recientes en nuestro país indican que en año 2001 la mortalidad por enfermedades cardiovasculares permanece como primera causa de muerte (34,5% del total de las defunciones, 30% varones y 40% mujeres) y entre las causas cardiovasculares más frecuentes, se mantienen como primer origen de muerte las enfermedades isquémicas del corazón y la ECV, produciendo el 20% de las muertes en varones y el 25% en mujeres⁵. Se han observado diferencias por sexos, siendo en las mujeres la primera causa de muerte las ECV y la cardiopatía isquémica la segunda, mientras que en los varones la cardiopatía isquémica sigue siendo la más frecuente. Con relación a la evolución de la cardiopatía isquémica en nuestro país, se observa una estabilización en los últimos 20 años con una tendencia ligeramente descendente y una disminución de más del 50% en la mortalidad por cerebrovasculares. En la figura 1 se muestra la evolución de la mortalidad por cardiopatía isquémica en España durante el período de 1980 a 1998 en varones y en mujeres. Se han representado las tasas ajustadas por 100.000 habitantes utilizando la población estándar europea. Tras ajuste lineal se observa en ambos sexos una tendencia ligeramente decreciente. Este decremento ha sido mucho mayor en la evolución de la mortalidad por ECV para el mismo período, disminuyendo de aproximadamente 150/100.000 en los varones en 1980 a menos de 100/100.000 en 1998. En las mujeres se observa una situación paralela, teniendo, además, en cuenta que sus tasas de mortalidad siempre son inferiores a las de los varones. Es precisamente esta disminución, estimada en algo más del 50%, la que hace que nuestro país tenga una de las mayores esperanzas de vida del mundo⁵.

Por comunidades autónomas se mantiene el patrón norte-sur de mortalidad por cardiopatía isquémica y por ECV, con una mayor mortalidad en Levante, Andalucía y ambos archipiélagos (Almazán et al 1998). Asturias tiene el mayor número de falleci-

dos por 100.000 habitantes de cardiopatía isquémica, ocupando la segunda posición la Comunidad Valenciana. Cantabria presenta la tasa más baja de defunciones por cardiopatía isquémica. La mortalidad por ECV también es diferente por comunidades autónomas con tasas muy bajas en Castilla y León y muy elevadas en Murcia, Comunidad Valenciana y Andalucía⁷.

Con respecto a la comparación internacional, en España la mortalidad por cardiopatía isquémica continúa siendo de las más bajas de Europa y aunque la mortalidad por ECV sigue en lugares medios. En la tabla 1 se presentan las tasas de mortalidad por cardiopatía isquémica para el período 1997-1999 en varios países de la Unión Europea por 100.000 habitantes y estandarizadas según la población mundial. También a nivel mundial se ha estimado que más de un tercio de todas las defunciones en los países desarrollados son debidas a la cardiopatía isquémica. En Estados Unidos por ejemplo, ocurren al año más de 1,6 millones de infartos de miocardio, de los cuales, 500.000 fallecen antes de llegar al hospital. Globalmente se estima que debido al envejecimiento de la población y al incremento en la prevalencia de los factores de riesgo, la mortalidad por cardiopatía isquémica se incrementará en el mundo en los próximos años, pasando del 28,9% en 1990 a un 36,6% estimado para el año 2020⁸.

En cuanto a datos de morbilidad en nuestro país, podemos afirmar que las enfermedades del aparato circulatorio aumentaron constantemente en España durante el período de 1985-1995 tanto en varones como en mujeres, siendo mayor este aumento en la cardiopatía isquémica que en las ECV⁹. Durante ese período las tasas de morbilidad hospitalaria por cardiopatía isquémica fue de 285/100.000 habitantes (407 en varones y 168 en mujeres) y de 198/100.000 habitantes para las ECV (213 en varones y 184 en mujeres). Se observó la misma tendencia durante el año 1998 siendo la tasa de morbilidad hospitalaria de la cardiopatía isquémica de 329/100.000 habitantes (467 en varones y 197 en mujeres) y la tasa de morbilidad para las ECV fue de 239/100.000 habitantes (256 en varones y 223 en mujeres). En una estimación realizada por Marrugat et al¹⁰ sobre la magnitud del problema de la cardiopatía isquémica en España entre 1997 y 2005 concluyen que el envejecimiento de la población aumentará por sí mismo el número de casos de infarto agudo de miocardio y de angina inestable, estimando que en el año 2002, se producirían entre 65.700 y 71.200 casos de infarto agudo de miocardio con síntomas en España, y que de ellos, el 57% habrá muerto en los primeros 28 días. Es más, en los registros poblacionales se ha observado que más de dos tercios de los pacientes fallecen antes de llegar al hospital. En conjunto, estiman que el número total de casos de síndromes coronarios agudos en la población crecerá más del

Tabla 1. Tasas de mortalidad/100.000 por cardiopatía isquémica (1977-1999) en países de la Unión Europea. Tasas ajustadas según la población mundial

	Varones	Mujeres
Alemania	150,9	76,0
Austria	153,9	77,7
Bélgica	93,2	43,1
Dinamarca	148,9	72,9
España	78,2	34,3
Finlandia	213,8	98,9
Francia	60,4	23,9
Grecia	98,8	42,2
Holanda	111,7	47,9
Irlanda	215,8	100,8
Italia	92,9	43,7
Luxemburgo	103,6	44,6
Portugal	78,9	38,5
Reino Unido	174,4	81,7
Suecia	159,9	72,0

10% entre 1997 y 2005, suponiendo un notable incremento de la demanda asistencial.

Factores de riesgo en la patología isquémica arterial

Múltiples factores, tanto genéticos como ambientales han sido implicados en la patología isquémica arterial. Todos ellos pueden tener tanto efectos locales (estrés oxidativo, fuerzas de cizallamiento) como sistémicos (diabetes, hipertensión, etc.), actuando tanto en la iniciación, progresión o en la perpetuación de la disfunción endotelial. Como factores de riesgo clásicos o tradicionales se han considerado el consumo de tabaco, la hipercolesterolemia, la diabetes o la hipertensión. Sin embargo, recientes estudios anatomopatológicos, bioquímicos, genéticos y clínicos han ayudado a comprender mejor los mecanismos celulares y moleculares subyacentes que vinculan a los factores de riesgo con el proceso aterosclerótico. Así pues, la disfunción endotelial iniciaría la enfermedad aterosclerótica y desencadenaría la progresión de sus complicaciones trombóticas. En la tabla 2 se esquematizan los principales factores que son considerados nuevos factores de riesgo en aterotrombosis. El endotelio vascular regula la actividad contráctil, mitogénica y trombótica de la pared vascular. Los denominados factores de riesgo pueden alterar la homeostasis y la hemostasis de la pared vascular y promover señales inflamatorias. Se activan las plaquetas y los monocitos, lo que favorece la expresión del factor tisular desencadenando la cascada de coagulación con la generación de trombina y la formación del trombo vascular¹¹. La composición de la placa, más que el porcentaje de estenosis, es el mayor determinante de la vulnerabilidad de la placa^{11,12}. Las placas ateroscleróticas llamadas vulnerables o de alto riesgo son las más peligrosas, no sólo por su fragilidad,

Tabla 2. Nuevos factores de riesgo en aterotrombosis

Factores relacionados con los lípidos

Elevadas concentraciones de LDL pequeñas y densas
 Elevadas concentraciones de LDL oxidadas
 Lipoproteína (a)
 Concentraciones elevadas de lipoproteínas remanentes
 Concentraciones altas de apoB y bajas de apoA-I

Marcadores de inflamación

Concentraciones elevadas de proteína C reactiva
 Citocinas: interleucina 6 (IL-6), IL-18; tumor necrosis alfa, etc.
 Concentraciones elevadas de moléculas de adhesión:
 molécula 1 de adhesión
 Intercelular (ICAM-1); molécula 1 de adhesión vascular (VCAM-1), etc.
 CD40 y ligando soluble CD40

Factores relacionados con las plaquetas

Agregación plaquetaria
 Actividad plaquetaria
 Tamaño y volumen plaquetario

Marcadores de trombosis/hemostasis

Elevación del fibrinógeno
 Concentraciones elevadas de PAI-1
 Factores V, VII y VIII
 Aumento del dímero D
 Fibrinopéptido A
 Protrombina

Otros factores

Concentraciones elevadas de homocisteína
 Microalbuminuria
 Resistencia a la insulina
 Factores psicológicos
 Agentes infecciosos: citomegalovirus, *Helicobacter pylori*,
Chlamydia pneumoniae

Polimorfismos genéticos en distintos genes candidatos relacionados con el metabolismo lipídico, inflamación, trombosis, etc.

Polimorfismos en el gen de la apoE (mayor riesgo asociado al alelo E4)
 Polimorfismos en el gen de la proteína de transferencia en los ésteres del colesterol (CETP), confiriendo protección el alelo B2
 Polimorfismos en el gen de la MTHFR (riesgo asociado a la variante C677T)
 Polimorfismo en factor V Leiden
 Polimorfismo en la protrombina (mayor riesgo G20210A)
 Otros polimorfismos genéticos (PAI, fibrinógeno, COX, etc.)

LDL: lipoproteína de baja densidad; ICAM-1: molécula de adhesión intercelular de clase 1; VCAM-1: molécula de adhesión vascular de tipo 1; PAI-1: activador del plasminógeno tipo 1; MTHFR: 5-metil-tetrahidrofolato-homocisteína-S-metiltransferasa; COX: ciclooxigenasa.

sino porque una vez rotas son las más trombogénicas. Cuando la placa se rompe, la trombina perpetúa la activación de la cascada de la coagulación y la agregación plaquetaria, lo que es fundamental para garantizar la estabilidad del trombo que se forma superpuesto a dichas placas. Este trombo libera factores de crecimiento y vasoconstrictores plaquetarios que contribuirán a la estenosis del lu-

men vascular y, por tanto, a la inducción de los episodios isquémicos¹².

A continuación se analizará la contribución de los factores de riesgo, tanto clásicos como emergentes, que se han considerado más relevantes en este proceso.

Consumo de tabaco

El tabaco es el factor desencadenante de un alto porcentaje de episodios aterotrombóticos tanto de forma aguda como crónica. Causa daño directo al endotelio permitiendo la agregación plaquetaria y la formación de ateromas al aumentar su permeabilidad. El tabaco produce disfunción endotelial, a través de cambios estructurales a nivel celular y modificaciones funcionales no bien conocidas todavía pero que pueden ser observados en distintas localizaciones, ya sea en las arterias coronarias o en las arterias umbilicales de recién nacidos de madres fumadoras¹³. Los dos componentes básicos de los efectos del tabaco son la nicotina y el monóxido de carbono. La nicotina actúa a diferentes niveles la mayoría de los cuales están relacionados con la estimulación del sistema nervioso simpático y la liberación de catecolaminas. Adrenalina y noradrenalina aumentan la frecuencia cardíaca, presión arterial y el consumo de oxígeno miocárdico, produciendo vasoconstricción con disminución del flujo coronario. Además, la nicotina favorece la agregación plaquetaria por alteración de la función de la membrana de las plaquetas y por el aumento de trombina. El fibrinógeno también se incrementa y se altera el perfil lipídico caracterizado por un aumento de triglicéridos, colesterol unido a lipoproteínas de baja intensidad (c-LDL) y disminución de colesterol unido a lipoproteínas de alta intensidad (c-HDL). La nicotina también induce la alteración de la vasodilatación dependiente del endotelio por menor síntesis del óxido nítrico y de prostaciclina, con incremento de la respuesta vasoconstrictora a la endotelina 1. Paralelamente, el monóxido de carbono ocasiona una disminución del oxígeno que llega al corazón, favoreciendo la isquemia del miocardio. Estudios recientes han demostrado que los fumadores presentan una regulación aumentada del marcador CD40/CD40L así como de la agregación monocito-plaqueta que puede ser los responsables de gran parte de las consecuencias aterotrombóticas del consumo de tabaco¹⁴. El ligando CD40 (CD40L) y su receptor CD40 se expresan en el ateroma humano y en un amplio rango de células ligadas al ateroma. La unión de CD40 media un amplio espectro de reacciones proinflamatorias incluyendo la expresión de citocinas, moléculas de adhesión y factores de crecimiento. Además, el CD40L induce la expresión del factor tisular en las células endoteliales y en los monocitos mediando a su vez los efectos protrombóticos subsiguientes. De manera consistente con estas actividades se ha visto que la elevación del CD40L soluble se asocia con un riesgo incrementado de sufrir accidentes cardiovasculares y

sea pacientes con síndromes coronarios agudos ya en voluntarios inicialmente sanos. Harding et al¹⁴ han demostrado que los fumadores (cuando se comparan con no fumadores apareados por sexo y edad) poseen una expresión aumentada de CD40 en los monocitos (45,9+/-7,7% frente a 39,9 +/- 6,5%; p = 0,006), de CD40L en las plaquetas (2,9 +/-1,0% frente a 2,3 +/- 0,6%; p = 0,03), y en los agregados plaqueta-monocito (2,6 +/- 10,9% frente a 19,7 +/- 8,6%; p = 0,02). Además en los fumadores observaron un notable incremento de las concentraciones de proteína C reactiva en comparación con el grupo control. Este aumento en proteína C reactiva así como en otras proteínas de inflamación (haptoglobina, ceruloplasmina, etc.) ligadas a un aumento en las concentraciones de carboxihemoglobina en fumadores ha sido también recientemente descrita por Lind et al¹³ en una amplia cohorte compuesta por 2.901 fumadores, 1.685 ex fumadores y 1.489 personas no fumadoras. Estos y otros trabajos permiten conocer el complejo mecanismo de acción del tabaco sobre la aterotrombosis y aportan nuevas evidencias para la lucha contra este factor de riesgo tan prevalente y fácilmente prevenible. Es más, en personas fumadoras que han sufrido episodios isquémicos, el abandono del hábito tabáquico resulta en la reducción de nuevos episodios isquémicos con un sorprendente efecto inmediato. Los mecanismos como el vasospasmo, la reducción de la capacidad pulmonar y, sobre todo, la activación plaquetaria, que son rápidamente reversibles, pueden explicar los rápidos beneficios que se producen³.

Alteraciones del metabolismo lipídico

Concentraciones plasmáticas elevadas de colesterol total han sido tradicionalmente asociadas a un mayor riesgo de aterosclerosis y morbimortalidad cardiovascular. Los primeros resultados del estudio Framingham en la década de los 60 contribuyeron ampliamente a esta aceptación. Posteriormente se ha demostrado la distinta contribución del c-LDL y del c-HDL³. Así pues, existe un gran consenso acerca de la capacidad aterotrombótica del colesterol no HDL⁸. En general se acepta que el riesgo de estenosis es directamente proporcional a la concentración de la lipoproteína que contienen apoB (c-LDL, colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad [c-VLDL]). En los últimos años, se han realizado importantes estudios centrados en el tamaño y densidad de estas partículas, llegando a demostrar que el riesgo cardiovascular aumenta a medida que las LDL son más pequeñas y densas. También se ha demostrado un mayor riesgo cardiovascular a medida que aumenta el grado de oxidación de las LDL, proponiéndose como un factor clave en la progresión del ateroma. El proceso de disfunción endotelial inducido por las LDL oxidadas se inicia al producirse una disminución de la producción de óxido nítrico, así como un incremento de la expresión de moléculas de adhesión: VCAM-1 (molécula de adhesión vascular

de tipo 1) e ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular de clase 1) y de P-selectina, que propician la adhesión de los monocitos al endotelio dañado. Los monocitos circulantes son atraídos por la proteína quimiotáctica para monocitos (MCP-1), penetran en la pared y las LDL oxidadas facilitan su conversión en macrófagos. Éstos captan LDL oxidadas y se convierten en células espumosas que provocan apoptosis. La angiogénesis también contribuye al proceso aterosclerótico. Las células musculares lisas son activadas por la citocinas (interleucinas: IL-1, IL-6, IL-18, etc.) y el factor de crecimiento, que desde la capa media migran a la íntima del endotelio vascular y proliferan contribuyendo a la evolución de las lesiones¹¹. Aunque las concentraciones plasmáticas elevadas de triglicéridos también se han propuesto como un factor de riesgo cardiovascular, en la actualidad no existe un amplio consenso acerca de su contribución como factor de riesgo independiente. En cambio sí que existe una consistente evidencia sobre el papel protector de las concentraciones elevadas de c-HDL y las distintas manifestaciones de la ECV. De manera paralela a los estudios epidemiológicos que estiman un mayor riesgo de ECV en personas con concentraciones inferiores a 35 mg/dl o incluso 40 mg/dl, en los últimos años se ha avanzado mucho en los mecanismos celulares y moleculares responsables de esta protección. Actualmente se conoce que las HDL no sólo intervienen en el transporte reverso del colesterol, sino que también previenen la disfunción endotelial, inhiben la apoptosis, inhiben la activación de las plaquetas y del factor X, así como poseen propiedades antioxidantes. Viles-González et al¹⁵, en una excelente revisión detallan cada uno de estos mecanismos. De acuerdo con ello, el *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III*, ha establecido que concentraciones de c-HDL iguales o superiores a 60 mg/dl son un factor protector frente al desarrollo de cardiopatía isquémica. Ya que la oxidación de las LDL se considera el principal mecanismo en la iniciación y desarrollo de la aterosclerosis, los factores que limiten esta oxidación serán dianas importantes en la protección frente a este proceso. Varios autores han demostrado que las HDL reducen significativamente la oxidación de las LDL, apuntando que es la enzima paraoxonasa transportado por HDL el que inhibiría esta modificación oxidativa. Además, se ha demostrado que las HDL protegen frente a la disfunción endotelial al inhibir la expresión de moléculas de adhesión, tales como el ICAM-1 y el VCAM-1. También hay estudios que han mostrado que las HDL pueden incrementar la expresión de la sintasa endotelial del óxido nítrico que contribuye a la mejora de la vasodilatación del endotelio¹⁵. En cuanto a la posterior formación del trombo, las HDL también tienen un efecto protector actuando distintos niveles de este proceso incluyendo tanto la activación de la plaquetas como la cascada de la coagulación¹⁵. Por ello no es extraño que

en los últimos años la elevación de las concentraciones de HDL haya sido propuesta como un factor clave tanto en prevención primaria como en prevención secundaria. En prevención primaria, las actuaciones se centran más sobre las modificaciones del estilo de vida incluyendo cambios en la dieta, realización de ejercicio físico, disminución del peso corporal y abandono del hábito tabáquico¹⁶, mientras que en prevención secundaria, además de estas recomendaciones, se están depositando las esperanzas en nuevos fármacos capaces de aumentar las concentraciones de HDL, entre los que se encuentran los inhibidores de la enzima de transferencia de los ésteres del colesterol.

Diabetes

La diabetes tipo II ha sido reconocida como uno de los factores de riesgo más importante desde la publicación de los resultados específicos del estudio Framingham en la década de los 70. Actualmente existen en el mundo más de 100 millones de diabéticos (del 5 al 8%) de la población mundial, y este número se está incrementando año tras año. La mayoría de los diabéticos fallecen por ECV y en la actualidad, se estima que entre el 15 y el 20% de los pacientes que sufren un episodio coronario agudo son diabéticos¹⁷. La diabetes y sus alteraciones metabólicas asociadas como hiperinsulinemia, resistencia a la insulina, dislipemia, hipertensión, obesidad, etc., han sido consideradas importantes factores que incrementan el riesgo de aterotrombosis. Estos factores de riesgo pueden actuar promoviendo lo que se denomina un estado hipercoagulable que actúa como desencadenante de la trombogenicidad sanguínea. Por tanto, paralelamente al concepto de placa de alto riesgo, algunos autores hablan también del concepto de sangre de alto riesgo¹. Estos factores son capaces de iniciar el proceso aterotrombótico produciendo disfunción endotelial y activando los procesos inflamatorio y trombótico. Son consistentes los resultados de estudios epidemiológicos mostrando que los pacientes con diabetes tipo II tienen una mayor incidencia de episodios coronarios agudos trombóticos y peor evolución clínica que los no diabéticos. Además, las lesiones ateroscleróticas de diabéticos se caracterizan por mayor densidad de material lipídico y macrófagos, así como por poseer más material de origen trombótico, que las de los no diabéticos. Los pacientes diabéticos con angina inestable muestran mayor ulceración en la placa mayor formación de trombos intracoronarios que los pacientes no diabéticos¹⁷. Son múltiples los factores que contribuyen al estado de hipercoagulabilidad en los diabéticos. Entre ellos la dislipemia que suele caracterizar a estos individuos. Los diabéticos usualmente presentan concentraciones de c-HDL bajo, asociadas a elevadas concentraciones de c-LDL con partículas pequeñas y densas muy aterogénicas. Además, la glucosilación de las LDL es otro fenómeno muy común en los diabéticos.

Esta glucosilación hace que las LDL sean más sensibles a la oxidación favoreciendo la disfunción endotelial. La hiperglucemia diabética actúa también provocando la glucosilación no enzimática de distintas macromoléculas (hemoglobina, etc.) que dan lugar a agregados biomacromoleculares que contribuyen al inicio y al aumento de la inflamación induciendo VCAM-1 e ICAM-1. Por otra parte, la hiperglicemia incrementa la producción de especies reactivas del oxígeno, aumentando el estrés oxidativo. Paralelamente, las plaquetas de los pacientes diabéticos presentan hiperreactividad con hiperagregabilidad e incrementada adhesividad, reaccionando con leucocitos y otras células, produciéndose un mayor número de agregados de leucocitos-plaquetas circulantes. La diabetes también se asocia con concentraciones aumentadas de fibrinógeno, factor von Willebrand, factor VII, factor VIII e inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1). Todos estos mecanismos asociados al estado procoagulante y mayor riesgo aterotrombótico en los pacientes diabéticos hacen que sea necesario una mayor vigilancia en estos pacientes y una intensificación de la prevención primaria para frenar el aumento de la incidencia que se está detectando en esta enfermedad¹⁷.

Infecciones

Los agentes infecciosos se han implicado en la etiología de la aterosclerosis desde principios de 1900 y varias teorías se han formulado para explicar su mecanismo de acción. Recientemente, el interés por las infecciones ha resurgido gracias a las publicaciones de varios importantes estudios epidemiológicos coincidiendo en sus hallazgos acerca que la vacunación frente al virus de la gripe reducía a más de la mitad el riesgo de desarrollar enfermedad coronaria. Estos resultados han sido recientemente revisados y comentados por Madjid et al¹⁸. Además de *Haemophilus influenzae*, otros microorganismos entre los que se encuentran citomegalovirus, *Chlamydia pneumoniae* y *Helicobacter pylori* han sido propuestos como los principales agentes causales. Estos microorganismos pueden actuar activando múltiples mecanismos que ligan la infección con la aterotrombosis en los que la respuesta inflamatoria tiene un protagonismo esencial. Por una parte, los microorganismos pueden ejercer una acción directa sobre la aterogénesis residiendo en la pared vascular y provocando proliferación y migración celular, inhibición de la apoptosis con acumulación masiva de células, disfunción endotelial con efectos procoagulantes e inhibición de la función vasodilatadora seguido de expresión aumentada de citocinas, moléculas de adhesión y especies reactivas de oxígeno que pueden contribuir a la rotura de la placa. Pero por otra parte, además de esta acción directa, la infección crónica puede indirectamente influir en el riesgo cardiovascular incrementando la inflamación sistémica que puede resultar en un estado procoagulante a través de

distintos mecanismos incluyendo la participación de las proteínas de estrés, activación de las plaquetas, alteraciones del metabolismo lipídico, etc.¹⁹.

Hiperhomocisteinemia

La hiperhomocisteinemia se ha establecido recientemente como un nuevo factor de riesgo independiente de aterotrombosis. Una revisión más detallada se puede encontrar en el trabajo de Handy et al²⁰.

Polimorfismos genéticos

En los últimos 10 años se han descubierto centenares de polimorfismos genéticos asociados a un mayor o menor riesgo de enfermedad isquémica. Los que presentan una mayor consistencia se muestran en la tabla 2.

Conclusiones

La patología isquémica arterial es la responsable de un elevado número de defunciones, sin embargo los datos para conocer su verdadera incidencia son muy limitados. La cardiopatía isquémica, la enfermedad cerebrovascular, y la enfermedad arterial periférica son sus principales manifestaciones. En los últimos 20 años, la mortalidad por enfermedad cerebrovascular ha experimentado más de un 50% de decremento en nuestro país, disminución que ha sido mucho más ligera para la cardiopatía isquémica. Estos descensos en mortalidad contrastan con el incremento en los datos de morbilidad hospitalaria y alertan del creciente aumento en la demanda sanitaria en los próximos años. En cuanto a su distribución geográfica, persisten las diferencias entre provincias españolas. En la comparación internacional, las tasas de mortalidad por cardiopatía isquémica en España siguen siendo de las más bajas de Europa. En los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento de sus bases moleculares con el desarrollo del nuevo concepto de aterotrombosis. La importancia de la disfunción endotelial y de los estados procoagulantes ha permitido la visualización de los factores de riesgo desde una nueva perspectiva. Además de los factores de riesgo clásicos incluyendo la edad, consumo de tabaco, diabetes, dislipemias e hipertensión, están apareciendo nuevos factores emergentes entre los que podemos citar marcadores de inflamación, marcadores de trombosis/hemostasis, factores relacionados con las plaquetas, infecciones, hiperhomocisteinemia, así como centenares de polimorfismos genéticos en genes candidatos.

Bibliografía

- Corti R, Fuster V. New understanding, diagnosis, and prognosis of atherothrombosis and the role of imaging. *Am J Cardiol* 2003;91:17-26.
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-9.
- Kuller LH. Prevention of cardiovascular disease and the future of cardiovascular disease epidemiology. *Int J Epidemiol* AÑO;30(Suppl 1):66-72.
- WHO MONICA Project: A world-wide monitoring system for cardiovascular disease. *World Health Statist Ann* 1989. Genève: WHO 1989; p. 27-163.
- Boix R, Canellas S, Almazán J, Cerrato E, Meseguer M, Medrano MJ. Mortalidad cardiovascular en España. Año 2000. *Boletín Epidemiológico*, Ministerio de Sanidad y Consumo 2003;11(21):241-52.
- Diehm C, Schuster A, Allenberg JR, Darius H, Haberl R, Lange S, et al. High prevalence of peripheral arterial disease and co-morbidity in 6880 primary care patients: Cross-sectional study. *Atherosclerosis* 2004;95-105.
- Boix Martínez R, Aragonés Sanz N, Medrano Albiero MJ. Tendencias en la mortalidad por cardiopatía isquémica en las 50 provincias españolas. *Rev Esp Cardiol* 20;56:850-6.
- Niccoli G, Iacoveillo L, Cianflone D, Crea F. Coronary risk factors: new perspectives. *Int J Epidemiol* 2001;30:41-7.
- Villar Álvarez F, Banegas Banegas JR. Reducir las enfermedades cardiovasculares. Informe SESPAS 1999.
- Marrugat J, Elosua R, Martí H. Epidemiología de la cardiopatía isquémica en España: estimación del número de casos y las tendencias entre 1997 y 2005. *Rev Esp Cardiol* 2002;55:337-46.
- Viles-González JF, Anand SX, Zafar MU, Fuster V, Badimon JJ. Tissue factor coagulation pathway: A new therapeutic target in atherothrombosis. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;43:669-76.
- Rauch U, Osende JI, Fuster V, Badimon JJ, Fayad Z, Chesebro JH. Thrombus formation on atherosclerotic plaques: pathogenesis and clinical consequences. *Ann Intern Med* 2001;134:224-38.
- Lind P, Engstrom G, Stavenow L, Janzon L, Lindgarde F, Hedblad B. Risk of myocardial infarction and stroke in smokers is related to plasma levels of inflammation-sensitive proteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:577-82.
- Harding SA, Sarma J, Josephs DH, Cruden NL, Din JN, Twomey PJ, et al. Upregulation of the CD40/CD40 ligand dyad and platelet-monocyte aggregation in cigarette smokers. *Circulation* 2004;109:1926-9.
- Viles-González JF, Fuster V, Corti R, Badimon JJ. Emerging importance of HDL cholesterol in developing high-risk coronary plaques in acute coronary syndromes. *Curr Opin Cardiol* 2003;18:286-94.
- Lee KW, Lip GY. Effects of lifestyle on hemostasis, fibrinolysis, and platelet reactivity: A systematic review. *Arch Intern Med* 2003;163:2368-92.
- Biondi-Zoccai GG, Abbate A, Liuzzo G, Biasucci LM. Atherothrombosis, inflammation, and diabetes. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1071-7.
- Madjid M, Naghavi M, Litovsky S, Casscells SW. Influenza and cardiovascular disease: A new opportunity for prevention and the need for further studies. *Circulation* 2003;108:2730-6.
- Lindsberg PJ, Grau AJ. Inflammation and infections as risk factors for ischemic stroke. *Stroke* 2003;34:2518-32.
- Handy DE, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis: diagnosis and treatment. *Curr Atheroscler Rep* 2003;5:276-83.

HOW THROMBIN IS REGULATED

DAVID A. LANE

Department of Haematology, Imperial College London, Hammersmith Hospital Campus, London W12 0NN, UK.

Proteinases play crucial roles in biological processes involved in organism homeostasis. Their actions require tight regulation and coordination. Failure of regulation and coordination leads to disease. The haemostasis system involves activation, regulation and coordination of numerous proteinases. The complex reactions occur on activated or damaged cells, platelets and endothelial cells. In normal physiological conditions haemostasis is exquisitely initiated, controlled and terminated. Genetic or physiological perturbations, however, can lead to severe dysfunction, resulting in either haemorrhagic disorders or thromboembolic disease, illustrating the need for tight regulation of these proteolytic reactions. Central to the functioning of haemostasis are the roles of thrombin. Thrombin is generated from its inactive precursor prothrombin by factor Xa, following initiation of the haemostatic process. Thrombin then has multiple roles. The way in which thrombin interacts with its many substrates has been

carefully scrutinised in the past decades but until recently there has been little consideration of how its many functions are coordinated or regulated. Any understanding of regulation requires knowledge of its structure, how it interacts with its substrates and the role of any cofactors for its interaction with substrates. This presentation will review much recent work that has helped clarify structure function relationships of thrombin. It will then attempt to provide a cogent proposal that explains the direction thrombin takes when it is generated and how its multiple roles are coordinated.

¿OFRECERÁN ALGO DISTINTO LOS INHIBIDORES ORALES DE TROMBINA EN PATOLOGÍA ISQUÉMICA ARTERIAL?

J. KORIN

*Presidente de la Sociedad Argentina de Hematología.
Ex Presidente del Grupo Cooperativo Argentino
de Hemostasia y Trombosis. Consultorios Hematológicos.
Clínica Suizo-Argentina. Buenos Aires. Argentina.*

Introducción

El comienzo del milenio es el tiempo del desarrollo y evaluación del primero de una nueva clase de agentes antitrombóticos, los inhibidores orales de trombina.

¿Qué avances podremos esperar con ellos? Recurramos como ayuda a la evolución del empleo de otros agentes antitrombóticos. Después de más de 50 años de empleo de heparina, las heparinas de bajo peso molecular (HBPM) han ido encontrando su sitio y en muchos casos desplazando el fármaco no fraccionado en patologías que cursan con trombosis en territorio arterial. En más de 10 años de estudios comparando dichos agentes, sólo en alguno de ellos¹ las HBPM han demostrado superioridad. No obstante, se han impuesto por dos razones básicas: la comodidad de la administración subcutánea dada por su mejor biodisponibilidad y la independencia de la dosis respecto de pruebas de laboratorio, lo que las ha hecho indicables por médicos generales y cardiólogos, con prescindencia del hematólogo. También la heparina no fraccionada ha debido ceder posiciones ante la ausencia de adecuados reactivos estandarizados para el tiempo de tromboplastina parcial activado y el desigual apoyo de la industria farmacéutica. Parece ya lejano el postulado de fines de 1980 de que las HBPM por su escaso efecto inhibitor de la trombina producirían menos riesgo hemorrágico que la heparina convencional. En la patología arterial surgió la necesidad de impactar en múltiples blancos lo que llevó a la asociación de las HBPM

con trombolíticos, aspirina, clopidogrel e inhibidores de glucoproteína IIb-IIIa. Asimismo, la actual tendencia invasiva en el tratamiento de los síndromes coronarios agudos, y la indicación de agentes antitrombóticos por cardiólogos o hemodinamistas, ha terminado aumentando el riesgo hemorrágico por criterio TIMI, como lo demuestra el reciente estudio SINERGY². En cuanto a efectividad puede resumirse que, después de frustrados intentos de demostrar superioridad, las HBPM se han difundido con el simple criterio de no inferioridad.

Con los inhibidores orales de trombina, los resultados alcanzados hasta el momento en patología venosa y arterial, transcurren por similar camino. El logro de un parámetro de no inferioridad respecto de los dicumarínicos, de uso clínico tan antiguo como la heparina, será probablemente suficiente para desplazarlos de muchas de sus actuales indicaciones.

Resultados

Los datos presentados o publicados son aún escasos. En patología isquémica arterial contamos con: *a)* estudios comparativos entre warfarina y ximelagatran en tromboembolia cerebral de fuente cardíaca, la serie de estudios SPORTIF III³ y V⁴ (fibrilación auricular), y *b)* un trabajo comparativo contra placebo luego de infarto agudo de miocardio tratado con aspirina (estudio ESTEEM)⁵.

Respecto a los dos primeros, los resultados combinados muestran igual efectividad que los dicumarínicos (1,6% anual de sucesos isquémicos cerebrales) e igual complicación hemorrágica mayor y cerebral. Ambas ramas de pacientes con fibrilación auricular y un factor adicional de riesgo, seguidas por aproximadamente un año y medio, son cuestionablemente asimilables a la población clínica corriente. Los que tomaron warfarina estuvieron en rango 1,8-3,2 el 83% del tiempo y los otros recibieron ximelagatran 36 mg cada 12 h (un esquema difícil de lograr adherencia por mucho tiempo sin estricta supervisión médica).

En el ESTEEM se estudiaron pacientes con IAM con o sin elevación del segmento ST, enrolados dentro de las primeras 2 semanas, que recibieron aspirina con o sin ximelagatran en dosis diversas. Como en estudios previos, no se demostró relación dosis-respuesta para el antitrombótico. Este fue superior al placebo para reducir mortalidad, infarto no mortal e isquemia grave recurrente (12,7% frente a 16,3%) duplicando los riesgos de hemorragia mayor (1,8% frente a 0,9%). Considerando los eventos mortalidad, infarto y accidente cerebrovascular (ACV), la reducción de riesgo fue del 66% (7,4% frente a 11,1%). La dosis con la mejor relación de eficacia/seguridad fue 24 mg cada 12 h. Los anteriores resultados pueden compararse en forma indirecta con los obtenidos en otros 2 estudios realizados post-IAM en pacientes que recibieron aspirina con o sin anticoagulación oral con rango 2-3: el APRICOT-2 y el WA-

RIS-II. El APRICOT-2⁶ es un estudio angiográfico en el que se incluyeron pacientes con segmento ST elevado tratados exitosamente con fibrinolíticos. La rama que continuó sólo con aspirina sufrió reoclusión en el 28 y el 66 % estuvieron libres de muerte, infarto recurrente o revascularización. En cambio, la rama con anticoagulantes y aspirina tuvo 15 % de reoclusiones y en el 82 % permaneció libre de dichos eventos. El estudio WARIS-II⁷ comparó tres clases de tratamientos en pacientes post-IAM: aspirina (160 mg/día), warfarina (rango, 2,8-4,2) o su combinación con dosis de 75 mg e índice normalizado internacional (INR) blanco 2-2,5. La incidencia de muerte, reinfarto no fatal y ACV embólico fue de 20, 16,7 y 15 %, respectivamente. La hemorragia mayor fue 0,62 % por año con anticoagulación frente a 0,17 % con aspirina. La reducción del riesgo fue exclusiva para reinfarto y *stroke* (50 % para ambos). Por tanto, ambos estudios, de diseño diferente y con distintos pacientes post-IAM, muestran que los dicumarínicos asociados a aspirina son más efectivos que ésta sola, con un razonable incremento de hemorragia mayor. Sin embargo, el elevado número de pacientes con IAM que recibe angioplastia y *stents* y por ende, aspirina y clopidogrel plantea que en el futuro se debería evaluar en forma diferencial el tratamiento antitrombótico. Como ejemplo, en los pacientes con *stents*: aspirina-clopidogrel con o sin warfarina o ximelagatran y en los que no se realizó la intervención, aspirina frente a su combinación con clopidogrel, warfarina o ximelagatran.

Los síndromes coronarios agudos constituyen otra patología donde se han empleado dicumarínicos con resultados controvertidos. El estudio OASIS⁸, reveló que la muerte vascular, el IAM o el ACV en los pacientes anticoagulados que tuvieron buena adherencia al tratamiento fue menor que en los tratados con aspirina (6,1 % frente a 8,9 %) con un aumento de riesgo de hemorragia mayor de casi 3 veces. Este beneficio se perdió en los pacientes con baja adherencia y así, el resultado final fue neutro. En el estudio ASPECT-2⁹, la tasa de muerte, IAM o ACV fue del 9 % en los pacientes bajo aspirina, mientras que bajó al 5 % con la asociación dicumarínicos/aspirina o warfarina sola a INR elevado. Nuevamente, la conducta invasiva prevalente actualmente en estos cuadros, hace que más de la mitad de los pacientes sean intervenidos en hemodinamia y terminen recibiendo al menos por un mes aspirina y clopidogrel, tratamiento de elección desde el estudio CURE¹⁰. En este último, la combinación de muerte vascular, IAM o ACV, ocurrió en el 9,3 % de los tratados con ambos fármacos frente a 11,4 % en el grupo aspirina. Se observó hemorragia mayor en el 3,7 % de los pacientes con la asociación antiagregante frente a 2,7 % de los que sólo recibieron aspirina. Nuevamente, surge como en el IAM, la necesidad de dividir las futuras investigaciones entre los intervenidos en el árbol coronario, que recibirán la asociación antiagregante y los trata-

dos sólo medicamento en los cuales se deberían comparar la aspirina sola o combinada con clopidogrel, dicumarínicos o ximelagatran.

Otras indicaciones potenciales para los inhibidores orales de trombina son las patologías donde los dicumarínicos no han demostrado ser superiores a los antiagregantes. Un ejemplo de esto es el ACV no embólico, el cual representa dos tercios de todos los ACV. Los antiagregantes reducen en un 30 % el riesgo de recurrencia pero éste aún permanece elevado en los primeros años (mayor del 5 % anual). En el estudio WARSS¹¹, la warfarina, en rangos de INR 1,4-2,8, no demostró contribuir positivamente al tratamiento. Durante el período de seguimiento de 2 años, los dicumarínicos produjeron una tasa de recurrencia o muerte del 17,8 % frente a 16 % para la aspirina (325 mg/día), con aumento de la tasa de hemorragia mayor (2,2 % frente a 1,5 % anual).

Otra entidad en la que ocasionalmente se emplean dicumarínicos, especialmente luego de complicaciones trombóticas agudas, es la arteriopatía periférica, en la que no hay estudios comparativos recientes con antiagregantes. También allí podría estudiarse en el futuro el efecto antitrombótico de los inhibidores de trombina.

Más difícil es predecir qué lugar tendrán en los pacientes que tienen indicación definida y permanente de anticoagulación como por ejemplo, reemplazos valvulares. ¿Será prudente confiar en la adherencia a una medicación que se toma dos veces al día sin control específico de laboratorio? Basta pensar en el insuficiente grado de cumplimiento a la aspirina indicada crónicamente¹². Por otra parte, ¿existirán efectos positivos de la trombina que puedan ser inhibidos con estos agentes empleados a permanencia?

Efectos adversos

Con referencia a la toxicidad, debemos conocer mejor la verdadera importancia del aumento de transaminasas que en forma consistente ocurre entre el 5-7 % de los pacientes tratados más allá de los 2 meses. ¿Será necesario el control de laboratorio frecuente en todos los pacientes durante los primeros 6 meses? ¿En ese caso no estaremos simplemente cambiando la necesidad de medición del INR por la de las transaminasas? ¿Podrá usarse en pacientes con hepatopatías previas? ¿Se potenciará el daño hepático en la asociación con otros tóxicos –alcohol– u otros fármacos –p. ej., estatinas–? Dada su eliminación renal, ¿cuál será el nivel de creatinina seguro como para suspender su empleo?

Más interrogantes

Otras preguntas surgirán con su empleo clínico. ¿Cuál es la dosis a emplear: 24 o 36 mg cada 12 h? ¿Pacientes muy delgados o con marcada obesidad requerirán la misma dosis en tanto las HBPM se dosifican según el peso? ¿Cuál será la frecuencia del empleo de factor VIIa como antídoto en caso de he-

morragia intensa ya que su elevado coste se agregará a los que tendrán los inhibidores de trombina comparados con los dicumarínicos? ¿Cuál será la conducta recomendada para quien presente accidentes embólicos o isquémicos bajo este tratamiento? ¿En qué pacientes estos agentes serán el tratamiento inicial de elección? El seguimiento por clínicas especializadas en el control de anticoagulación y la motivación que promueve en los enfermos y/o los métodos de autocontrol domiciliario han resultado en un incremento notable en la efectividad de los actuales anticoagulantes orales. ¿Aceptarán quienes ya reciben estos últimos cambiar por inhibidores de trombina que no necesitan control o será más fácil reservar los nuevos agentes para los pacientes vírgenes de tratamiento o para aquéllos con recurrencias bajo dicumarínicos? En una encuesta realizada sobre 100 pacientes anticoagulados de nuestro servicio, 27% contestaron que no confían en un fármaco que no muestre el nivel de actividad por un análisis de laboratorio.

¿Cuál será el coste económico que los pacientes o los terceros agentes en los sistemas sanitarios aceptarán para estos fármacos si sólo cumplen un criterio de no inferioridad con respecto a las que vienen a reemplazar? A igual efectividad, es lícito disminuir la eficiencia con mayores costes? “Evitar la dilapidación de recursos es una obligación médica ya que esto puede convertir la medicina en una actividad económicamente inviable”¹³. En la misma encuesta anterior, 39% de los individuos señalaron que no están dispuestos a incrementar el coste actual de su tratamiento anticoagulante, aun con la comodidad de no tener que realizar controles de laboratorio. Un 32% aceptaría duplicar el coste de su medicación antitrombótica por la ventajas que implica el ximelagatran. Sólo un 11% estaría dispuesto a afrontar un coste tres o más veces superior al de los dicumarínicos.

Finalmente, ¿cuál será el resultado en el balance del empleo de la terapéutica convencional con fármacos con baja ventana terapéutica, en una población estrechamente controlada mes a mes por los Servicios de Anticoagulación y estos nuevos agentes “más amigables”¹⁴ que han de ser indicados por médicos generales y cardiólogos, sin seguridad de adherencia al tratamiento?

Conclusiones

Como es la regla en cada avance científico de valor, más preguntas que respuestas se generan en las etapas iniciales del nuevo conocimiento. Los inhibidores orales de trombina han llegado para quedarse y esperamos que cumplan con sus expectativas a un coste aceptable.

Bibliografía

1. Cohen M, Demers C, Gurfinkel EP, Turpie AGG, Fromell GJ, Goodman S, et al. The Efficacy and Safety of Subcutaneous Enoxaparin in Non-Q Wave Coronary Events Study Group. A Comparison of Low-Molecular-Weight Heparin with Unfractionated Heparin for Unstable Coronary Artery Disease. *N Engl J Med* 1977;337:447-52.
2. Mahaffey K, Ferguson J. American College of Cardiology 2004 Scientific Sessions 2004.
3. Olsson SB; Executive Steering Committee on behalf of the SPORTIF III Investigators. Stroke prevention with the oral direct thrombin inhibitor ximelagatran compared with warfarin in patients with non-valvular atrial fibrillation (SPORTIF III): randomised controlled trial. *Lancet*. 2003; 362:1691-8.
4. Halperin JL, for the Executive Steering Committee on behalf of the SPORTIF V Investigators. Stroke Prevention Using the Oral Thrombin Inhibitor Ximelagatran in Patients with Nonvalvular Atrial Fibrillation V-SPORTIF V. Program and abstracts from the American Heart Association Scientific Sessions 2003; November 9-12, 2003; Plenary Session VII: Late Breaking Clinical Trials.
5. Wallentin L, Wilcox RG, Weaver WD, Emanuelsson H, Goodvin A, Nyström P, et al; ESTEEM Investigators. Oral ximelagatran for secondary prophylaxis after myocardial infarction: the ESTEEM randomised controlled trial. *Lancet* 2003;362:789-97.
6. Brouwer MA, Van den Bergh PJ, Aengevaeren WR, Veen G, Luijten HE, Hertzberger DP, et al. Aspirin plus coumarin versus aspirin alone in the prevention of reocclusion after fibrinolysis for acute myocardial infarction: results of the Antithrombotics in the prevention of reocclusion in coronary thrombolysis (APRICOT)-2 trial. *Circulation* 2002;106: 659-65.
7. Hurlen M, Abdelnoor M, Smith P, Erikssen J, Arnesen H. Warfarin, aspirin, or both after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2002;347: 969-74.
8. The Organization to Assess Strategies for Ischemic Syndromes (OASIS). Effects of long-term, moderate-intensity oral anticoagulation in addition to aspirin in unstable angina. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:475-84.
9. Van Es RF, Jonker JJ, Verheugt FW, Deckers JW, Grobbee DE. Antithrombotics in the Secondary Prevention of Events in Coronary Thrombosis-2 (ASPECT-2) Research Group. Aspirin and coumadin after acute coronary syndromes (the ASPECT-2 study): a randomized controlled trial. *Lancet*. 2002;360:109-13.
10. The Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Events Trial Investigators. Effects of Clopidogrel in Addition to Aspirin in Patients with Acute Coronary Syndromes without ST-Segment Elevation. *N Engl J Med* 2001;345:494-502.
11. Mohr JP, Thompson JLP, Lazar RM, Levin B, Sacco RL, Furie KL, et al. For the Warfarin-Aspirin Recurrent Stroke Study Group. A Comparison of Warfarin and Aspirin for the Prevention of Recurrent Ischemic Stroke. *N Engl J Med* 2001;345:1444-51.
12. Cotter G, Shemesh E, Zehavi M, Dinur I, Rudnick A, Milo O, et al. Lack of aspirin effect: Aspirin resistance or resistance to taking Aspirin? *Am Heart J* 2004;147:293-300.
13. Agrest A. Mala práctica médica. En: Más reflexiones inexactas de un observador médico. 226-228. Biblioteca Médica Avenis. 2002. Buenos Aires. Argentina.
14. York M, Agarwal A, Ezekowitz M. Physicians' attitudes and the use of oral anticoagulants: surveying the present and envisioning future. *J Thromb Thrombolysis*, 2003;16:33-7.

TECNOLOGÍAS ALTERNATIVAS EN EL TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS (DONANTES ALTERNATIVOS, REGÍMENES DE ACONDICIONAMIENTO ATENUADOS, TRASPLANTE DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL)

COORDINADOR: A. TORRES. *Servicio de Hematología, Unidad de Trasplante de Progenitores Hematológicos, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba*

Resumen del simposio

Desde los albores del empleo clínico –prácticamente experimental– del trasplante de medula ósea (TMO) a mitad de los años 1950, hasta que en 1979 se convierte en una alternativa terapéutica real en el tratamiento de las hemopatías malignas, se han aportado una serie de avances que han sido claves para su aplicabilidad. Tratamientos de soporte con hemoderivados, antibióticos, antifúngicos, antivirales, el descubrimiento del sistema mayor de histocompatibilidad, la profilaxis y tratamiento de la enfermedad del injerto contra el huésped aguda (ElcHa) y crónica (ElcHc), etc., se desarrollaron en el antedicho período y han contribuido decisivamente al manejo del TMO. No obstante, los límites de aplicabilidad clínica eran muy reducidos a principios de la década de los años 1980. La histocompatibilidad (se utilizaban sólo donantes HLA-genéticamente idénticos) y la edad (generalmente por debajo de 40 años), eran criterios que tendían a disminuir la mortalidad relacionada con el TMO, bajando la toxicidad del régimen de acondicionamiento y/o la incidencia de formas graves de ElcHa.

La incorporación de nuevos agentes terapéuticos, tales como factores de crecimiento hematopoyético (G-CSF), antivirales (ganciclovir, aciclovir, valaciclovir, etc.), un mejor conocimiento de la histocompatibilidad, regímenes de acondicionamiento así como del manejo de las complicaciones del TMO (ElcHa y ElcHc) han hecho que al comienzo de los años 1990, se hayan sobrepasado ampliamente los anteriores límites de edad para los trasplantes HLA-gen-idénticos y se hayan incorporado los donantes HLA-fenotípicamente idénticos (generalmente no emparentados) como fuentes de TMO. Así mismo, han ido incrementándose las indicaciones de TMO, no sólo en el área de las hemopatías malignas, sino en enfermedades genéticas, metabólicas, hemoglobinopatías, etc.

A esta ampliación de indicaciones, ha seguido el uso de otras fuentes alternativas de progenitores hematopoyéticos, por lo que hoy tiende a hablarse de trasplante de éstos (TPH) más que de TMO. La sangre periférica con alto contenido de progenitores hematopoyéticos (células CD34+) movilizadas con quimioterapia, G-CSF o ambos, así como los progenitores de la sangre del cordón umbilical (SCU) son procedimientos cada vez más utilizados. También, la suavización de los regímenes de acondicionamiento, buscando más bien el efecto inmunoterápico de TPH que el erradicativo por radioquimioterapia, se ha incorporado en los últimos años, como una necesidad en orden a ampliar la edad y condiciones vitales en el momento de trasplante.

La necesidad de una valoración real de lo que han supuesto estas modificaciones respecto al trasplante tradicional, es lo que hace que se repitan revisiones o symposia como el que moderamos, para tratar de evidenciar avances o no respecto a los resultados iniciales de estos métodos. El incremento por ejemplo de los trasplantes no emparentados, merced a un sustancial aumento del número de donantes en los registros internacionales y a un mejor conocimiento y manejo del procedimiento, es de alrededor de un 800%. Igualmente un aumento similar se ha producido en el trasplante de SCU y por las mismas razones, debe ser evaluado contemplando los resultados actuales. Cuestiones tales como la desproporción de la dosis celular en el trasplante de SCU y el peso del receptor, se ha intentado corregir con técnicas de expansión *in vitro*, y los resultados y utilidad clínica de las mismas serán también evaluadas en este simposio.

La reducción de la intensidad del régimen de acondicionamiento ha supuesto también un verdadero acontecimiento, con una extensión inusitada de este tipo de trasplante. Incluso el grado de reducción de intensidad ha dado lugar a nueva nomenclatura en la Trasplantología (mini, micro, etc.). Sin embargo, los límites entre los diversos tipos, son a veces artificiosos y difíciles de establecer.

Toda esta avalancha tecnológica, ha creado bastante alteración en las indicaciones precisas del TPH, fraccionando la experiencia, sin protocolos prospectivos que han hecho que se sucedan con una frecuencia mayor de la deseable las valoraciones periódicas de los resultados, como la que nos ocupa en este simposio.

TRASPLANTE ALOGÉNICO CON ACONDICIONAMIENTO DE INTENSIDAD REDUCIDA EN NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

D. VALCÁRCEL Y R. MARTINO

Servicio de Hematología Clínica. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona.

Introducción

El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH) con acondicionamiento mieloablativo convencional basa su efecto en la erradicación de la celularidad neoplásica con la quimioterapia de acondicionamiento y en la obtención de un efecto injerto contra tumor (EICT), por medio del cual los linfocitos derivados del donante son capaces de reconocer y eliminar las células malignas residuales¹⁻⁵. Este efecto también explica la eficacia de las infusiones de linfocitos del donante en algunas patologías⁶⁻⁹.

A pesar de los avances logrados en los últimos años en el tratamiento de soporte, profilaxis y tratamiento de la enfermedad injerto contra huésped (EICH), y enfermedad por citomegalovirus (CMV), en la actualidad el alo-TPH convencional está reservado para pacientes menores de 55 años y con un buen estado general, debido a la elevada morbimortalidad asociada al procedimiento en los pacientes mayores de esta edad o que presentan otras patologías asociadas.

Sin embargo, es a partir de esta edad cuando son más frecuentes las enfermedades que se benefician de este procedimiento, y es muy frecuente que los tratamientos recibidos antes del alo-TPH hayan producido alteraciones en la función renal, hepática o cardíaca.

Hasta hace pocos años la forma de reducir la toxicidad relacionada con el alo-TPH ha sido intentando disminuir la incidencia de la EICH mediante la depleción de linfocitos T en el injerto. Sin embargo, esta modalidad de alo-TPH se sigue de una mayor incidencia de recaídas^{10,11}.

Diversos estudios preclínicos¹²⁻¹⁴ mostraron que no era necesario el uso de acondicionamientos muy citotóxicos ni mieloablativos para lograr el injerto estable del sistema inmunitario y de los progenitores hematopoyéticos alogénicos, dando pie a lo que se conoce como acondicionamientos de intensidad reducida (AIR), acondicionamientos no mieloablativos o "mini-trasplantes". El alo-TPH con AIR está siendo usado cada vez más frecuentemente desde que Giralt S et al¹⁵ demostraron su efectividad para lograr un implante hematopoyético estable con una mínima toxicidad extrahematológica. La finalidad de este tipo de trasplante es proporcionar un EICT sin la morbimortalidad asociada al acondicionamiento con altas dosis de quimio-radioterapia del

alo-TPH convencional. Esta reducción de la morbimortalidad hace de esta modalidad terapéutica una de las mejores opciones en pacientes de edad avanzada, segundos TPH o pacientes con otras patologías asociadas¹⁶⁻²⁴.

El esquema general del alo-TPH con AIR se muestra en la figura 1. Tras un acondicionamiento basado en la inmunosupresión, ya sea con fármacos análogos de las purinas y/o con irradiación corporal total (ICT), asociados o no a diferentes fármacos mielosupresores, se procede a la infusión de los progenitores hematopoyéticos. La inmunosupresión posterior produce a menudo un quimerismo mixto (QM) inicial, que proporciona un período de tolerancia inmunitaria bidireccional entre el huésped y el receptor²⁵, posteriormente el QM se debe convertir en quimerismo completo del donante (QC) con o sin la ayuda de infusiones de linfocitos del donante. En una última fase, con la intención de favorecer el efecto ICT se procederá a la retirada paulatina de la inmunosupresión, siempre y cuando la EICH esté bajo control. Acondicionamientos y profilaxis EICH.

En la década de 1990 Storb et al²⁶ demostraron en modelos caninos la posibilidad de obtener un buen injerto hematopoyético y un QM estable con ICT de 200 cGy pretrasplante y la combinación de ciclosporina A (CsA) y micofenolato mofetil (MMF) en el postrasplante. Hasta la fecha se han usado varios tipos de acondicionamiento distintos (tabla 1) sin que se haya establecido ninguno de ellos como superior a los demás. En general, todos los AIR siguen una misma filosofía que es proporcionar una inmunosupresión suficiente para que el injerto sea capaz por sí mismo de "hacerse espacio" en la médula del receptor.

El esquema general de los AIR se basa en la combinación de una potente inmunosupresión con fármacos análogos de las purinas (sobre todo fludarabina o dosis bajas de ICT o el uso de distintos fármacos quimioterápicos mielosupresores (ciclofosfamida, busulfán, melfalán, citarabina, idarrubicina, etc.)²⁷⁻³³. También se asocia a menudo globulina antitumoral (ATG)³⁴ o CAMPATH³⁵ con la intención de potenciar más la inmunosupresión y de esta forma reducir la EICH. En la tabla 1 se recogen los principales regímenes de AIR descritos.

Regímenes basados en fludarabina (o 2-CDA)

La fludarabina es el fármaco central en la mayor parte de los AIR. Es un fármaco capaz de inhibir la replicación y reparación del ADN, la síntesis de ARN e inductor de apoptosis de células linfoides y además un potente inmunosupresor con una escasa mielotoxicidad.

Esquema fludarabina-melfalán

Uno de los principales problemas con los AIR ha sido la progresión de la enfermedad de base antes

de la aparición del EICT, por este motivo investigadores del MD Anderson han desarrollado un esquema con fludarabina (25 mg/m² × 5 días) y melfalán (90 mg/m² × 2 días)³⁶ con la intención de evitar la progresión de la enfermedad en el postrasplante precoz en pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA), síndrome mielodisplásico (SMD), leucemia linfocítica aguda (LLA), linfoma no hodgkiniano (LNH) y enfermedad de Hodgkin, en su mayoría en estadios avanzados. En el estudio inicial, 8 pacientes recibieron 2-CDA en vez de fludarabina. Sin embargo, este fármaco se abandonó al documentarse un incremento de la mortalidad relacionada con el trasplante (MRT) debido a toxicidad renal³⁷, aunque esta toxicidad no se ha evidenciado en otros artículos que han usado el fármaco a menor dosis y en combinación con busulfán³⁸. La inmunosupresión post-TPH consistió en tacrolimus y metotrexato. Con este esquema terapéutico se observó una MRT de 37,4% a los 100 días y del 44,7% a los 2 años en pacientes con LMA, LLA, leucemia mieloblástica crónica (LMC) o linfoma. Las variables asociadas con mayor MRT fueron el uso de 2-CDA, donante no emparentado

(DNE), enfermedad refractaria o LMC transformada, haber recibido más de tres líneas de tratamiento previas y haber pasado más de 4 años desde el diagnóstico hasta el TPH³⁹. La mayor parte de los pacientes alcanzaron QC precoz con una mediana de células del donante en el día 30 del 100% (0-100). La probabilidad de EICH aguda grados II-IV y III-IV fue del 49 y 29%, respectivamente, y 16 de las 41 muertes acontecidas antes del día 100 se relacionaron con la EICH aguda.

Los TPH de DNE presentaron una tendencia a una mayor incidencia de EICH aguda y una mayor mortalidad por este motivo.

El mismo régimen de acondicionamiento con profilaxis de la EICH basada en tacrolimus y metotrexato fue usado en 22 pacientes con MM⁴⁰. La MRT fue del 19% en los 100 primeros días y del 40% al año. La incidencia de EICH ag II-IV y III-IV fue del 46 y 27%, respectivamente, y 6 pacientes presentaron EICH cr, extensa en todos los casos. La EICH fue la segunda causa de mortalidad tras la progresión de la enfermedad. La supervivencia global (SG) y supervivencia libre de enfermedad (SLE) a los 2 años fue

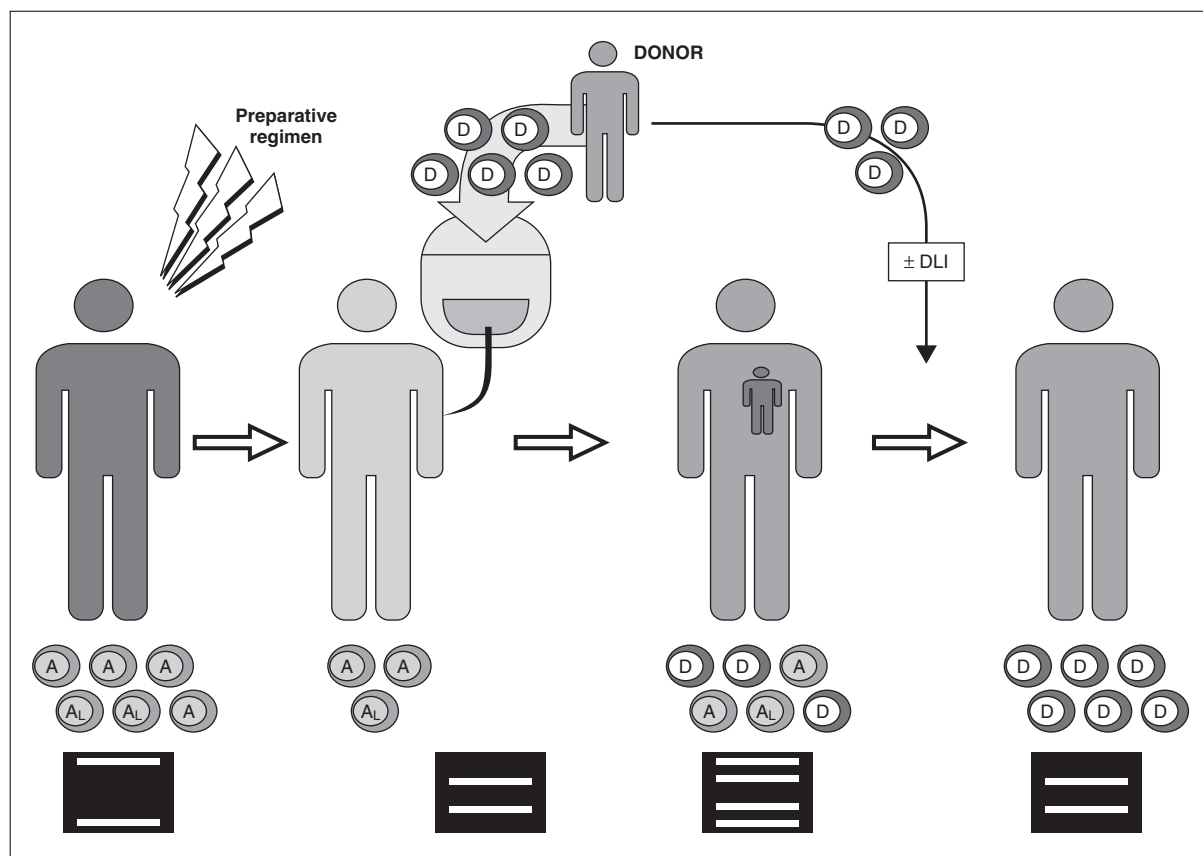


Figura 1. Esquema de trasplante de intensidad reducida. En este esquema se observa cómo tras un acondicionamiento de intensidad reducida, se realiza la infusión de progenitores hematopoyéticos dando lugar a una situación de quimerismo mixto (granulocitario y/o linfocitario en función del acondicionamiento y los tratamientos previos) que tras un período de tiempo variable (en función del tipo de acondicionamiento, la celularidad infundida, los tratamientos previos y la inmunosupresión post-TPH) se convierte, con o sin la ayuda de infusión de linfocitos del donante en quimerismo completo.

Tabla 1. Principales regímenes de acondicionamiento utilizados

Acondicionamiento/ inmunosupresión post-TPH	Diagnóstico	N.º de pacientes	Edad	Donante (%)	Fuente prog.	Reje (%)	MRT	EICH	
								Ac	Chro
200 cGy TBI/MMF-CsA	HM	45	56 (31-72)	DEI	SP	20	3/45 (7%)	47	ND
200 cGy TBI ± fludarabina (90)/MMF-CsA	HM	253	54 (18-73)	DEI	SP	5		46	41
	HM	52	48 (6-65)	DNEI (62) DNENI (38)	MO SP	12	100 días CI: 29% (95%CI: 17-41)	63	30
	*LA 1.ª RC	18	59 (36-73)	DEI	SP	11	100 días CI: 0 1 año CI: 17% (95% CI 0-35)	45	40
Flu (180)-Bu (8 mg/kg)-ATG (40 mg/kg)/CsA	HM	26	34 (1-61)	DEI	SP	0	4/26 (15%)	38	27
	Linfoma	23	41 (13-63)	DEI	SP	0	7/20 (30%)	34	9
	HM	16	17 (8-48)	DNE	MO	0	3/16 (19%)	44	0
Flu (150)-Bu (10 mg/kg/día) o Mel (200)/CsA-MTX	HM	76	53 (18-66)	DEI	SP	0	1 año CI: 20% (95%CI: 9-31)	32	ND
Flu (150)-Mel(140)-C AM- PATH1-H (100)/CsA+MTX (6 pt)	HM	44	41 (18-56)	DEI DNEI	SP MO	2	1 año CI: 11% (95%CI: 4-26)	5	2
	HM	47	44 (18-62)	DNEI DNENI (42)	MO	5	100 días CI: 11% (95%CI: 4-26)	21	7a
Flu (90-125)-Cy (900)/ MTX-CsA (2 nd SCT)	Linfoma	20	51 (31-68)	DEI	SP	0	ND	20	64
Flu (125)-Cy (120)/CsA ± ILD	HM y TS	15	50 (23-68)	DEI	SP	7	2/15 (13%)	64	37
Tio (10)-Cy(100/kg)/ MTX-CsA	HM	33	52 (43-60)	DEI	MO 51) SP (49)	0	22%	51	45
IrrTímica 700 cGy-Cy (150-200mg/kg)-ATG (60-90 mg/kg)	HM	21	44 (22-62)	DEI	MO	24	2/21 (10%)	29	ND
Flu (125) or 2-CDA(60) -Mel (140-180)/MTX-Tac	HM	86	52 (22-70)	DEI (45) DENI (8) DNEI (47)	MO (60) SP (40)	0	100 días: 37% 2 años: 44%	49	68

Para abreviaturas véase texto.

del 30 y 19%, respectivamente, con una supervivencia mediana de 10 meses.

En resumen la combinación de fludarabina y melfalán permite el injerto tanto de donante emparentado como de DNE, con una toxicidad tolerable, siendo los problemas más importantes la elevada incidencia de EICH ag y cr y la recaída o progresión de la enfermedad de base.

Esquema fludarabina-busulfán-ATG

El uso de fludarabina fue iniciado por investigadores de Jerusalén, que la usaron en combinación con busulfán a dosis de 8 mg/kg y ATG 40 mg/kg^{41,42}. El estudio de Slavin et al⁴³ lograron que todos los pa-

cientes alcanzaran un QC o un QM estable y una supervivencia del 77,5% a los 14 meses, sin embargo la mediana de edad de estos pacientes fue de 32 años. Como complicaciones significativas presentaron una incidencia de enfermedad hepática venooclusiva del 50% y una mortalidad atribuible a la EICH del 15%. Una modificación a este régimen es la descrita por Levine et al⁴⁴ en la que el uso de ATG se sustituyó por MMF e ICT (2 Gy), obteniendo injerto hematopoyético en todos los pacientes y un rápido QC.

Esquema fludarabina-ciclofosfamida

Otro régimen habitual ha sido la combinación de fludarabina con ciclofosfamida. Khouri et al⁴⁵ utili-

zaron un régimen de fludarabina 90-150 mg/m² y ciclofosfamida 900-2.000 mg/m² o citarabina 1.000 mg/m² y cisplatino 100 mg/m² en 15 pacientes con linfoma, logrando el injerto en 11/15 pacientes y 8 de estos 11 alcanzaron una remisión completa (RC). En un estudio posterior en 20 pacientes (edad mediana 51 años) con linfoma de bajo grado Khouri et al⁴⁶ usaron un acondicionamiento con ciclofosfamida y fludarabina y una posterior inmunosupresión con CsA y MMF, obteniendo un injerto en el 100% de los pacientes, un 100% de RC y una incidencia de EICH ag del 20%, con sólo un paciente con EICH ag grados III-IV. Tras 21 meses de seguimiento, la probabilidad de SLE fue del 84%.

Childs et al mostraron que un régimen similar con ciclofosfamida (60 mg/kg) y fludarabina (25 mg/m²) con una inmunosupresión posterior con CsA, era capaz de garantizar el injerto y la obtención de EICT en pacientes con neoplasias tanto hematológicas como tumores sólidos⁴⁷⁻⁴⁹.

Esquemas que incluyen CAMPATH

Con la intención de controlar la EICH el grupo inglés desarrolló un acondicionamiento que contenía CAMPATH-1H (anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra el antígeno CD52), proporcionando un mayor poder inmunosupresor, al producir cierto grado de depleción T *in vivo*^{50,51}. El régimen de acondicionamiento incluye fludarabina 30 mg/m² × 5 días, melfalán 140 mg/m² × 1 día y CAMPATH-1H en dosis de 20 mg/m² entre los días -8 y -4 y una inmunosupresión posterior con CsA sola o con metotrexato. Con este esquema se logró disminuir la incidencia de EICH ag, hasta el punto de que ningún paciente presentó EICH ag grados III-IV y sólo 5/43 pacientes desarrollaron EICH ag I-II, y un paciente EICH cr. A un año del TPH la MRT fue del 11%, la supervivencia libre de progresión del 71% y la supervivencia global del 73%. El uso de infusión de linfocitos del donante (ILD) se limitó a pacientes con progresión de la enfermedad de base y no fue efectivo. La incidencia de QM en este estudio fue superior a la descrita con los regímenes sin CAMPATH. El QM fue principalmente a expensas del compartimiento de linfocitos T, mientras que los estudios realizados en neutrófilos o linfocitos B mostraron en general quimerismos completos.

Este mismo régimen de acondicionamiento se utilizó para trasplantes de DNE^{52,53}, usando la médula ósea como fuente de progenitores. Los resultados fueron similares al estudio previo, con una muy baja incidencia de EICH ag (15% grado II y 6% grados III-IV) y una MRT en los 100 primeros días del 15%. Tras un año de seguimiento la SG y la SLE fueron del 75 y 61%, respectivamente.

Existe un estudio retrospectivo comparando dos AIR que se basan en melfalán-fludarabina; con la úni-

ca diferencia entre ellos en el tratamiento inmunosupresor: CAMPATH-1H + CsA frente a CsA + metotrexato¹²⁶. El estudio mostró una menor incidencia de EICH ag y cr en el grupo del CAMPATH (18% frente a 45%; p < 0,001 y 2% frente a 67%, respectivamente). El grupo del CAMPATH mostró una respuesta al tratamiento más tardía, de forma que a los 3 meses sólo el 21% de los pacientes que usaron CAMPATH estaba en RC frente al 48% en el grupo que usó CsA y metotrexato. Tras la ILD seguía manteniéndose la menor incidencia de EICH pero se igualaron las tasas de respuesta. Al cabo de un año tanto la SG como la SLE resultaron iguales en ambos grupos, y la incidencia de EICH ag y crónica tanto antes como después de la realización de la ILD en los casos que estuvo indicado se mantuvo muy inferior en el grupo del CAMPATH. La única excepción la constituyó el grupo de pacientes con MM, en el que la CsA+ metotrexato obtuvo un mejor resultado que el grupo del CAMPATH.

Regímenes basados en la ICT

El uso de dosis bajas de ICT (6 veces menores de las usadas en el Alo-TPH convencional), descrito por primera vez por McSweeney^{54,55}, supone el verdadero acondicionamiento no mieloablativo y está basado en un modelo canino estudiado por Storb et al⁵⁶⁻⁵⁸ en el que mediante un acondicionamiento basado en ICT 200 cGy y posterior inmunosupresión con MMF y CsA se lograba el injerto hematopoyético, con escasa toxicidad y se obtenía un QM estable en el tiempo. El estudio inicial⁵⁵ incluyó 45 pacientes con distintas neoplasias hematológicas y se realizó un acondicionamiento con ICT (2 Gy) e inmunosupresión posterior con CsA y MMF. A pesar de que todos los pacientes presentaron algún grado de injerto inicialmente, un 20% de los pacientes presentaron fallo de implante tardío coincidiendo con la suspensión del MMF o de la CsA (sobre todo en pacientes con pocas líneas de tratamiento previas, pacientes con LMC y pacientes con un quimerismo T bajo en el día +28) que se siguió en todos los casos de una recuperación hematopoyética autóloga. En el día +28 sólo el 14% de los pacientes mostraron QC en los linfocitos T. La toxicidad asociada al tratamiento fue mínima, permitiendo la realización del trasplante en el ámbito ambulatorio en la mayoría de los pacientes. La mayoría de los pacientes no presentaron neutropenia inferior a 0,5 × 10⁹/l y no requirieron transfusiones de plaquetas ni antibioticoterapia de amplio espectro. La incidencia de EICH ag (grados II-IV) fue del 45%, y la presencia de QC T en el día +28 predijo la aparición de EICH, que en general se inició tras la suspensión del MMF y respondió bien al tratamiento con corticoides. La incidencia de EICH cr fue del 74%. El uso de ILD fue útil para revertir el QM a QC, en los pacientes con menos del 50% de quimerismo del donante. La supervivencia global tras un segui-

miento mediano de 417 días fue del 67 %, la MRT fue del 7 % y la debida a progresión de la enfermedad del 27 %. Entre los pacientes en QC, se observó un 53 % de remisiones completas, incluyendo algunas remisiones moleculares en pacientes con LMC y LLC. La elevada incidencia de fallo de implante, llevó a este grupo a introducir fludarabina (30 mg/m²/día durante 3 días)⁵⁹ en el esquema de acondicionamiento lo que redujo a un 3 % la incidencia de fallo de implante, logrando un mayor quimerismo T precoz. La incidencia de EICH no se vio modificada con la adición de la fludarabina. Con un seguimiento de 289 días, la MRT a los 100 días fue del 6 %, y del 22 % en todo el seguimiento. La SG y SLE estimada a los 2 años fue del 50 y 40 %, respectivamente⁶⁰. Este esquema se utilizó en un estudio fase I⁶¹ a pacientes receptores de alo-TPH de DNE, de los cuales el 42 % había recibido un auto-TPH previamente. Los resultados de este esquema terapéutico mostraron unos mayores requerimientos transfusionales (aunque menores que en los regímenes estándar), una mayor frecuencia de QC en linfocitos T en el día +28 y una menor incidencia de fallo de implante (12 %) que al revés que en el estudio anterior se produjo en general de forma precoz y que se relacionó con un menor contenido de CD3 en el injerto y con el diagnóstico de SMD. La incidencia de EICH ag fue del 63 % y un 13 % de los pacientes desarrolló EICH grado IV. La incidencia de EICH cr fue del 30 %. El curso benigno de la EICH es explicado por los autores como consecuencia de la potente inmunosupresión basada en CsA-MMF, la presencia de un QM inicial que favorecería cierto grado de tolerancia y la ausencia de la "tormenta de citoquinas" descrita en el alo-TPH convencional. En el 45 % de los pacientes se logró RC (incluidos 6 pacientes en los que se había realizado previamente un auto-TPH). La MRT a los 100 días fue del 11 %, otros estudios que han usado AIR en el contexto de alo-TPH de DNE han comunicado MRT que oscilan entre 12,5 y 87,5 %⁶²⁻⁶⁴.

Esquemas en tándem

El autotrasplante ha logrado alargar la SLE en pacientes con diferentes neoplasias hematológicas, entre otras el MM y los síndromes linfoproliferativos, especialmente en aquellos casos de enfermedad quimiosensible. Sin embargo, existe un riesgo de recaída constante y no parece que se logre alcanzar un *plateau* en las curvas de SLE^{65,66}. El uso de técnicas de *purging* no parece haber logrado solucionar el problema de las recaídas⁶⁷⁻⁶⁹. El alo-TPH proporciona la doble ventaja de ser una fuente libre de enfermedad y proporcionar un EICT⁷⁰⁻⁷². Sin embargo, la elevada toxicidad de los regímenes de acondicionamiento convencional ha hecho que a pesar de una menor incidencia de recaída, los resultados globales del alo-TPH sean, en general, inferiores a los del auto-TPH⁷³⁻⁷⁵. En los últimos años,

aprovechando la escasa toxicidad de los AIR, se están realizando estudios para valorar el papel del "mini-alo" como tratamiento de rescate en pacientes que han recaído tras un auto-TPH⁷⁶⁻⁸² y como estrategia inicial de "trasplante en tándem" con un trasplante autólogo inicialmente con la intención de reducir al mínimo la masa tumoral y un alo-TPH con AIR posteriormente para proporcionar un EICT⁸³. Badros et al^{84,85} han estudiado el uso de alo-TPH con AIR como rescate tras la recaída tras auto-TPH en 31 pacientes con MM (edad mediana 56 años), usando un régimen basado en melfalán (con fludarabina e ICT en los trasplantes de DNE), la inmunoprolifaxis se hizo con CsA (y prednisona en los DNE) y se planearon ILD en caso de persistencia de QM o progresión de la enfermedad. El 89 % de los pacientes alcanzaron QC precoz y hubo 2 fallos de implante. Presentaron EICH ag 18 pacientes (58 %) y 10 de éstos progresaron a EICH cr. Nueve de las 12 muertes registradas se debieron a MRT, sólo hubo tres muertes en los 100 primeros días, la EICH y/o infecciones fueron la causa más frecuente de muerte. Se obtuvo un 60 % de RC y la SG y SLE medianas fueron 15 meses, siendo los resultados significativamente mejores para los pacientes que habían recibido un solo auto-TPH frente a dos previos auto-TPH. Varios grupos están investigando este planteamiento del TPH en tándem auto/mini-alo como tratamiento inicial, sin esperar a la progresión de la enfermedad. En la sesión plenaria del American Society of Hematology 2001 se presentaron los resultados preliminares y existen datos del seguimiento de los primeros 54 pacientes⁸⁶. El acondicionamiento del auto-TPH se realizó con melfalán 200 mg/m² y el alo-TPH con ICT (200 cGy), mientras que la inmunosupresión posterior se llevó a cabo con CsA y MMF. El tiempo mediano entre ambos trasplantes fue de 62 días. La mayor parte de los pacientes se trataron de forma ambulatoria y no presentaron neutropenia < 0,5 × 10⁹/l ni plaquetopenia < 50 × 209/l tras el alo-TPH. Todos los pacientes presentaron injerto hematopoyético y la mayoría QC precoz. La incidencia de EICH ag y EICH cr fue del 38 y 46 %, respectivamente. De los pacientes que no estaban en RC al TPH, el 57 % logró RC y el 27 % RP. Kroger et al⁸⁷ realizaron una estrategia similar en 17 pacientes, con un acondicionamiento distinto en el alo-TPH que se basó en fludarabina-melfalán (100 mg/m²) y ATG. Todos los pacientes presentaron injerto hematopoyético y QC precoz. La incidencia de EICH ag y cr fue del 38 y 40 %, respectivamente. El 18 % de los pacientes alcanzaron RC tras el auto-TPH y el 73 % tras el mini-alo. La MRT a los 100 días fue del 11 % y la SG y SLE a los 2 años fue del 74 y 56 %, respectivamente.

La estrategia del doble trasplante también se ha usado para los LNH y la enfermedad de Hodgkin. Carella et al⁸⁸ realizó un estudio en 15 pacientes que se realizaron un auto-TPH acondicionado con BEAM y 61 días después un AIR con fludarabina y ciclofos-

famida (900 mg/m^2), en caso de QM en el día +60, los pacientes se valoraban para recibir ILD. Trece pacientes lograron QC y 11 alcanzaron RC, incluidos 9 que sólo estaban en RP tras el auto-TPH. Siete pacientes presentaron EICH ag y 2 EICH cr. Diez pacientes están vivos y en RC con un seguimiento mediano de 270 días.

Implante y quimerismo

La mayor parte de los AIR, son mielotóxicos y se siguen de un período de aplasia variable. La recuperación granulocitaria y la recuperación plaquetaria se producen en la mayor parte de los estudios en torno a los días +12-+15. Una excepción son los regímenes verdaderamente no mieloablativos, donde no suele observarse neutropenia ni plaquetopenia que requiera transfusión profiláctica. Aunque no hay datos comparativos prospectivos, la mayor parte de los trabajos publicados sugieren que el AIR permite una reducción en la cantidad de unidades de hematíes y plaquetas utilizadas en el TPH. La cantidad de CD34+ infundidas tienen una importancia relativa en la recuperación granulopoyética ya que cifras superiores a $2,5 \times 10^6/\text{kg}$ en general garantizan el injerto hematopoyético, pero cifras superiores a ésta no parecen incrementar la velocidad con que se produce la recuperación hematológica¹²⁷.

A diferencia de lo que ocurre en el alo-TPH con acondicionamiento mieloablativo, los alo-TPH con AIR, presentan habitualmente una fase de QM en las fases iniciales que progresivamente se convierte en QC. El estudio del quimerismo en las distintas subpoblaciones celulares es especialmente importante en el contexto del AIR, ya que debido a la menor cantidad de linfocitos T en sangre periférica y médula ósea es posible que QM en linfocitos T pasen desapercibidos al estudiar sangre total no fraccionada.

En diversos estudios se han analizado los factores relacionados con la obtención de QC precoz siendo los factores más importantes la intensidad del tratamiento previo, la celularidad CD34+ y la celularidad CD3.

El estudio de quimerismo puede ser importante para valorar la posibilidad de fallo de implante. La presencia de un QM con menos de un 20-50 % de celularidad del donante en el día +28-+35 se asocia con una elevada probabilidad de fallo de implante, a pesar de la ILD.

Aunque sigue siendo objeto de debate, parece existir una relación directa entre la obtención de QC y la EICH ag.

Enfermedad injerto contra huésped

La incidencia de EICH en el alo-TPH con AIR es muy variable en los distintos estudios publicados. Mientras su incidencia es baja para algunos autores⁸⁹⁻⁹³, esta es comparable e incluso mayor que en alo-TPH convencional para otros autores⁹⁴⁻⁹⁸. Probablemente estas diferencias son debidas al uso de

diferentes pautas de acondicionamiento, diferentes regímenes de profilaxis y al uso de CAMPATH-1H, ATG e infusiones de linfocitos del donante. La EICH ag sigue siendo uno de los problemas más importantes en el Alo-TPH con AIR, ya que su desarrollo, sobre todo en grados III-IV se asocia a un incremento de la MRT¹²⁷.

Hay pocos estudios comparativos entre alo-TPH con AIR y alo-TPH convencional^{38,99}. En estos estudios la incidencia de EICH aguda grados II-IV, en pacientes de donante HLA-id emparentado es inferior en el trasplante con AIR, aunque la incidencia de EICH ag grados II-IV es similar en ambos tipos de trasplante. La incidencia de EICH ag, grados II-IV y grados II-IV, en donantes no emparentados es menor en el grupo AIR¹⁰⁰.

La aparición de EICH aguda es más tardía en los pacientes de los AIR¹⁰¹, con medianas de aparición de EICH ag que oscilan entre 35 días y 3 meses y algunos pacientes que han desarrollado EICH aguda más allá del día 100, lo que ha llevado a plantear la posibilidad de abandonar este punto de corte clásico entre EICH ag y cr e introducir el concepto de EICH ag de instauración tardía en el alo-TPH con AIR¹⁰².

La incidencia de EICH cr es similar en el alo-TPH con AIR a la observada con acondicionamientos convencionales^{38,103}. En distintos artículos la EICH cr se ha relacionado con una mayor supervivencia libre de enfermedad, lo que confirma el potencial curativo del EICT en este tipo de trasplantes¹⁰⁴⁻¹⁰⁶.

En un reciente estudio español, se sugiere que la celularidad CD34+ infundida y no la cantidad de CD3 tiene un impacto en el desarrollo de la EICH cr, de forma que entre los pacientes que reciben percentil superior a 75 y percentil inferior a 75 de la celularidad CD34, la incidencia de EICH cr es del 74 % frente a 47 % ($p = 0,02$). En este mismo estudio se relaciona la edad superior a 50 años y el uso de busulfán frente a melfalán con una mayor incidencia de EICH cr. Según los autores la ausencia de relación entre la cantidad de CD3 y la EICH puede ser debida a que todos los pacientes recibieron un mínimo de CD3 suficiente para el desarrollo de EICH¹²⁸.

Complicaciones infecciosas

El hecho de que los AIR produzcan una menor toxicidad tisular y menos neutropenia hace suponer que la incidencia de complicaciones infecciosas debe ser inferior a la encontrada en los acondicionamientos convencionales.

La incidencia de fiebre neutropénica oscila entre 35-80 %, en general menor que la observada en los acondicionamientos convencionales en los que es prácticamente del 100 %. En un estudio comparativo realizado en España¹⁰⁷, la incidencia de fiebre neutropénica fue del 70 % en el AIR y del 97 % en el acondicionamiento convencional ($p = 0,01$). Sin embargo, la incidencia de infecciones invasivas precoces fue similar en ambos grupos.

La incidencia de infección y enfermedad por CMV es muy variable, reflejando los distintos tipos de acondicionamiento e inmunosupresión usados. En un estudio retrospectivo realizado por el grupo español¹⁰⁸ se observó una menor incidencia de infección por CMV en los AIR (fludarabina y melfalán o busulfán) que en los acondicionamientos convencionales (21 % frente a 39%; $p = 0,005$) y también una menor incidencia de enfermedad por CMV (1 % frente a 9,5%; $p = 0,03$). En un estudio similar realizado en Seattle^{109,110}, los pacientes del grupo de AIR (ICT con/sin fludarabina) mostraron una tendencia a una menor incidencia de infección y enfermedad por CMV que los pacientes con acondicionamiento convencional, entre los pacientes de alto riesgo (serologías positivas en el donante y el receptor) en los 100 primeros días (53 % frente a 69%; $p = 0,11$ y 6 % frente a 19%; $p = 0,08$, respectivamente), pero se observó que la aparición de enfermedad por CMV era más tardía (mediana de aparición en el día +85 en el grupo AIR frente a +35 en el grupo de acondicionamiento convencional; $p = 0,02$), haciendo que la incidencia de enfermedad por CMV a los 365 días fuese la misma en ambos grupos. El estudio multivariado mostró que el AIR suponía un factor protector para enfermedad por CMV en los 100 primeros días (RR, 0,16; $p = 0,01$) pero un factor de riesgo para enfermedad por CMV tardía (RR, 3,86; $p = 0,03$) y que el hecho de haber presentado una infección por CMV en los 100 primeros días suponía un riesgo para el desarrollo de enfermedad por CMV tardía. Este retraso en la aparición de la infección y enfermedad por CMV también se ha visto en otros estudios (referencias) sugiriendo la necesidad de realizar un activo control del CMV tras el día 100 en pacientes trasplantados con AIR, podría ser explicada por varios motivos entre los que se encuentran: a) posible protección de los LT residuales del huésped; b) regímenes inmunosupresores distintos a los usados en el acondicionamiento convencional que podrían ser más inmunosupresores T, y c) desarrollo más tardío de la reactividad alógena y por tanto de la EICH y su tratamiento, ambos factores de riesgo para la enfermedad por CMV¹¹¹. La incidencia de infección por CMV es muy superior en los AIR que incluyen CAMPATH, con una incidencia del 84,8% (para los pacientes con serología para CMV del receptor y/o donante positiva) y una probabilidad de recidiva del 71%, 54% precoz y 47% tardía¹¹². En un estudio que incluyó ATG en el acondicionamiento, la incidencia de infección por CMV fue del 65% con una probabilidad de recidiva del 33%¹¹³. En los AIR con ICT, la incidencia de infección por CMV fue del 42¹¹⁴-60%¹¹⁵ y el desarrollo de EICH fue un factor de riesgo para este hecho¹¹⁶. La relación de la infección y enfermedad por CMV y la EICH es controvertida en el ámbito del AIR, mientras en trabajos no se ha evidenciado esta relación^{117,118}, en otros dos se ha encontrado el desarrollo de EICH como factor de riesgo para CMV^{119,120}.

Chakrabarti et al¹²¹ en un estudio en pacientes acondicionados con CAMPATH-1H, comunicaron una incidencia acumulada de infecciones respiratorias del 35% a los 18 meses postrasplante. Las infecciones se presentaron en general en las fases precoces del trasplante, un 23% en los primeros 30 días y el 46% en los primeros 100 días. Los virus más frecuentemente aislados fueron el virus parainfluenza 3 (46%) y el virus respiratorio sincitial (37%). Sin embargo la incidencia de mortalidad relacionada con la infección fue muy baja (8%).

La incidencia de infecciones fúngicas es variable en los distintos trabajos publicados, oscilando entre el 0^{122,123} y el 23%¹²⁴. El grupo de Seattle ha publicado recientemente un estudio con 163 pacientes que analiza las infecciones fúngicas (IFI) en el contexto del AIR¹²⁵. El acondicionamiento se realizó con ICT (200 cGy) con o sin fludarabina, la inmunosupresión post-TPH se realizó con CsA hasta el día +56-+180 y MMF hasta el día +27 y se realizó profilaxis con fluconazol 400 mg/día hasta el día +75. La incidencia acumulada al año de IFI probada o probable fue del 19% (31 pacientes), del 15% (25 pacientes) para infecciones invasivas por hongos filamentosos, 14% (23 pacientes) para aspergilosis invasiva y 5% (8 pacientes) para candidiasis invasiva. La mediana de aparición de aspergilosis invasiva fue en el día +107 (4-282) y sólo 2 pacientes (8%) lo presentaron antes del día +40. Comparando retrospectivamente con un grupo de pacientes que se trasplantaron con un acondicionamiento convencional no se encontraron diferencias significativas. Los factores relacionados con un mayor riesgo de IFI por hongos filamentosos fueron la presencia de EICH ag grados III-IV, EICH crónica extensa y la enfermedad por CMV. La probabilidad de IFI por hongos filamentosos en los pacientes con EICH aguda grados III-IV fue del 42%. De los 25 pacientes que presentaron IFI, 20 murieron (14 por una causa relacionada con la IFI) y la IFI por hongos filamentosos supuso el 39% de las MRT y 9% de la mortalidad global; entre los pacientes que desarrollaron una IFI por hongos filamentosos el uso de corticoides a dosis de 2 mg/kg o más supuso un factor de riesgo para mortalidad. Ocho pacientes presentaron IFI por *Candida* spp., la mediana de aparición de candidiasis invasiva fue en el día +156 (64-221). Las especies más frecuentemente aisladas fueron la *Candida glabrata* y la *Candida parapsilopsis*, sugiriendo una emergencia de especies de *Candida* resistentes al uso de azoles. Todos los pacientes que presentaron una candidiasis invasiva murieron por causas ajenas a la IFI. Martino et al¹²⁶ en un estudio en el que comparaba las complicaciones infecciosas entre pacientes alotrasplantados con AIR o con acondicionamiento convencional, tampoco encontró diferencias en la incidencia de IFI ni de mortalidad por causa infecciosa entre los 2 grupos.

Bibliografía

1. Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, et al. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med* 1979;300:1068-73.
2. Weiden PL, Sullivan KM, Flournoy N, Storb R, Thomas ED. Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease: contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation. *N Engl J Med* 1981;304:1529-33.
3. Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, et al. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med* 1979;300:1068-73.
4. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 1990;75:555-62.
5. Sullivan KM, Weiden PL, Storb R, et al. Influence of acute and chronic graft-versus-host disease on relapse and survival after bone marrow transplantation from HLA-identical siblings as treatment of acute and chronic leukemia. *Blood* 1989;73:1720-8.
6. Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, et al. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party Chronic Leukemia. *Blood* 1995;86:2041-50.
7. Kolb HJ, Mittermuller J, Clemm C, et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 1990;76:2462-5.
8. Porter DL. The graft-versus-tumor potential of allogeneic cell therapy: an update on donor leukocyte infusions and nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation. *J Hematother Stem Cell Res* 2001;10: 465-80.
9. Porter DL, Roth MS, McGarigle C, Ferrara JL, Antin JH. Induction of graft-versus-host disease as immunotherapy for relapsed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1994;330:100-6.
10. Ho VT, Soiffer RJ. The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2001;98:3192-204.
11. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 1990;75:555-62.
12. Storb R, Yu C, Wagner JL, et al. Stable mixed hematopoietic chimerism in DLA-identical littermate dogs given sublethal total body irradiation before and pharmacological immunosuppression after marrow transplantation. *Blood* 1997;89:3048-54.
13. Yu C, Storb R, Mathey B, et al. DLA-identical bone marrow grafts after low-dose total body irradiation: effects of high-dose corticosteroids and cyclosporine on engraftment. *Blood* 1995;86:4376-81.
14. Sykes M, Szot GL, Swenson KA, Pearson DA. Induction of high levels of allogeneic hematopoietic reconstitution and donor-specific tolerance without myelosuppressive conditioning. *Nat Med* 1997;3:783-7.
15. Giralto 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.
16. Giralto 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.
17. Grigg A, Bardy P, Byron K, Seymour J.F, Szer J. Fludarabine-based nonmyeloablative chemotherapy followed by infusion of HLA-identical stem cells for relapsed leukaemia and lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 2003;23:107-10.
18. Martino R, Caballero MD, Canals C, et al. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning: results of a prospective multicentre study. *Br J Haematol* 2001;115:653-9.
19. Carella AM, Cavaliere M, Lerma E, et al. Autografting followed by nonmyeloablative immunosuppressive chemotherapy and allogeneic peripheral-blood hematopoietic stem-cell transplantation as treatment of resistant Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2000;18:3918-24.
20. Giralto 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.
21. Martino R, Caballero MD, Canals C, et al. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning: results of a prospective multicentre study. *Br J Haematol* 2001;115:653-9.
22. Khouri I, Giralto S, Champlin R. Non-myeloablative allogeneic hematopoietic transplantation and induction of graft-versus-malignancy. *Cancer Treat Res* 2002;110:137-47.
23. McSweeney PA, Niederwieser D, Shizuru JA, et al. Outpatient allografting with minimally myelosuppressive, immunosuppressive conditioning of low dose TBI and postgrafting cyclosporine and mycophenolate mofetil. *Blood* 1999;94:393a.
24. 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.
25. McSweeney PA, Storb R. Mixed chimerism: preclinical studies and clinical applications. *Biol Blood Marrow Transplant* 1999;5:192-203.
26. Carella AM, Champlin R, Slavin S, McSweeney PA, Storb R. Mini.allo-grafts: ongoing trials in humans. *Bone Marrow Transplant* 2000;25:345-50.
27. Childs R, Clave E, Contentin N, et al. Engraftment kinetics after nonmyeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: full donor T-cell chimerism precedes alloimmune responses. *Blood* 1999;94:3234-41.
28. Carella AM, Giralto S, Slavin S. Low intensity regimens with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation as treatment of hematologic neoplasia. *Haematologica* 2000;85:304-13.
29. 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.
30. Porter DL. The graft-versus-tumor potential of allogeneic cell therapy: an update on donor leukocyte infusions and nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation. *J Hematother Stem Cell Res* 2001;10: 465-80.
31. 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.
32. Giralto 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.
33. Sykes M, Preffer F, McAfee S, et al. Mixed lymphohaemopoietic chimerism and graft-versus-lymphoma effects after non-myeloablative therapy and HLA-mismatched bone-marrow transplantation. *Lancet* 1999;353:1755-9.
34. 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.
35. Kottaridis PD, Milligan DW, Chopra R, et al. *In vivo* CAMPATH-1H prevents GvHD following nonmyeloablative stem-cell transplantation. *Cytotherapy*. 2001;3:197-201.
36. Giralto S, Thall PF, Khouri I, et al. Melphalan and purine analog-containing preparative regimens: reduced-intensity conditioning for patients with hematologic malignancies undergoing allogeneic progenitor cell transplantation. *Blood* 2001;97:631-7.
37. Giralto S, Thall PF, Khouri I, et al. Melphalan and purine analog-containing preparative regimens: reduced-intensity conditioning for patients with hematologic malignancies undergoing allogeneic progenitor cell transplantation. *Blood* 2001;97:631-7.
38. Mineishi S, Kanda Y, Saito T, et al. Impact of graft-versus-host disease in reduced-intensity stem cell transplantation (RIST) for patients with hematological malignancies. *Br J Haematol* 2003;121:296-303.
39. Levine JE, Uberti JP, Ayash L, et al. Lowered-intensity preparative regimen for allogeneic stem cell transplantation delays acute graft-versus-host disease but does not improve outcome for advanced hematologic malignancy. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003;9:189-97.
40. Giralto S, Alemán A, Anagnostopoulos A, et al. Fludarabine/melphalan conditioning for allogeneic transplantation in patients with multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant* 2002;30:367-73.
41. 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.
42. Nagler A, Slavin S, Varadi G, et al. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation using a fludarabine-based low intensity conditioning regimen for malignant lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 2000;25:1021-8.
43. 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.
44. Levine JE, Uberti JP, Ayash L, et al. Lowered-intensity preparative regimen for allogeneic stem cell transplantation delays acute graft-versus-host disease but does not improve outcome for advanced hematologic malignancy. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003;9:189-97.
45. 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.
46. Khouri IF, Saliba RM, Giralto SA, 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.
47. Childs R, Clavé E, Contentin N, et al. Engraftment kinetics after nonmyeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: full donor T-cell chimerism precedes alloimmune responses. *Blood* 1999;94:3234-41.
48. Childs R, Chernoff A, Contentin N, et al. Regression of metastatic renal-cell carcinoma after nonmyeloablative allogeneic peripheral-blood stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 2000;343:750-8.
49. Childs R, Drachenberg D. Allogeneic stem cell transplantation for renal cell carcinoma. *Curr Opin Urol* 2001;11:495-502.
50. Kottaridis PD, Milligan DW, Chopra R, et al. *In vivo* CAMPATH-1H prevents graft-versus-host disease following nonmyeloablative stem cell transplantation. *Blood* 2000;96:2419-25.

51. Hale G, Waldmann H. Recent results using CAMPATH-1 antibodies to control GVHD and graft rejection. *Bone Marrow Transplant* 1996;17:305-8.
52. Kottaridis PD, Milligan DW, Chopra R, et al. *In vivo* CAMPATH-1H prevents graft-versus-host disease following nonmyeloablative stem cell transplantation. *Blood* 2000;96:2419-25.
53. Hale G, Waldmann H. Recent results using CAMPATH-1 antibodies to control GVHD and graft rejection. *Bone Marrow Transplant* 1996;17:305-8.
54. McSweeney PA, Niederwieser D, Shizuru JA, et al. Outpatient allografting with minimally myelosuppressive, immunosuppressive conditioning of low dose TBI and postgrafting cyclosporine and mycophenolate mofetil. *Blood* 1999;94:393a.
55. McSweeney PA, Niederwieser D, Shizuru JA, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-host-tumor effects. *Blood* 2001;97:3390-400.
56. Storb R, Raff RF, Appelbaum FR, et al. Comparison of fractionated to single-dose total body irradiation in conditioning canine littermates for DLA-identical marrow grafts. *Blood* 1989;74:1139-43.
57. Storb R, Raff RF, Graham T, et al. Marrow toxicity of fractionated vs. single dose total body irradiation is identical in a canine model. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993;26:275-83.
58. Storb R, Yu C, Zauha JM, et al. Stable mixed hematopoietic chimerism in dogs given donor antigen, CTLA4lg, and 100 cGy total body irradiation before and pharmacologic immunosuppression after marrow transplant. *Blood* 1999;94:2523-9.
59. Sandmaier BM, Maloney DG, Gooley T, et al. Nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) from HLA-matched related donors for patients with hematological malignancies: clinical results of a TBI-based conditioning regimen (abstract). *Blood*. 2001; 98 (part 1):742a-743a#3093.
60. Maloney DG, Sandmaier BM, Mackinnon S, Shizuru JA. Non-Myeloablative Transplantation. *Hematology*. 2002;2002:392.
61. Niederwieser D, Maris M, Shizuru JA, et al. Low-dose total body irradiation (TBI) and fludarabine followed by hematopoietic cell transplantation (HCT) from HLA-matched or mismatched unrelated donors and postgrafting immunosuppression with cyclosporine and mycophenolate mofetil (MMF) can induce durable complete chimerism and sustained remissions in patients with hematological diseases. *Blood* 2003;101:1620-9.
62. Nagler A, Aker M, Or R, et al. Low-intensity conditioning is sufficient to ensure engraftment in matched unrelated bone marrow transplantation. *Exp Hematol* 2001;29:362-70.
63. Chakraverty R, Peggs K, Chopra R, et al. Limiting transplantation-related mortality following unrelated donor stem cell transplantation by using a nonmyeloablative conditioning regimen. *Blood* 2002;99:1071-8.
64. Giral S, Thall PF, Khouri I, et al. Melphalan and purine analog-containing preparative regimens: reduced-intensity conditioning for patients with hematologic malignancies undergoing allogeneic progenitor cell transplantation. *Blood* 2001;97:631-7.
65. Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, et al. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Francais du Myelome. *N Engl J Med* 1996;335:91-7.
66. 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.
67. Stewart AK, Vescio R, Schiller G, et al. Purging of autologous peripheral-blood stem cells using CD34 selection does not improve overall or progression-free survival after high-dose chemotherapy for multiple myeloma: results of a multicenter randomized controlled trial. *J Clin Oncol* 2001;19:3771-9.
68. Barbui AM, Galli M, Dotti G, et al. Negative selection of peripheral blood stem cells to support a tandem autologous transplantation programme in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2002;116:202-10.
69. Gupta D, Bybee A, Cooke F, et al. CD34 + -selected peripheral blood progenitor cell transplantation in patients with multiple myeloma: tumour cell contamination and outcome. *Br J Haematol* 1999;104:166-77.
70. Mehta J, Singhal S. Graft-versus-myeloma. *Bone Marrow Transplant* 1998;22:835-43.
71. Mehta J, Tricot G, Jagannath S, et al. Salvage autologous or allogeneic transplantation for multiple myeloma refractory to or relapsing after a first-line autograft? *Bone Marrow Transplant* 1998;21:887-92.
72. Slavin S, Morecki S, Weiss L, Or R. Donor lymphocyte infusion: the use of alloreactive and tumor-reactive lymphocytes for immunotherapy of malignant and nonmalignant diseases in conjunction with allogeneic stem cell transplantation. *J Hematother Stem Cell Res* 2002;11:265-76.
73. Bjorkstrand BB, Ljungman P, Svensson H, et al. Allogeneic bone marrow transplantation versus autologous stem cell transplantation in multiple myeloma: a retrospective case-matched study from the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood* 1996;88:4711-8.
74. Mehta J, Tricot G, Jagannath S, et al. Salvage autologous or allogeneic transplantation for multiple myeloma refractory to or relapsing after a first-line autograft? *Bone Marrow Transplant* 1998;21:887-92.
75. Radich JP, Gooley T, Sanders JE, et al. Second allogeneic transplantation after failure of first autologous transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2000;6:272-9.
76. Badros A, Barlogie B, Morris C, et al. High response rate in refractory and poor-risk multiple myeloma after allotransplantation using a nonmyeloablative conditioning regimen and donor lymphocyte infusions. *Blood* 2001;97:2574-9.
77. Badros A, Barlogie B, Siegel E, et al. Improved outcome of allogeneic transplantation in high-risk multiple myeloma patients after nonmyeloablative conditioning. *J Clin Oncol* 2002;20:1295-303.
78. Dey BR, McAfee S, Sackstein R, et al. Successful allogeneic stem cell transplantation with nonmyeloablative conditioning in patients with relapsed hematologic malignancy following autologous stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001;7:604-12.
79. Giral S, Aleman A, Anagnostopoulos A, et al. Fludarabine/melphalan conditioning for allogeneic transplantation in patients with multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant* 2002;30:367-73.
80. Garban F, Attal M, Rossi JF, et al. Immunotherapy by nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation in multiple myeloma: results of a pilot study as salvage therapy after autologous transplantation. *Leukemia* 2001;15:642-6.
81. Anderlini P, Giral S, Andersson B, et al. Allogeneic stem cell transplantation with fludarabine-based, less intensive conditioning regimens as adoptive immunotherapy in advanced Hodgkin's disease. *Bone Marrow Transplant*. 2000;26:615-20.
82. Mohty M, Fegueux N, Exbrayat C, et al. Reduced intensity conditioning: enhanced graft-versus-tumor effect following dose-reduced conditioning and allogeneic transplantation for refractory lymphoid malignancies after high-dose therapy. *Bone Marrow Transplant* 2001;28:335-9.
83. Sureda A, Schmitz N. Allogeneic stem cell transplantation after reduced-intensity conditioning in lymphoid malignancies. *Ann Hematol* 2003;82:1-13.
84. Badros A, Barlogie B, Morris C, et al. High response rate in refractory and poor-risk multiple myeloma after allotransplantation using a nonmyeloablative conditioning regimen and donor lymphocyte infusions. *Blood* 2001;97:2574-9.
85. Badros A, Barlogie B, Siegel E, et al. Improved outcome of allogeneic transplantation in high-risk multiple myeloma patients after nonmyeloablative conditioning. *J Clin Oncol* 2002;20:1295-303.
86. Maloney DG, Sandmaier BM, Mackinnon S, Shizuru JA. Non-Myeloablative Transplantation. *Hematology* 2002;2002:392.
87. Kroger N, Schwerdtfeger R, Kiehl M, et al. Autologous stem cell transplantation followed by a dose-reduced allograft induces high complete remission rate in multiple myeloma. *Blood* 2002;100:755.
88. Carella AM, Cavaliere M, Lerma E, et al. Autografting followed by nonmyeloablative immunosuppressive chemotherapy and allogeneic peripheral-blood hematopoietic stem-cell transplantation as treatment of resistant Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2000;18:3918-24.
89. Chakraverty R, Peggs K, Chopra R, et al. Limiting transplantation-related mortality following unrelated donor stem cell transplantation by using a nonmyeloablative conditioning regimen. *Blood* 2002;99:1071-8.
90. 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;89:4531-36.
91. 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.
92. Kottaridis PD, Milligan DW, Chopra R, et al. *In vivo* CAMPATH-1H prevents graft-versus-host disease following nonmyeloablative stem cell transplantation. *Blood* 2000;96:2419-25.
93. Martino R, Caballero MD, Canals C, et al. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning: results of a prospective multicentre study. *Br J Haematol* 2001;115:653-9.
94. Giral S, Thall PF, Khouri I, et al. Melphalan and purine analog-containing preparative regimens: reduced-intensity conditioning for patients with hematologic malignancies undergoing allogeneic progenitor cell transplantation. *Blood* 2001;97:631-7.
95. Childs R, Clave E, Contentin N, et al. Engraftment kinetics after nonmyeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: full donor T-cell chimerism precedes alloimmune responses. *Blood* 1999;94:3234-41.
96. Dey BR, McAfee S, Sackstein R, et al. Successful allogeneic stem cell transplantation with nonmyeloablative conditioning in patients with relapsed hematologic malignancy following autologous stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001;7:604-12.
97. Mattsson J, Uzunel M, Brune M, et al. Mixed chimerism is common at the time of acute graft-versus-host disease and disease response in patients receiving nonmyeloablative conditioning and allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2001;115:935-44.
98. McSweeney PA, Niederwieser D, Shizuru JA, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-host-tumor effects. *Blood* 2001;97:3390-400.
99. Mielcarek M, Martin PJ, Leisenring W, et al. Graft-Versus-Host Disease after Non-Myeloablative versus Conventional Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Blood* 2003; prepublished inline.
100. Mielcarek M, Martin PJ, Leisenring W, et al. Graft-Versus-Host Disease after Non-Myeloablative versus Conventional Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Blood* 2003; prepublished inline.
101. Mielcarek M, Martin PJ, Leisenring W, et al. Graft-Versus-Host Disease after Non-Myeloablative versus Conventional Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Blood* 2003; prepublished inline.

102. Mielcarek M, Martin PJ, Leisenring W, et al. Graft-Versus-Host Disease after Non-Myeloablative versus Conventional Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Blood* 2003; prepublished online.
103. Mielcarek M, Martin PJ, Leisenring W, et al. Graft-Versus-Host Disease after Non-Myeloablative versus Conventional Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Blood* 2003; prepublished online.
104. Childs R, Clave E, Contentin N, et al. Engraftment kinetics after non-myeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: full donor T-cell chimerism precedes alloimmune responses. *Blood* 1999;94:3234-41.
105. Mattsson J, Uzunel M, Brune M, et al. Mixed chimaerism is common at the time of acute graft-versus-host disease and disease response in patients receiving non-myeloablative conditioning and allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2001;115:935-44.
106. Valcarcel D, Martino R, Caballero D, et al. Chimerism analysis following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning. *Bone Marrow Transplant* 2003;31: 387-92.
107. Martino R, Caballero MD, Canals C, et al. Reduced-intensity conditioning reduces the risk of severe infections after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001;28:341-7.
108. Martino R, Caballero MD, Canals C, et al. Reduced-intensity conditioning reduces the risk of severe infections after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001;28:341-7.
109. Hagen EA, Stern H, Porter D, et al. High rate of invasive fungal infections following nonmyeloablative allogeneic transplantation. *Clin Infect Dis* 2003;36:9-15.
110. Junghans C, Boeckh M, Carter RA, et al. Incidence and outcome of cytomegalovirus infections following nonmyeloablative compared with myeloablative allogeneic stem cell transplantation, a matched control study. *Blood* 2002;99:1978-85.
111. Junghans C, Boeckh M, Carter RA, et al. Incidence and outcome of cytomegalovirus infections following nonmyeloablative compared with myeloablative allogeneic stem cell transplantation, a matched control study. *Blood* 2002;99:1978-85.
112. Chakrabarti S. Increased CMV infection following nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation: a search for the guilty. *Blood* 2003;101:2071.
113. Mohty M, Faucher C, Vey N, et al. High rate of secondary viral and bacterial infections in patients undergoing allogeneic bone marrow mini-transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000;26:251-5.
114. Mossad SB, Avery RK, Longworth DL, et al. Infectious complications within the first year after nonmyeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001;28:491-5.
115. Fukuda T, Boeckh M, Carter RA, et al. Invasive fungal infections in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation after nonmyeloablative conditioning: risks and outcomes. *Blood* 2003.
116. Mossad SB, Avery RK, Longworth DL, et al. Infectious complications within the first year after nonmyeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001;28:491-5.
117. Martino R, Caballero MD, Canals C, et al. Reduced-intensity conditioning reduces the risk of severe infections after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001;28:341-7.
118. Mohty M, Faucher C, Vey N, et al. High rate of secondary viral and bacterial infections in patients undergoing allogeneic bone marrow mini-transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000;26:251-5.
119. Junghans C, Boeckh M, Carter RA, et al. Incidence and outcome of cytomegalovirus infections following nonmyeloablative compared with myeloablative allogeneic stem cell transplantation, a matched control study. *Blood* 2002;99:1978-85.
120. Mossad SB, Avery RK, Longworth DL, et al. Infectious complications within the first year after nonmyeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001;28:491-5.
121. Chakrabarti S, Avivi I, Mackinnon S, et al. Respiratory virus infections in transplant recipients after reduced-intensity conditioning with Campath-1H: high incidence but low mortality. *Br J Haematol* 2002;119: 1125-32.
122. Mohty M, Faucher C, Vey N, et al. High rate of secondary viral and bacterial infections in patients undergoing allogeneic bone marrow mini-transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000;26:251-5.
123. Mossad SB, Avery RK, Longworth DL, et al. Infectious complications within the first year after nonmyeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001;28:491-5.
124. Hagen EA, Stern H, Porter D, et al. High rate of invasive fungal infections following nonmyeloablative allogeneic transplantation. *Clin Infect Dis* 2003;36:9-15.
125. Fukuda T, Boeckh M, Carter RA, et al. Invasive fungal infections in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation after nonmyeloablative conditioning: risks and outcomes. *Blood* 2003.
126. Martino R, Caballero MD, Canals C, et al. Reduced-intensity conditioning reduces the risk of severe infections after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001;28:341-7.
127. Perez-Simon JA, Kottaridis PD, Martino R, et al. Nonmyeloablative transplantation with or without alemtuzumab: comparison between 2 prospective studies in patients with lymphoproliferative disorders. *Blood* 2002;100:3121-7.
128. Perez-Simon JA, Diez-Campelo M, Martino R, Sureda A, Caballero D, Canizo C, et al. Impact of CD34+ cell dose on the outcome of patients undergoing reduced-intensity-conditioning allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 2003;102:1108-13.

ESTADO ACTUAL DEL TRASPLANTE DE DONANTE NO EMPARENTADO

DR. E. CARRERAS

*Consultor Senior. Responsable del Programa de Trasplante Hematopoyético. Hospital Clínic. IDIBAPS. Barcelona.
Director Médico del Registro de Donantes de Médula Ósea (Fundación Internacional Josep Carreras)*

Introducción

A lo largo de la última década se ha producido un notable incremento en el número de trasplantes alogénicos a partir de donantes no emparentados (TPH-DNE). En España, este incremento ha sido del 810%, porcentaje similar al observado en Europa (780%)^{1,2}. A lo largo del año 2002 los TPH-DNE supusieron el 22, 33 y 33% de la actividad de trasplante alogénico notificada a la Organización Nacional de Trasplantes, y a los registros de trasplante europeo (EBMT) y norteamericano (IBMTR), respectivamente¹⁻³. Este incremento ha sido la lógica consecuencia de los notables avances alcanzados en diversos aspectos de este procedimiento terapéutico. A continuación se analizan los más destacables.

Disponibilidad de donante compatible

En la actualidad existen más de 9 millones de donantes voluntarios inscritos en los diversos registros internacionales⁴. Gracias a ello, la probabilidad de disponer de un donante con el mínimo grado de compatibilidad aceptado en la mayoría de los países (identidad en los *loci* HLA-A y B a nivel antigénico y en DRB1 a nivel alélico) es de casi el 80%⁵.

Además, dado que el 23% de los donantes están tipificados para A, B y DRB1, se ha reducido notablemente la duración de las búsquedas (mediana de 58 días en REDMO (Registro de Donantes de Médula Ósea), hecho que ha permitido plantearse la práctica de un TPH-DNE en determinadas situaciones clínicas, como la leucemia aguda refractaria, en las que es necesario efectuar el TPH poco después del diagnóstico^{1,4}.

Se dispone además de 160.000 unidades de sangre de cordón umbilical (SCU) criopreservadas y disponibles de forma inmediata, permitiendo que otro buen porcentaje de pacientes, en especial niños, se puedan beneficiar de un TPH-DNE⁴. El empleo de progenitores de SCU también ha ido aumentando progresivamente en adultos como consecuencia de la posibilidad de efectuar el trasplante de forma precoz y de los cada vez mejores resultados⁶. Un análisis del REDMO, efectuado con las búsquedas iniciadas durante el año 2002, evidenció que el 26% de los pacientes adultos que carecían de donante compatible a los 3 meses de iniciada la búsqueda, podían disponer de una unidad de cordón con un mínimo

de 5/6 identidades (en A, B, DRB1) y más de 2×10^8 células nucleadas/kg de peso del receptor, características consideradas "ideales" para este tipo de trasplantes⁷.

Grado de identidad HLA donante-receptor

Cuatro estudios efectuados en amplias series de pacientes⁸⁻¹¹ han permitido conocer los siguientes hechos sobre la identidad donante-receptor¹²:

- Las diferencias en los *loci* A, B, C y DRB1 tienen un impacto directo sobre la supervivencia mientras que las diferencias en DRQB1 y DPB1 es posible que carezcan de él. La relativa facilidad en localizar donantes DQB1 compatibles, debido a su estrecha correlación con el *locus* DRB1, y la extrema dificultad en lograr donantes DPB1 compatibles (el 88% de la parejas donante-receptor son DP incompatibles)¹¹ ha hecho que hoy en día la mayoría de centros de TPH consideren "donante ideal" a aquel que muestra identidad HLA-A, B, C, DRB1 y DQB1 con el receptor.

- Las diferencias a nivel antigénico (diferencias detectables mediante técnicas serológicas empleando anticuerpos) tienen un mayor impacto en la supervivencia que las diferencias a nivel alélico (detectables únicamente mediante técnicas de secuenciación del ADN). Por ello, siempre que sea posible deberá analizarse la identidad A, B, C, DRB1, DQB1, antes mencionada, por técnicas de biología molecular.

- Las diferencias alélicas a nivel de A, B, C o DRB1 tienen similar impacto en la supervivencia (reducción en un 8-12% en la supervivencia a 5 años). Ello implica que no existen argumentos para dar preferencia a un determinado *locus* cuando deba aceptarse un donante con una diferencia HLA.

- La existencia de más de una diferencia HLA reduce notablemente la probabilidad de supervivencia.

Este intento de localizar al donante "ideal", si bien comporta unos mejores resultados, reduce notablemente la probabilidad de localizar donante para un paciente dado; probabilidad que con el número actual de donantes voluntarios se sitúa en alrededor del 40%¹¹. Con todo, el progresivo conocimiento del polimorfismo HLA está evidenciando que, en ocasiones, mínimos cambios a nivel molecular tienen un mayor impacto en la supervivencia que determinadas diferencias a nivel antigénico. Por ello en el futuro deberán definirse las diferencias "aceptables" y valorarlas de forma individualizada en función del estado de la enfermedad de base, riesgo del paciente y urgencia del trasplante^{5,12}.

Un buen ejemplo de ello lo constituye la incompatibilidad a nivel KIR (*killer immunoglobulin like receptors*). Los receptores KIR de las células *natural killer* (NK) reconocen determinados grupos de alelos HLA de clase I. Dicho reconocimiento inhibe las

funciones de la célula NK, mientras que la ausencia de reconocimiento desencadena la acción citotóxica de dichas células¹³. Este hecho tiene implicaciones clínicas de gran interés, ya que los pacientes con una incompatibilidad KIR en dirección injerto contra huésped que reciben un TPH haploidéntico por una leucemia mieloide tienen una menor incidencia de rechazos del injerto, de enfermedad injerto contra huésped (EICH), y de recidivas de la enfermedad¹⁴.

Diversos grupos han analizado si este efecto se produce también en los TPH-DNE. Si bien se ha observado que hasta un 30% de los TPH-DNE A, B, DRB1 compatibles presentan una incompatibilidad a este nivel¹⁵, no todos los estudios han podido reproducir los resultados del grupo de Perugia. Así pues, Davies et al¹⁵ y Bornhäuser et al¹⁶, no evidenciaron ningún beneficio en las parejas KIR incompatibles, mientras que Giebel et al¹⁷ observaron una mejor supervivencia y supervivencia libre de enfermedad (SLE) y una menor mortalidad relacionada con el procedimiento (por menos fallos de implante y EICH severa), entre los pacientes con incompatibilidad KIR; siendo este efecto máximo entre los afectados de una leucemia mieloblástica aguda. Sólo estudios con cohortes mucho más amplias permitirán demostrar si esta incompatibilidad representa un beneficio en los receptores de un TPH-DNE; hasta entonces no debe incluirse a la incompatibilidad KIR en la estrategia de búsqueda del mejor donante¹².

Otros factores donante-receptor

Si bien el grado de compatibilidad en el sistema HLA representa el principal factor determinante de los resultados en el TPH-DNE, la secuenciación del genoma humano ha puesto de manifiesto que existen miles de polimorfismos genéticos que influyen en el fenotipo inmunológico de un individuo y que pueden desempeñar un papel en la evolución del trasplante. Se han descrito polimorfismos de los genes de las citocinas y de otros genes relacionados con la inmunidad que, de hallarse presentes en el receptor o en el donante, pueden modificar la evolución del TPH¹⁸. Así pues, determinados polimorfismos de los genes TNF, IL-10, IL-1, IFN- γ y TGF- β , parecen favorecer el desarrollo de EICH aguda o crónica, tanto en los TPH de donante familiar como en los de DNE. También los antígenos menores de histocompatibilidad pueden presentar polimorfismos capaces de influir en la evolución del TPH¹⁸. Finalmente, determinados polimorfismos de genes no dependientes del sistema HLA como MPO, MBL, Fc γ RII-III, pueden influir en los resultados del TPH al incrementar el riesgo de desarrollar infecciones¹⁸ o de determinadas complicaciones al modificar la metabolización de los fármacos empleados en el TPH, como ocurre con el genotipo GSTM1 null y el desarrollo de enfermedad venooclusiva del hígado¹⁹.

Evidentemente todos estos hallazgos poco podrán influir en los TPH-DNE ya que son inmodificables en el paciente y difícilmente se dispondrá de suficientes donantes como para seleccionarlos en base a dichos polimorfismos, pero sí podrán servir para modificar estrategias del TPH con la finalidad de prevenir determinadas complicaciones.

Características clínicas del donante

En el supuesto de existir más de un DNE HLA compatible, a lo largo de los años se han estado empleando una serie de criterios para la selección del “mejor” donante. Se intentaba elegir aquel que tuviera un mayor volumen corporal, que fuera más joven, que fuera isogrupo con el paciente, que tuviera una serología negativa frente al citomegalovirus (CMV) si el paciente también la tenía, y que fuera un varón si el receptor también lo era o, de tener que elegir a una mujer, que ésta fuera nulípara; todos ellos criterios procedentes de observaciones en los TPH de donante familiar.

Un amplio estudio sobre casi siete mil TPH-DNE efectuados por el NMDP (National Bone Marrow Donor Program) evidenció que, si bien estos factores pueden tener impacto en el desarrollo de determinadas complicaciones, como la EICH, únicamente la edad del donante tenía impacto directo sobre la supervivencia, y que este impacto era independiente de la edad del receptor, de la enfermedad de base, y de la celularidad obtenida²⁰. Dado que el impacto de la edad parece correlacionarse con la incidencia de EICH aguda y crónica, se especula que este efecto pueda ser consecuencia de la progresiva inmunización del donante a lo largo de los años frente a antígenos extraños, perdiendo progresivamente la capacidad de tolerancia hacia el receptor. Por todo ello, hoy en día, hay autores que se plantean si no debería darse preferencia a un donante joven aunque presentara alguna diferencia genética con el paciente, frente a un donante de mayor edad aunque éste fuera fenotípicamente idéntico^{12,21}.

En el estudio del NMDP antes mencionado, la seropositividad frente a CMV del paciente tuvo un impacto negativo sobre la supervivencia, independientemente del estatus serológico del donante²⁰. Este resultado contrasta notablemente con un reciente análisis del EBMT que evidenció que los pacientes seropositivos que recibían progenitores de un donante seronegativo tenían una supervivencia significativamente menor, como si el estado inmunitario del donante pudiera conferir un cierto grado de protección frente a la reactivación del virus²². Este efecto sólo se objetivó entre los receptores de un TPH-DNE y no entre los TPH de hermano histocompatible. De confirmarse esta observación deberían seleccionarse donantes seropositivos para los receptores seropositivos.

Régimen de acondicionamiento

Globulina-antitimocítica (ATG)

Son muchos los estudios que muestran que la inclusión de ATG en el tratamiento de acondicionamiento mejorara la supervivencia de los TPH-DNE a costa de reducir la mortalidad relacionada con el trasplante (MRT), debido a una menor incidencia de fallos de injerto y de EICH, a pesar de una mayor incidencia de infecciones, recidivas y, ocasionalmente, síndromes linfoproliferativos post-TPH²³⁻²⁹. Con su empleo parece que es posible aceptar cierto grado de incompatibilidad donante-receptor ya que se igualan los resultados con del TPH-DNE HLA-idéntico^{27,30}. Si bien en la actualidad la mayoría de autores emplean alguna de las ATG de conejo comercializadas, no existe unanimidad sobre su posología y pauta de administración y se conoce poco sobre sus posibles efectos secundarios a largo término³¹⁻³³.

Anticuerpos monoclonales (AcMo)

Cada vez son más frecuentes las comunicaciones de grupos que emplean algún AcMo, en especial alemtuzumab, como forma de prevención del rechazo/EICH durante y/o después tratamiento de acondicionamiento³⁴⁻³⁶. En casi todos ellos se observa una reducción en la incidencia de las mencionadas complicaciones pero a costa de un notable incremento en la incidencia de infecciones oportunistas (en especial por CMV); hecho que debe hacer valorar esta aproximación con prudencia hasta que no se disponga del resultado de series más amplias.

Trasplantes de intensidad reducida (TIR)

La toxicidad de los tratamientos de acondicionamiento tradicionales hacía prácticamente imposible su empleo en pacientes de edad avanzada o con disfunción severa de algún órgano. Este hecho, junto con la observación del efecto antitumoral del injerto y de la posibilidad de alcanzar un quimerismo completo del donante empleando tratamientos de acondicionamiento más inmunosupresores que mieloablativos, propició el desarrollo de esta modalidad terapéutica. Después de demostrar su indudable eficacia en los TPH de donante familiar han sido muchos los grupos que han investigado su utilidad en el TPH-DNE³⁷⁻⁴⁴. A modo de resumen de la bibliografía aparecida a lo largo de los últimos años sobre los alo-TIR-DNE puede decirse que:

1. Los regímenes de acondicionamiento más empleados en este tipo de TPH consisten en la asociación de fludarabina + melfalán (en neoplasia linfoides) o busulfán o treosulfán (en neoplasia mieloides) ± ATG (o un AcMo, en especial alemtuzumab) para los TPH de intensidad semirreducida (mini-TPH) y fludarabina + irradiación corporal total (200 cGy) para los TPH de intensidad muy reducida (micro-TPH).

2. En la mayoría de casos se consigue un quimerismo completo a las pocas semanas del TPH. Este implante parece ser más precoz en los pacientes que han recibido quimioterapia intensiva o un trasplante previo; probablemente como consecuencia de la inmunosupresión a largo plazo que comportan dichos procedimientos.

3. En el único estudio en que se compararon los progenitores de sangre periférica con los de médula ósea³⁹ se observó que con los primeros se lograba un implante y un quimerismo completo más rápido, así como un mayor efecto antileucémico y mayor SLE, probablemente como consecuencia de una mayor incidencia de EICH, en especial crónica. Con todo, debe recalarse que esta comparación se realizó entre receptores de un micro-TPH no pudiéndose extrapolar estos beneficios de la sangre periférica a los mini-TPH en los que muchos autores han empleado con éxito progenitores de médula ósea³⁷.

4. En ambos tipos de TIR-DNE, y a pesar de la mayor edad de los pacientes, se observa una menor incidencia de EICH aguda y crónica que en los TPH-DNE convencionales, probablemente como consecuencia de la menor lesión tisular del tratamiento de acondicionamiento, si bien otros factores, como el empleo de mofetil micofenolato (MMF) para la profilaxis de la EICH (ver a continuación), pueden también influir en estos resultados. La incidencia de EICH es aún menor entre los pacientes que reciben alemtuzumab o ATG, si bien ambas medidas aumentan el riesgo de presentar complicaciones infecciosas^{25,34}.

5. La MRT es claramente inferior entre los TIR-DNE, en especial entre los receptores de un micro-TPH, si bien esta MRT puede variar considerablemente en función del índice de comorbilidad de Charlson de cada paciente⁴⁵.

6. El resultado de los TIR-DNE en cuanto a SLE se ve claramente influido por el grado de enfermedad residual del receptor en el momento del TPH. Este hecho es especialmente cierto en los micro-TPH que ofrecen resultados claramente superiores entre los pacientes en remisión o con una mínima enfermedad residual.

7. Determinadas enfermedades son más susceptibles al efecto antitumoral del injerto por lo que en ellas los resultados esperables son mejores. Destacan por su sensibilidad el linfoma de Hodgkin, los linfomas foliculares, la leucemia linfática crónica, los linfomas de células del manto, el carcinoma renal, el mieloma múltiple y las neoplasias mieloides.

Fuente de progenitores

A lo largo de los últimos años se ha ido generalizando el empleo de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica (PHSP) y de SCU (comentados en otra ponencia de este simposio), para la práctica de TPH-DNE. En la actualidad la mayor parte de los registros internacionales aceptan que sus donantes

efectúen una donación de PHSP si el centro de trasplante así lo solicita. Ello ha sido así tras observar que esta donación es mucho menos agresiva para el donante y más simple para el centro de obtención, sin que se hayan observado efectos secundarios a largo plazo⁴⁶.

El empleo de PHSP puede suponer algunos beneficios para el paciente, en especial si es receptor de un micro-TPH (ver antes). En los receptores de un TPH-DNE convencional los datos preliminares del grupo de Seattle muestran una probabilidad de supervivencia del 73% en pacientes con leucemias linfoides y mieloides⁵, mientras que el análisis del NMDP que comparó sangre periférica con médula ósea mostró, en el análisis multivariado, un implante de neutrófilos y plaquetas más rápido y una mayor incidencia de EICH aguda y crónica, con similar supervivencia y SLE⁴⁷. Con todo, algunos autores han comunicado resultados excepcionales con el empleo de PHSP en el tratamiento de los pacientes con leucemia mieloides crónica en fase crónica⁴⁸ por lo que el papel de esta modalidad de TPH-DNE deberá ser valorado en series más amplias.

Dentro de este apartado debe mencionarse el impacto que sobre los resultados del TPH-DNE representa la celularidad administrada. Diversos estudios han evidenciado que, en los receptores de progenitores de médula ósea, el hecho de haber recibido una celularidad superior a $3,5 \times 10^8$ células nucleadas/kg de peso del receptor comporta un implante más rápido, una menor MRT y una mejor supervivencia y SLE^{49,50}. De igual modo la celularidad de las unidades de SCU tiene un notable impacto sobre los resultados finales del TPH-SCU⁵¹. Con el empleo de progenitores de sangre periférica es relativamente simple administrar inóculos con mayor celularidad siendo ésta, probablemente, la causa de la rápida reconstitución hemoperiférica e inmune de este tipo de trasplantes⁵².

Profilaxis de la EICH

Además del impacto que sobre esta complicación pueda representar la inclusión de ATG o AcMo en el tratamiento de acondicionamiento (ver antes), a lo largo de los últimos años se ha generalizado el empleo, en los TIR-DNE, de un nuevo agente inmunodepresor, el MMF, en asociación con la ciclosporina. Éste puede ser responsable, en parte, de la menor incidencia de EICH observada en estos pacientes^{39,53}. Durante los primeros años de su empleo se solía administrar a la dosis de 15 mg/kg cada 12 h, pero la observación de que su vida media era de tan sólo 4 h ha hecho que diversos grupos lo estén administrando cada 8 h. Con esta medida parece haberse facilitado el implante sin que haya aumentado la toxicidad o se haya modificado la incidencia de EICH^{39,54}.

Además del MMF, se está analizando la efectividad de otros inmunosupresores como sirolimus, asociado a agentes clásicos como tacrolimus o metotrexato

to⁵⁵. La asociación de sirolimus con tacrolimus o ciclosporina parece tener un efecto sinérgico⁵⁶.

A pesar del empleo de diversos métodos de depleción linfóide T (DLT) en el TPH-DNE, ninguno de los trabajos publicados ha mostrado un claro beneficio en términos de supervivencia, ya que, si bien se observaba una menor incidencia de EICH, se producía una mayor morbimortalidad por fallos de implante y recidivas⁵⁷⁻⁶⁰. Por todo ello en el momento actual no se recomienda el empleo de métodos de DLT en el TPH-DNE¹³.

En resumen, podemos decir que todos estos avances han hecho que, hoy en día, el TPH-DNE deba ser considerado como una opción terapéutica de primera línea entre los pacientes que requieren un TPH alogénico para su curación, ya que ofrece resultados comparables, y en determinadas ocasiones superiores, a los ofrecidos por los TPH de donante familiar histocompatible. La generalización de los TIR-DNE permitirá que numerosos pacientes no tributarios de un TPH convencional por su edad o por comorbilidades asociada, puedan beneficiarse de un TPH-DNE.

Bibliografía

- Memoria anual REDMO 2004 (www.fcarreras.org).
- EBMT Transplant Activity Survey (www.ebmt.org).
- IBMTR/ABMTR report on state of the art in blood and marrow transplantation. IBMTR/ABMTR newsletter 2002;9:3-11.
- BMDW Donors registry (<http://www.bmdw.org/Database/Donors.htm>).
- Anasetti C. Advances in unrelated donor hematopoietic cell transplantation. *Haematologica* 2003;88:246-9.
- Moscardó F, Sanz GF, Sanz MA. Unrelated-donor cord blood transplantation for adult hematological malignancies. *Leuk Lymphoma* 2004;45:11-8.
- Carreras E, Pérez C, Rozman C. Simultaneous bone marrow and cord blood searches notably improve the probability of finding an unrelated donor [abstract]. *Blood* 2003;102:354b.
- Morishima Y, Sasazuki T, Inoko H, Juji T, Akaza T, Yamamoto K, et al. The clinical significance of human leukocyte antigen (HLA) allele compatibility in patients receiving a marrow transplant from serologically HLA-A, HLA-B, and HLA-DR matched unrelated donors. *Blood* 2002;99:4200-6.
- Petersdorf EW, Gooley T, Malkki M, Anasetti C, Martin P, Woolfrey A, et al. The biological significance of HLA-DP gene variation in haematopoietic cell transplantation. *Br J Haematol* 2001;112:988-94.
- Petersdorf EW, Hansen JA, Martin PJ, Woolfrey A, Malkki M, Gooley T, et al. Major-histocompatibility-complex class I alleles and antigens in hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med* 2001;345:1794-800.
- Flomenberg N, Baxter-Lowe LA, Confer D, Fernández-Viñas M, Filipovich A, Horowitz M, et al. Impact of HLA-class I and class II high resolution matching on outcomes of unrelated donor BMT: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplant outcome. *Blood* [edición electrónica] Junio 10, 2004.
- Hurley CK, Baxter Lowe LA, Logan B, Karanes C, Anasetti C, Weisdorf D, et al. National Marrow Donor Program HLA-matching guidelines for unrelated marrow transplants. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003;9:610-5.
- García CA, Robinson J, Madrigal JA, Marsh SGE. Killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR). En: Apperley J, Carreras E, Gluckman E, Gratwohl A, Masszi T, editors. *Haemopoietic stem cell transplantation*. Génova: Forum Service Editore, 2004:49-55.
- Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002;295:2097-100.
- Davies SM, Ruggieri L, DeFor T, Wagner JE, Weisdorf DJ, Miller JS, et al. Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. Killer immunoglobulin-like receptor. *Blood* 2002;100:3825-7.
- Bornhauser M, Schwerdtfeger R, Martin H, Frank KH, Theuser C, Ehninger G. Role of KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation using unrelated donors. *Blood* 2004;103:2860-1.
- Giebel S, Locatelli F, Lamparelli T, Velardi A, Davies S, Frumento G, et al. Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood* 2003;102:814-9.
- Dickinson AM, Wang XN, Stark G, Cullup H, Jarvis M, Middleton PG. Non-HLA immunogenetics and role in HSCT outcome. En: Apperley J, Carreras E, Gluckman E, Gratwohl A, Masszi T, eds. *Haemopoietic stem cell transplantation*. Génova: Forum Service Editore, 2004; p. 57-64.
- Srivastava A, Poonkuzhali B, Shaji RV, George B, Mathews V, Chandy M, et al. Glutathione S-transferase M1 polymorphism- A risk factor for hepatic venoocclusive disease in bone marrow transplantation. *Blood* 2004; en prensa.
- Kollman C, Howe CW, Anasetti C, Antin JH, Davies SM, Filipovich AH, et al. Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: the effect of donor age. *Blood* 2001;98:2043-51.
- Ottinger HD, Beelen DW, Elmaagacli AH, Peceny R, Grosse-Wilde H. Hematopoietic stem cell transplantation: in patients above 40 years young HLA-matched unrelated donors should be preferred to HLA-identical sibling donors [abstract]. *Blood* 2003;102:489a.
- Ljungman P, Brand R, Einsele H, Frassonni F, Niederwieser D, Cordonnier C. Donor CMV serologic status and outcome of CMV-seropositive recipients after unrelated donor stem cell transplantation: an EBMT megafile analysis. *Blood* 2003;102:4255-60.
- Kroger N, Zabelina T, Kruger W, Renges H, Stute N, Durken M, et al. Anti-thymocyte-globulin as part of the preparative regimen prevents graft failure and severe graft versus host disease (GvHD) in allogeneic stem cell transplantation from unrelated donors. *Ann Hematol* 2001;80:209-15.
- Remberger M, Storer B, Ringden O, Anasetti C. Association between pretransplant thymoglobulin and reduced non-relapse mortality rate after marrow transplantation from unrelated donors. *Bone Marrow Transplant* 2002;29:391-7.
- Zander AR, Kroger N, Schleuning M, Finke J, Zabelina T, Beelen D, et al. ATG as part of the conditioning regimen reduces transplant-related mortality (TRM) and improves overall survival after unrelated stem cell transplantation in patients with chronic myelogenous leukemia (CML). *Bone Marrow Transplant* 2003;32:355-61.
- Bacigalupo A, Lamparelli T, Gualandi F, Bregante S, Raiola AM, Di Grazia C, et al. Prophylactic antithymocyte globulin reduces the risk of chronic graft-versus-host disease in alternative-donor bone marrow transplants. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002;8:656-61.
- Finke J, Schmoor C, Lang H, Potthoff K, Bertz H. Matched and mismatched allogeneic stem-cell transplantation from unrelated donors using combined graft-versus-host disease prophylaxis including rabbit anti-T lymphocyte globulin. *J Clin Oncol* 2003;21:506-13.
- Schattenberg A, Meer Av A, Preijers F, Schaap N, Rinkes M, Maazen RR, et al. Addition of ATG to the conditioning regimen is a major determinant for outcome after transplantation with partially lymphocyte-depleted grafts from voluntary unrelated donors. *Bone Marrow Transplant* 2004;33:1115-21.
- Basara N, Yaman A, Kolbe K, Kraut L, Baurmann H, Huber C, et al. The role of anti-thymocyte globulin in unrelated hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia [abstract]. *Blood* 2003;102:246a.
- Zander AR, Zabelina T, Ayuk F, Kabisch H, Erttmann R, Fehse N, et al. Immunosuppression with ATG F allows for successful transplantation from mismatched unrelated donors [abstract]. *Blood* 2003;102:489a.
- Baurmann H, Judith D, Zey C, Schleuning M, Schwerdtfeger R. Antithymocyte globulin Fresenius or Sangstat (Genzyme) as part of the conditioning for unrelated donor HSCT emerging differences in post-transplant immune reconstitution [abstract]. *Bone Marrow Transplant* 2004;33(Suppl 1):51.
- Schleuning M, Kaltenhäuser J, Heshmat M, Baurmann H, Schwerdtfeger R. The influence of ATG source on the outcome after unrelated transplants for chronic phase CML - a single-centre [abstract]. *Bone Marrow Transplant* 2004;33(Suppl 1):62.
- Remberger M, Svahn B-M, Mattsson J, Ringden O. Thymoglobulin as part of conditioning in unrelated donor allogeneic stem cell transplantation. A dose-finding study [abstract]. *Bone Marrow Transplant* 2004;33(Suppl 1):44.
- Pérez-Simón JA, Kottaridis PD, Martino R, Craddock C, Caballero D, Chopra R, et al. Nonmyeloablative transplantation with or without alemtuzumab: comparison between 2 prospective studies in patients with lymphoproliferative disorders. *Blood* 2002;100:3121-7.
- Howard DS, Beth A, Plummer BA, Dana L, Hargis DL, Roger H. The use of CAMPATH-1H as graft-versus-host disease prophylaxis in myeloablative unrelated donor transplants [abstract]. *Blood* 2003;102:#5635.
- Kröger N, Thomson K, Zabelina T, Peggs K, Chopra R, Shimoni A, et al. Comparison between anti-thymocyte globulin and alemtuzumab as part of the melphalan/fludarabine dose-reduced conditioning followed by HLA-matched and mismatched unrelated stem cell transplantation in patients with lymphoid malignancies [abstract]. *Bone Marrow Transplant* 2004;33(Suppl 1):11.
- Chakraverty R, Peggs K, Chopra R, Milligan DW, Kottaridis PD, Verfuert S, et al. Limiting transplantation-related mortality following unrelated donor stem cell transplantation by using a nonmyeloablative conditioning regimen. *Blood* 2002;99:1071-8.
- Kroger N, Sayer HG, Schwerdtfeger R, Kiehl M, Nagler A, Renges H, et al. Unrelated stem cell transplantation in multiple myeloma after a reduced-intensity conditioning with pretransplantation antithymocyte globulin is highly effective with low transplantation-related mortality. *Blood* 2002;100:3919-24.
- Maris MB, Niederwieser D, Sandmaier BM, Storer B, Stuart M, Maloney D, et al. HLA-matched unrelated donor hematopoietic cell trans-

- plantation after nonmyeloablative conditioning for patients with hematologic malignancies. *Blood* 2003;102:2021-30.
40. Wong R, Giralt SA, Martin T, Couriel DR, Anagnostopoulos A, Hosing C, et al. Reduced-intensity conditioning for unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation as treatment for myeloid malignancies in patients older than 55 years. *Blood* 2003;102:3052-9.
 41. Shimoni A, Kroger N, Zander A, Yeshurun M, Hardan I, Nagler A. Allogeneic stem-cell transplantation with matched unrelated donors in the elderly (age 55-67 years). Age is no longer a contraindication when using reduced-intensity conditioning [abstract]. *Bone Marrow Transplant* 2004;33(Suppl 1):69.
 42. Bosi A, Soligo D, Lombardini L, Patriarca P, Damiani D, Cerno M, et al. Low-dose melphalan-TBI plus fludarabine and campath-1H as conditioning regimen for unrelated transplant in high-risk patients for age and disease: a GITMO prospective study [abstract]. *Bone Marrow Transplant* 2004;33(Suppl 1):108.
 43. Diaconescu R, Flowers CR, Storer B, Sorror ML, Maris MB, Maloney DG, et al. Morbidity and mortality with nonmyeloablative compared to myeloablative conditioning before hematopoietic cell transplantation from HLA matched related donors. *Blood* 2004;104:961-8.
 44. Sorror ML, Maris MB, Storer B, Sandmaier BM, Diaconescu R, Flowers C, et al. Comparing morbidity and mortality of HLA-matched unrelated donor hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative and myeloablative conditioning: influence of pretransplant comorbidities. *Blood* 2004; en prensa.
 45. Charlson M, Szatrowski TP, Peterson J, Gold J. Validation of a combined comorbidity index. *J Clin Epidemiol* 1994;47:1245-51.
 46. Hölig K, Platzbecker U, Rutt C, Bornhäuser M, Ehninger G. Side effects of peripheral blood progenitor cell (PBPC) mobilization and collection using G-CSF (lenograstim)- long term follow-up of 1125 unrelated donors [abstract]. *Blood* 2003;102:954a.
 47. Anasetti C, Haagenson M, Kollman C, Matlack M, Anderlini P, Fischer J, et al. Transplantation of G-CSF-mobilized blood stem cells from unrelated donors [abstract]. *Blood* 2001;98:858a.
 48. Elmaagacli AH, Basoglu S, Peceny R, Trenscher R, Ottinger H, Lollert A, et al. Improved disease-free-survival after transplantation of peripheral blood stem cells as compared with bone marrow from HLA-identical unrelated donors in patients with first chronic phase chronic myeloid leukemia. *Blood* 2002;99:1130-5.
 49. Sierra J, Storer B, Hansen JA, Bjerke JW, Martin PJ, Petersdorf EW, et al. Transplantation of marrow cells from unrelated donors for treatment of high-risk acute leukemia: the effect of leukemic burden, donor HLA-matching, and marrow cell dose. *Blood* 1997;89:4226-35.
 50. Sierra J, Storer B, Hansen JA, Martin PJ, Petersdorf EW, Woolfrey A, et al. Unrelated donor marrow transplantation for acute myeloid leukemia: an update of the Seattle experience. *one Marrow Transplant* 2000;26:397-404.
 51. Wagner JE, Barker JN, DeFor TE, Baker KS, Blazar BR, Eide C, et al. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood* 2002;100:1611-8.
 52. Martínez C, Urbano-Ispizúa A, Rovira M, Carreras E, Rozman C, Montserrat E. Immune reconstitution following allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation. *Leuk Lymphoma* 2000;37:535-42.
 53. Rodríguez R, Parker P, Nademanee A, Smith D, O'Donnell MR, Stein A, et al. Cyclosporine and mycophenolate mofetil prophylaxis with fludarabine and melphalan conditioning for unrelated donor transplantation: a prospective study of 22 patients with hematologic malignancies. *Bone Marrow Transplant* 2004;33:1123-9.
 54. Maris MB, Sandmaier BM, Stuart M, Agura E, Hegenbart U, Pulsipher M, et al. Unrelated peripheral blood stem cell (PBSC) transplantation after nonmyeloablative conditioning: BID vs. TID mycophenolate mofetil (MMF) [abstract]. *Blood* 2003;102:#5627.
 55. Antin JH, Kim HT, Cutler C, Ho VT, Lee SJ, Miklos DB, et al. Sirolimus, tacrolimus, and low-dose methotrexate for graft-versus-host disease prophylaxis in mismatched related donor or unrelated donor transplantation. *Blood* 2003;102:1601-5.
 56. Barten MJ, Streit F, Boeger M, Dhein S, Tarnok A, Shipkova M, et al. Synergistic effects of sirolimus with cyclosporine and tacrolimus: analysis of immunosuppression on lymphocyte proliferation and activation in rat whole blood. *Transplantation* 2004;77:1154-62.
 57. Alyea EP, Weller E, Fisher DC, Freedman AS, Gribben JG, Lee S, et al. Comparable outcome with T-cell-depleted unrelated-donor versus related-donor allogeneic bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002;8:601-7.
 58. Goerner M, Weber-Nordt R, Hoepfner S, Benner A, Luft T, Ho AD. Addition of a low fixed number of CD3+ cells to CD34-enriched allografts: effects on engraftment, graft-versus-host disease, and survival after related and unrelated peripheral stem cell transplantation. *J Hematother Stem Cell Res* 2003;12:309-20.
 59. Pavletic SZ, Carter SL, Weisdorf D, Henslee-Downey J, Papadopoulos E, Gingrich R, et al. No benefit of 1log T-cell depletion on chronic graft vs. host disease (cGVHD): results of a multi-center randomized trial in 404 recipients of unrelated donor bone marrow transplantation (UBMT) [abstract]. *Blood* 2003;102:154a.
 60. Lang P, Klingebiel T, Bader P, Greil J, Schumm M, Schlegel PG, et al. Transplantation of highly purified peripheral-blood CD34+ progenitor cells from related and unrelated donors in children with nonmalignant diseases. *Bone Marrow Transplant* 2004;33:25-32.

TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS EXPANDIDOS *IN VITRO*

¿APLICABILIDAD CLÍNICA?

C. HERRERA, J. SÁNCHEZ Y A. TORRES

Servicio de Hematología. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba.

Introducción

El trasplante de progenitores hematopoyéticos (PH) se ha venido utilizando durante los últimos años como tratamiento de un número creciente de enfermedades que incluyen tanto alteraciones hematológicas como tumores sólidos, así como alteraciones metabólicas e inmunodeficiencias primarias. Aunque históricamente la médula ósea alogénica proveniente de hermano antígeno de histocompatibilidad (HLA)-idéntico ha sido la fuente preferida de progenitores, la ausencia de un donante adecuado en un porcentaje notable de casos ha llevado al empleo de otras fuentes alternativas de PH tanto alogénicos como de origen autólogo. En este sentido, la sangre de cordón umbilical (SCU) y la sangre periférica movilizada (SPM) han resultado ser fuentes alternativas de células para trasplante, y son de hecho ampliamente utilizadas actualmente en la práctica clínica. Sin embargo, en el caso de la SCU el contenido total de PH disponibles es limitado y generalmente insuficiente para el trasplante de pacientes adultos; en el caso de los progenitores de SPM, algunos individuos se comportan como "pobres movilizados", y es muy difícil, cuando no imposible, lograr un número adecuado de PH que garantice el prendimiento tras un acondicionamiento mieloablativo. En estas situaciones, la posibilidad de expandir *in vitro* PH emerge como un modo muy atractivo de salvar el obstáculo de la obtención de un injerto suficiente, que, de hecho, limita en muchos casos la aplicabilidad del trasplante a determinados pacientes.

En esta revisión, resumimos brevemente los conocimientos actuales sobre los métodos de expansión de SCU y SPM a escala experimental incluyendo la experiencia de nuestra unidad; en segundo lugar, discutimos los resultados publicados hasta el momento en el ámbito clínico de trasplante de PH generados *in vitro*, y por último analizamos las posibilidades de que, en un futuro no muy lejano, el injerto expandido se convierta en una fuente alternativa común en la práctica clínica.

Sangre de cordón umbilical

Las observaciones de que las colonias obtenidas a partir de SCU eran generalmente de gran tamaño y multifocales, unido a las observaciones de que los PH fetales tenían una ventaja en la repoblación competitiva sobre los de origen adulto sugirieron que las *stem*

cells de SCU podrían tener una mayor capacidad proliferativa y quizás una mayor capacidad de autorrenovación. Esta hipótesis fue demostrada con el hallazgo de que las unidades formadoras de colonias granulocíticas, eritroides, megacariocíticas y monocíticas (CFU-GEMM) de SCU podían ser replantadas 4 o 5 veces manteniéndose la hematopoyesis multilineal a diferencia de las CFU-GEMM generadas a partir de PH de adulto que poseen escasa o nula capacidad de ser replantadas. Estudios posteriores demostraron que las células CD34+ de SCU eran capaces de generar varios miles más de células maduras en cultivo sin reducir el número de CD34+, en contraste con la médula ósea en la cual las células CD34+ declinan rápidamente en cultivo indicando una pérdida de células primitivas con capacidad de autorrenovación. Estos resultados tomados en conjunto indican que los progenitores de SCU poseen una capacidad claramente incrementada de soportar tanto la producción de células más maduras como la autorrenovación de las más primitivas.

Partiendo de estas características inicialmente favorables, de la facilidad de obtención de muestras de un tejido que normalmente se desecha, y del enorme interés clínico que tendría la expansión de SCU, los estudios sobre esta fuente de PH en particular han sido exhaustivos. Tras los intentos iniciales de expansión en presencia de células estromales¹ o en los llamados biorreactores², los trabajos publicados a partir de la segunda mitad de la década de 1990 fueron capaces de identificar de forma definitiva las condiciones de cultivo que permitían la expansión de PH de SCU con mantenimiento de su capacidad hematopoyética³⁻⁵. El denominador común de estos sistemas de cultivo era la ausencia de células estromales y el uso de combinaciones de citoquinas de acción temprana del tipo conocido como *early acting cytokines* (EAC), con lo que se observaba una expansión neta de las *Long-term culture initiating cells* (LTCIC) en todos los casos.

La definición de las llamadas *Scid Repopulating Cells* (SRC) como las células hematopoyéticas humanas con capacidad de restauración de la hematopoyesis multilineal en ratones NOD/SCID, permitió importantes avances en la investigación al tratarse de células que constituyen una población de progenitores muy primitivos, que poseen las características propias de las verdaderas *stem cells*, como son la autorrenovación y la división asimétrica, que son biológicamente distintas de las *colony forming cells* (CFC) y de las LTCIC, y que pueden ser cuantificadas mediante ensayos competitivos de trasplante en el modelo NOD/SCID. A partir de este momento las investigaciones se han centrado en la posibilidad de expandir PH de SCU con mantenimiento del contenido de SRC y, por tanto de la capacidad de mantenimiento de la hematopoyesis a largo plazo. En este sentido, un trabajo pionero de Bathia et al⁶ demostró que en cultivo líquido a corto plazo (4 a 8 días) libre de es-

troma y en presencia de Flt3-ligando (FL), *stem cell factor* (SCF), Interleucina 3 (IL-3) e IL-6, con o sin factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF) se expandían notablemente las LTCIC y se producía una modesta expansión de las SRC. Poco después, Piacibello et al⁵ lograron expandir hasta 70 veces el contenido de SRC de SCU en cultivos mantenidos hasta 10 semanas *in vitro* en presencia de SCF, FL, IL-6 y factor de crecimiento megacariocítico (MGDF); este sistema de cultivo proporcionaba simultáneamente una gran expansión de PH pertenecientes a compartimientos más maduros de la jerarquía hematopoyética, y por tanto se trata, en principio, de una información esencial para el diseño de protocolos de expansión de SCU aplicables en el ámbito clínico. En esta línea de investigación, estamos en la actualidad estudiando en nuestro laboratorio la aplicabilidad a la SCU de la metodología de expansión que hemos desarrollado en los últimos años para la SPM y que detallamos más adelante. Según nuestras experiencias preliminares, los cultivos líquidos a corto plazo de SCU con EAC, con o sin IL3 e IL6 producen efectos muy similares a los obtenidos con PH de SPM.

Sangre periférica movilizada

La SPM es la segunda fuente de PH para trasplante que podría teóricamente beneficiarse de la expansión *in vitro*. Además de los casos de los "pobres movilizados" en los que no es posible la obtención de un injerto adecuado, los injertos expandidos podrían teóricamente, en el contexto de trasplante autólogo, acortar el tiempo de prendimiento que se ha demostrado guarda relación directa con el número y estado de maduración de los progenitores presentes en el injerto⁷; una tercera situación se produce en el caso de trasplante alogénico no HLA-identico, en el que una megadosis de células progenitoras es capaz de obviar las barreras de las diferencias en el HLA donante-receptor, facilitando el prendimiento⁸. En cualquiera de las situaciones citadas, la posibilidad de generar *in vitro* grandes cantidades de PH supone una alternativa valiosa.

Sin embargo, se han planteado fundadas dudas sobre el mantenimiento de los progenitores primitivos tipo LTCIC en los PH expandidos de SPM, y por tanto, sobre su capacidad hematopoyética a largo plazo⁹. Estas dudas se basan en el conocimiento teórico de que la SPM difiere sustancialmente de otras fuentes de PH tanto cualitativa como cuantitativamente: en primer lugar, las células CD34+ de SPM ya han sido expuestas a los efectos de los factores de crecimiento usados para la movilización, generalmente G-CSF, y pueden por tanto haber sufrido ya una máxima estimulación que comprometa su potencial de mantenimiento de los progenitores más inmaduros en el proceso de expansión; en segundo lugar, la frecuencia de los progenitores con auténticas características de *stem cells* de tipo SRC es cuantitativamente menor en SPM que en SCU o médula ósea,

lo que supone un nuevo obstáculo para su necesario mantenimiento en los cultivos de expansión.

Además de estas premisas teóricas que hacen suponer especiales dificultades en la expansión de SPM, otra cuestión importante es la identificación de combinaciones de citoquinas específicas que puedan diferencialmente estimular tanto la autorrenovación de los PH primitivos como su diferenciación hacia progenitores comprometidos de línea en el caso particular de la SPM. En células CD34+ de médula ósea, sólo las EAC, tales como trombopoyetina (TPO), SCF, FL e IL-3 son capaces de promover una expansión neta de LTCIC, mientras que la expansión de CFC requiere la presencia de IL-6 y/o de G-CSF¹⁰. La identificación de estos efectos diferenciales de las citoquinas en el caso particular de la SPM es un objetivo importante en orden a establecer el desarrollo de protocolos de expansión a escala clínica, destinados a conseguir tanto el aumento numérico de progenitores codificados de línea para acortar la pancitopenia postrasplante como el mantenimiento de los progenitores muy primitivos para el sostenimiento de la hematopoyesis a largo plazo.

En este sentido, en un trabajo recientemente publicado¹¹, hemos investigado los efectos de factores de crecimiento específicos (TPO, SCF, FL, IL-3 e IL-6) y sus combinaciones sobre la expansión de células CD34+, CFC, LTCIC y SRC en cultivos a corto plazo (6 días), libres de fuente de suero y libres de estroma, iniciados con células CD34+ purificadas a partir de SPM. Mientras que la acción de las citoquinas de forma individual producía en estas condiciones escasa o nula expansión en términos numéricos, las combinaciones TPO + SCF + FL y TPO + SCF + FL + IL-3 + IL-6 produjeron un incremento neto en el número de células CD34+ de $5,9 \pm 1,9$ y $18,25 \pm 4,5$ (media \pm ESM) veces respectivamente. Con objeto de investigar el carácter primitivo de las células expandidas, utilizamos marcaje celular con PKH26 y separación celular activada por fluorescencia (FACS) para separar exclusivamente las células generadas de novo en los cultivos. Sobre esta población determinamos la frecuencia de CFC y LTCIC mediante análisis de dilución límite así como la presencia de SRC entre estas células generadas *de novo* mediante el análisis del quimerismo humano multilineal en ratones NOD/SCID trasplantados. En todos estos experimentos utilizamos exclusivamente células posmitóticas, definidas como aquellas que habían sufrido al menos una división *in vitro* sobre la base de la pérdida de fluorescencia debida a PKH26. Tras 6 días de cultivo con TPO + SCF + FL la frecuencia de LTCIC entre las células posmitóticas experimentó un incremento de $12,08 \pm 3,4$ veces mientras que en los cultivos con TPO + SCF + FL + IL-3 + IL-6 el incremento fue de $4,3 \pm 1,6$ veces. Por su parte, las células CD34+ PKH26^{low} generadas en los cultivos con TPO + SCF + FL dieron lugar a quimerismo humano multilineal (CD34+, CD33+, CD19+) en los

ratones NOD/SCID trasplantados, mientras que no pudimos detectar injerto humano en los ratones trasplantados con células provenientes de los cultivos en presencia de TPO + SCF + FL + IL-3 + IL-6. En estos experimentos, los porcentajes de células CD34+/CD38-, CD34+/CD33- y CD34+/HLA-DR-, así como el de células en fases G₀/G₁, cuantificadas conjuntamente, del ciclo celular eran similares, sugiriendo que el impacto deletéreo de IL-3 + IL-6 sobre la capacidad de prendimiento no se traducía en cambios en las características fenotípicas ni en el estatus del ciclo celular de las células trasplantadas. Como después veremos la situación de las células en las fases G₀ y G₁ del ciclo consideradas independientemente varían de forma notable según la combinación de citoquinas utilizada. La conclusión de este trabajo fue que las células CD34+ generadas de novo en cultivos de SPM con TPO + SCF + FL realmente mantenían características de *stem cells* primitivas y capacidad de prendimiento multilineal, mientras que la adición de IL-3 + IL-6 a los cultivos de expansión eliminaba esta capacidad de prendimiento.

Indudablemente, las deficiencias de prendimiento observadas por nosotros y por otros autores tras la expansión con ciertas combinaciones de citoquinas pueden ser debidas a diferenciación *in vitro* con pérdida concomitante de pluripotencialidad, pero también hay que considerar la posible implicación de otros factores. La exposición de *stem cells* a citoquinas, tanto *in vivo* con objeto de su movilización, como *in vitro* con objeto de su expansión induce notables cambios en la expresión de moléculas de adhesión (MA) que podrían resultar hipotéticamente en defectos en la capacidad de anidación y/o prendimiento. Sin embargo, los mecanismos por los cuales los PH anidan no son completamente conocidos, y en la actualidad la "eficiencia de anidación" parece relacionarse no sólo con la expresión de determinadas moléculas de adhesión por las células CD34+, sino también con la presencia de células accesorias en el injerto y probablemente con algunos otros factores. En este sentido, en un estudio reciente¹² hemos analizado la cinética de expresión de CXCR4 y las principales MA (CD49d, CD49e, CD11a, CD58, CD54, CD31, CD62L, CD43 y CD44) en PH durante la movilización, la selección positiva y la expansión *in vitro*, así como el papel de esos cambios en la eficiencia de anidación en la médula y el bazo de ratones NOD/SCID. La incubación durante 6 días de células CD34+ de SPM con TPO + SCF + FL y con TPO + SCF + FL + IL-3 + IL-6, producía un incremento significativo similar para ambas combinaciones en el número de células que expresaban CD11a, CD54 y CXCR4 con respecto a niveles basales; la proporción de células que expresaban CD62L y CD31 descendía sólo tras el cultivo con la combinación de las cinco citoquinas, mientras que las restantes MA estudiadas eran expresadas por la misma proporción de células antes y después del cultivo

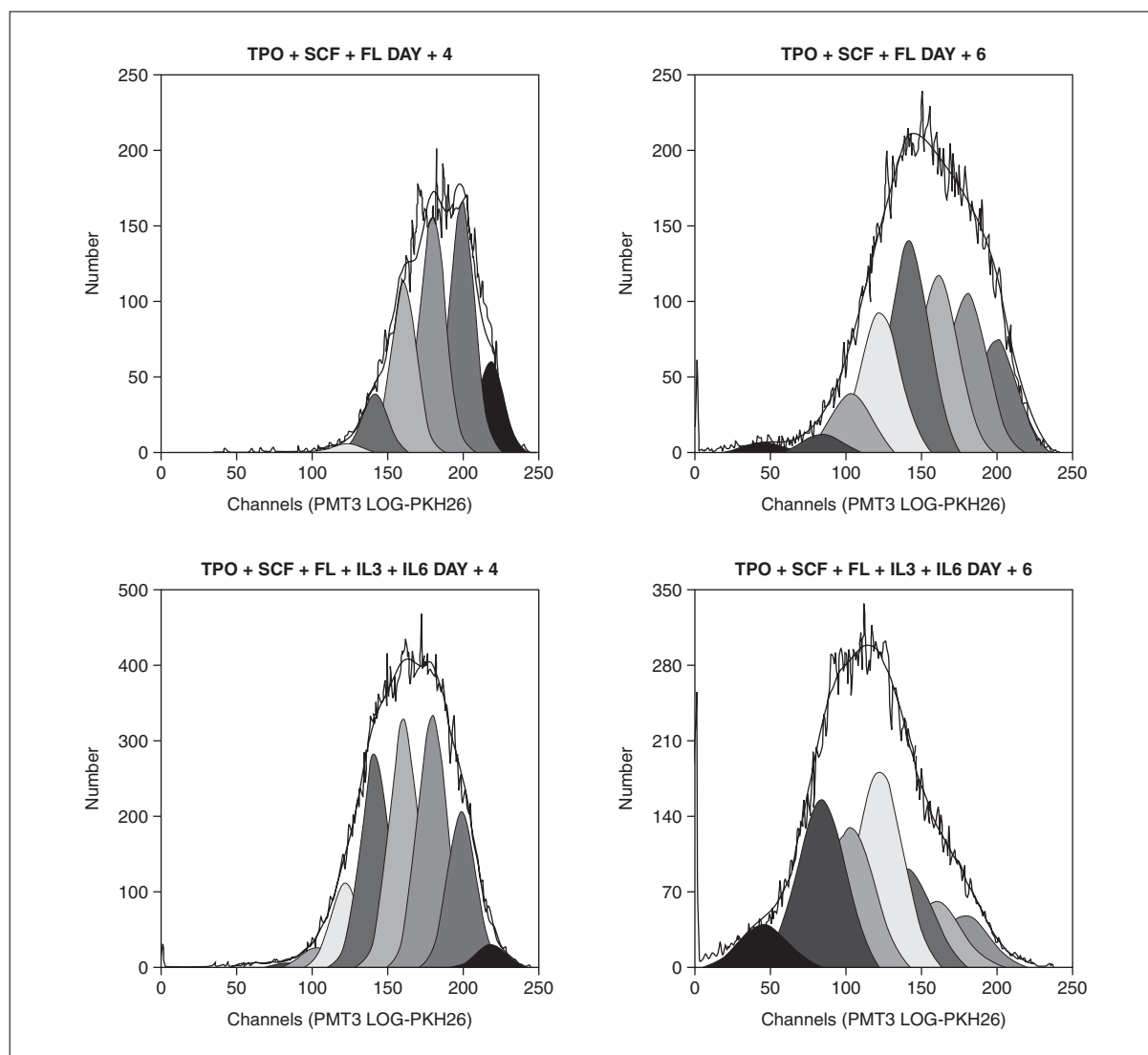


Figura 1. Análisis citofluorométrico de la cinética de división de células CD34+ de SPM marcadas con PKH26 tras 4 y 6 días de cultivo con SCF + FC + TPO + y SCF + FL + TPO + IL3 + IL6.

con cualquiera de las dos combinaciones de citoquinas. La Intensidad de fluorescencia media que se relaciona con el número de determinantes antigénicos en la superficie celular mostró la misma cinética para CXCR4 y todas las MA estudiadas: desciende significativamente con la movilización, permanece sin cambios con la selección positiva y muestra un incremento significativo tras la expansión con cualquiera de las dos combinaciones. Respecto a la eficacia de anidación de las células expandidas con TPO + SCF + FL + IL-3 + IL-6 y con TPO + SCF + FL en médula y bazo de ratones NOD/SCID no encontramos diferencias estadísticamente significativas con la correspondiente a células no expandidas. Por tanto, estos resultados demuestran que a pesar de los cambios ocasionados en la expresión de MA por la incubación con diversas citoquinas durante la ex-

pansión la capacidad de anidación no se modifica, por lo que las causas de no prendimiento de los injertos expandidos deben buscarse en otros factores tales como diferenciación de los progenitores primitivos en células más maduras o diferencias en el ciclo celular, como hemos apuntado en estudios preliminares que comentamos posteriormente.

Algunos autores han propuesto que la frecuencia de SRC declina en poblaciones celulares posmitóticas que han sufrido más de tres divisiones celulares *in vitro*¹³. Obviamente es posible que las células cultivadas con TPO + SCF + FL + IL-3 + IL-6 dado su mayor grado de expansión numérica sufran más divisiones que las cultivadas con TPO + SCF + FL, y que en el caso de las primeras este número de divisiones sea mayor de tres, lo que podría ser una causa para la pérdida de SRC. Para testar esta hipótesis,

hemos estudiado la cinética de división de las células CD34+ marcadas con PKH26 en ambas situaciones de cultivo. Con este fin hemos analizado los datos de marcaje con PKH26 de las células CD34+ en día 0, día +4 y día +6 de cultivo mediante análisis citofluorométrico con Modfit LT 3.0 Mac Software y el Proliferation Wizard Model. A partir de la intensidad de marcaje con PKH26 en día 0 previa al inicio del cultivo, el análisis del día +6 en cultivo proporciona los siguientes parámetros: a) índice de proliferación que es la suma de las células presentes en todas las generaciones dividido por el número de células de la generación parental, y representa una medida del incremento numérico de células en el cultivo; b) fracción no proliferativa, que es el número de células de la generación parental en el momento del análisis (día +6 de cultivo) dividida por las células presentes precultivo, y representa la proporción de células que no han proliferado; c) células no divididas, que es en número de células que presentan la misma intensidad de tinción con PKH26 que la generación parental; d) frecuencia de precursores es la proporción total de células presentes en el cultivo que han experimentado proliferación durante el mismo; e) generación predominante es aquella a la que pertenece el mayor porcentaje de células, y f) células que han sufrido menos de tres divisiones que es la suma de los porcentajes de las células de las generaciones 1, 2, 3. La figura 1 muestra un ejemplo representativo de este modelo de análisis de cinética de división. Los resultados de la aplicación de este análisis a las células CD34+ obtenidas de los cultivos de expansión con TPO + SCF + FL y con TPO + SCF + FL + IL-3 + IL-6, así como con cada una de estas citoquinas de manera individual reveló los siguientes resultados: las células expandidas con la combinación de las cinco citoquinas presentan un índice proliferativo mayor, una fracción no proliferativa menor y un porcentaje de células no divididas inferior que las expandidas con tres citoquinas, siendo la frecuencia de precursores muy similar. La generación predominante en las células cultivadas con TPO + SCF + FL + IL-3 + IL-6 es la quinta, mientras que en las cultivadas con TPO + SCF + FL es la tercera, y los porcentajes de células que han sufrido tres o menos divisiones son de 20 y 43 %, respectivamente (tabla 1).

Estos hallazgos permiten explicar la pérdida de la capacidad de prendimiento de las células cultivadas con la combinación de cinco citoquinas en base a una disminución de las SRC debida a un mayor número de divisiones celulares.

Para terminar analizamos la situación de ciclo celular en que se encontraban las células en las dos condiciones de cultivo, individualizando aquellas células que permanecieron quiescentes tras la expansión y por tanto se encontraban en fase G₀ del ciclo celular de aquellas que se encontraban en G₁ y sucesivas fases del ciclo. Para la identificación de las diferentes fases del ciclo celular las células fueron teñidas con Hoechst 33342 y Pyronina Y, y la adquisición se realizó en un FACS Vantage con tres capacidades de láser y luz ultravioleta. La figura 2 muestra un ejemplo representativo de las diferencias observadas antes y después de los cultivos de expansión. Los resultados de este estudio mostraron que mientras que en condiciones basales el 92 % de las células CD34+ se encontraban en fase G₀, este porcentaje descendía a 21 % tras 6 días de expansión con la combinación de tres citoquinas y a tan sólo 4 % tras cultivo en presencia de las cinco citoquinas.

En resumen, según nuestra experiencia, la expansión de PH de SPM en presencia exclusivamente de EAC mantiene las SRC, y por tanto la capacidad de prendimiento, a la vez que se expanden considerablemente la celularidad CD34 + total, las CFC y las LTCIC. Por el contrario, la adición de IL-3 e IL-6 produce una mayor expansión de células CD34+ y progenitores codificados a costa de pérdida de las verdaderas *stem cells* inmaduras capaces de regenerar la hematopoyesis en el huésped. Esta pérdida de SRC va ligada al mayor número de divisiones celulares *in vitro* y a cambios en la situación del ciclo celular de manera que más del 95 % de las células CD34+ post-expansión se encuentran en ciclo activo. Estos cambios cuestionan seriamente, si no contraindican, el empleo de IL-3 e IL-6 en protocolos de expansión de células de SPM con finalidad clínica.

Experiencia clínica con PH generados *in vitro*

El empleo en clínica de las células hematopoyéticas cultivadas *ex vivo* ha sido objeto de interés desde hace varios años. Tras experiencias preliminares en rato-

Tabla 1. Cinética de división en cultivo de células CD34+ de SPM

	CND	FNP	FP	IP	GP	< 3D
TPO	14,1 ± 2,1	0,56 ± 0,06	0,43 ± 0,06	4,1 ± 0,4	3,7 ± 0,4	37,2 ± 8,8
SCF	13 ± 5,1	0,46 ± 0,1	0,53 ± 0,1	5,1 ± 1	4 ± 0,5	34,6 ± 5,7
FL	63,6 ± 6,7	0,88 ± 0,02	0,11 ± 0,02	1,4 ± 0,1	2 ± 0,0	25,9 ± 3,8
IL-3 + IL-6	9,3 ± 2,8	0,51 ± 0,09	0,12 ± 0,01	5,9 ± 0,5	4,2 ± 0,4	30,7 ± 6,7
3 C	1,8 ± 0,7	0,11 ± 0,03	0,87 ± 0,03	7,4 ± 0,9	3,8 ± 0,3	43 ± 5
5C	0,4 ± 0,2	0,056 ± 0,02	0,93 ± 0,02	16,4 ± 2,5	5,6 ± 0,5	20,3 ± 3,9

CND: % de células no divididas; FNP: fracción no proliferativa; FP: frecuencia de precursores; IP: índice proliferativo; GP: generación predominante. < 3D = % de células que han sufrido menos de 3 divisiones.

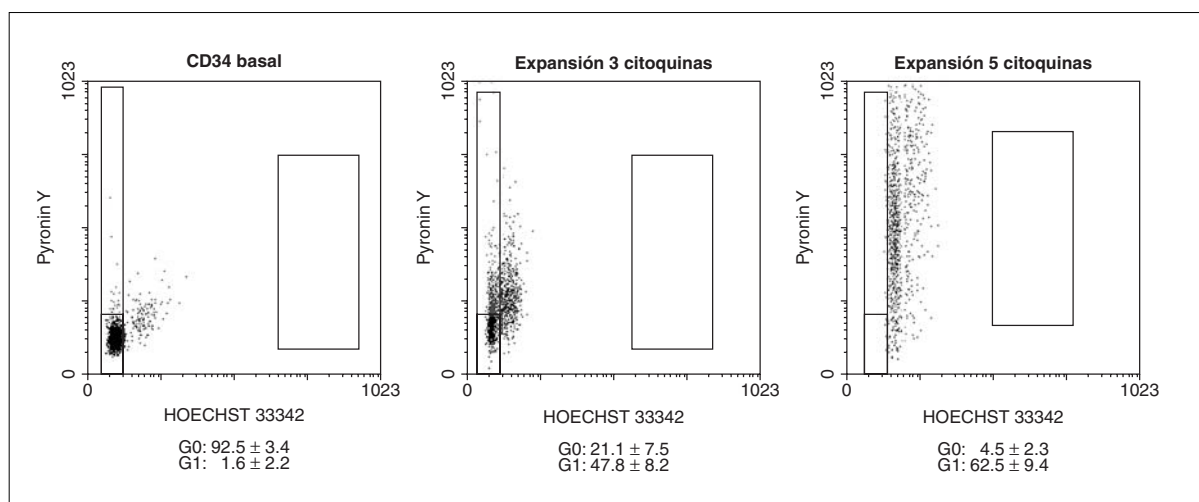


Figura 2. Análisis citofluorométrico del ciclo celular tras tinción con Hoescht 3342 y Pyrotina y en tres condiciones: situación basal previa al cultivo, día +6 tras el cultivo con TPO+SCF+FL y día +6 tras cultivo con TPO+SCF+FL+IL3+IL6.

nes, Dexter et al infundieron por primera vez médula ósea cultivada *ex vivo* a 2 pacientes en 1983, y este mismo grupo utilizó esta aproximación terapéutica durante años en el tratamiento de pacientes con leucemia mieloblástica aguda. Aunque estos primeros trasplantes no amplificaban de forma intencionada las células cultivadas, sí fueron capaces de demostrar que el procedimiento podía ser realizado de manera segura, aunque la recuperación de la hematopoyesis en estos pacientes fue bastante retardada.

Silver et al¹⁴ fueron los primeros en reinfundir médula ósea obtenida tras 14 días en cultivo en perfusión suplementado con IL-3, GM-CSF, EPO y SCF como adyuvante de autotrasplante en 5 pacientes afectados de enfermedad de Hodgkin y linfomas no hodgkinianos. Estos pacientes no presentaron ningún tipo de toxicidad asociada a la infusión, todos ellos alcanzaron prendimiento mieloide entre los días 8 y 15, y plaquetario entre los días 12 y 21.

Más recientemente, Bender et al¹⁵ estudiaron 5 pacientes que recibieron células CD34+ purificadas de SPM cultivadas con PIXY 321 durante 12 días e infundidas al día siguiente de la infusión estándar de células no cultivadas. Estos pacientes no presentaron toxicidad alguna y la reconstitución de la hematopoyesis fue comparable a la de autotrasplantes de sangre periférica convencionales.

Brugger et al¹⁷ publicaron los resultados de la reinfusión de células de SPM cultivadas *ex vivo* con SCF, IL-1 β , IL-3, IL-6 y EPO durante 12 días como única fuente de soporte hematopoyético en pacientes sometidos a quimioterapia a altas dosis no mieloablativa con resultados alentadores. De los 6 pacientes que recibieron exclusivamente células cultivadas, cinco presentaron criterios de prendimiento, con una media de días para alcanzar 500 y 1.000 granulocitos/ μ l superiores en 3 días a la correspondiente a los pacientes que recibieron simultáneamente

células cultivadas y no cultivadas. Tanto en este estudio como en el de Silver et al existía una clara correlación entre el número de células expandidas reinfundidas a los pacientes y la velocidad de la recuperación plaquetaria. Estudios similares que demuestran la aplicabilidad clínica del procedimiento y la ausencia de toxicidad del mismo son abundantes en la literatura médica. Considerados de manera global, aunque los regímenes de acondicionamiento empleados en estos pacientes no fueron realmente mieloablativos, y aunque no hay datos suficientes para asegurar la durabilidad del injerto, los resultados preliminares de estos trabajos sostienen la noción de que un pequeño número de PH cultivados *ex vivo* bajo ciertas condiciones puede dar lugar a una reconstitución hematológica completa.

Tres estudios más¹⁸⁻²⁰ han ampliado la experiencia clínica con trasplante de células expandidas *in vitro*. Dos de ellos emplearon células de médula ósea en biorreactores con adición de EPO, PIXY 321 Y FL, mientras que el tercero empleó células de SPM cultivadas con SCF, TPO y G-CSF. En todos los casos, los pacientes mostraron un prendimiento multilineal relativamente rápido y sostenido durante varios meses de seguimiento.

Por último, varias comunicaciones preliminares y un estudio fase 1 muy reciente han descrito los resultados clínicos de la expansión de PH de SCU en el sistema AastromReplicell. En este estudio, 28 pacientes recibieron PH de SCU expandidas mediante este sistema automático de perfusión continua como complemento de trasplantes convencionales en el día +12. La conclusión del estudio es que la expansión de PH de SCU a escala clínica es posible, y que la administración de los progenitores expandidos es bien tolerada, si bien el aporte de un número suplementario de PH no redujo el tiempo de prendimiento.

Tabla 2. Experiencia clínica en trasplante de PH expandidos *in vitro*

Referencia	pH expandidos	Método de expansión
Silver et al ¹⁴	MO	IL-3 + GM-CSF + EPO + SCF
Bender et al ¹⁵	SPM	PIXY 321
Brugger et al ^{16,17}	SPM	SCF + IL-1 β + IL-3 + IL-6 + epo
Koller et al ¹⁸	MO	EPO + PIXY 321 + FL
Stiff et al ¹⁹	MO	EPO + PIXY 321 + FL
Mc Niece et al ²⁰	SPM	SCF + TPO + G-CSF
Jarosca et al ²¹	SCU	EPO + PIXY 321 + FL

MO: médula ósea; SPM: sangre periférica movilizada; SCU: sangre de cordón umbilical.

En la tabla 2 se resume la experiencia clínica en trasplante de PH expandidos *in vitro*.

Perspectivas

Considerando de una forma global las posibilidades de expansión y diferenciación *ex vivo* de las células hematopoyéticas, es posible suponer una amplia gama de aplicaciones clínicas en el futuro. Desde el punto de vista más básico, las células diferenciadas con compromiso de línea mieloide expandidas *ex vivo* podrían ser utilizadas en diversas situaciones frecuentes en la práctica clínica oncohematológica, que incluyen la pancitopenia posquimioterapia convencional y la quimioterapia a altas dosis. En el caso del trasplante tanto autólogo como alogénico, los PH diferenciados expandidos *ex vivo* podrían reducir igualmente el período de pancitopenia postrasplante así como evitar recolecciones extensas o largos procesos de aféresis. En estas situaciones no sería estrictamente necesario expandir auténticas SRC, ya que la expansión, fácilmente conseguible, de progenitores con compromiso de línea podría ser suficiente. En el caso de la SCU, la expansión podría llegar a ser la clave para la generalización de este tipo de trasplantes, actualmente reservado casi totalmente a niños, al poder proporcionar suficiente número de progenitores para receptores adultos y posibilitar la creación de amplios bancos de este tejido habitualmente desechado.

La posibilidad de controlar la expansión *ex vivo* más allá de la línea mieloide podría tener aplicaciones más amplias y más novedosas. La expansión *ex vivo* de la línea linfóide podría permitir la "educación" *ex vivo* de los linfocitos T del donante para conseguir una actividad antitumoral específica, lo que proporcionaría un importantísimo avance en la inmunoterapia adoptiva. La expansión simultánea de células mieloides y linfoides conseguiría aportar tanto soporte hematopoyético como actividad antitumoral específica.

La posibilidad de expandir las auténticas *stem cell* pluripotentes con capacidad de autorrenovación constituiría el punto de partida para la generalización de la terapia génica, ya que la división de las *stem cell ex vivo* constituye la limitación más importante para su

transducción mediada por vectores virales. La posibilidad de regular la división de las *stem cells in vitro* permitiría incrementar su nivel de transducción permitiendo dar paso a diversas aplicaciones clínicas de las *stem cells* modificadas genéticamente.

Pero la realidad, es que hoy por hoy y a pesar de los importantes avances en este terreno, no se ha alcanzado la etapa del uso clínico habitual de las células expandidas *in vitro* y las series publicadas en la literatura médica no han demostrado claramente las ventajas clínicas del trasplante de células expandidas sobre el trasplante convencional. Siguen quedando varias cuestiones de vital importancia por resolver:

1. Determinación del tipo de pacientes que podrían beneficiarse de la infusión de un injerto expandido y en qué situaciones: autotrasplante de médula ósea, alotrasplante, trasplante de SCU en adultos, trasplantes de SPM o simplemente rescate de la pancitopenia posquimioterapia no mieloablativa.

2. Determinación de la necesidad de expandir sólo progenitores codificados tipo CFC, LTCIC o auténticas SRC con características de *stem cells* en cada una de las posibles situaciones clínicas.

3. Determinación del método adecuado para conocer con certeza en el contexto clínico el contenido de células con auténtica capacidad de autorrenovación y repoblación hematopoyética permanente en los injertos expandidos.

4. Determinación de la posibilidad de los injertos expandidos de prender más rápidamente que los no modificados para así reducir o anular la neutropenia postrasplante.

5. Determinación en el caso particular de la SCU, que de forma conocida prende de manera más lenta, si la expansión *ex vivo* de PH podría acortar el período de preindimiento o por el contrario lo prolonga.

6. Determinación de la fisiología *in vivo* postrasplante de las células T derivadas de injertos expandidos y su papel en la reacción injerto contra huésped e injerto contra leucemia en el contexto alogénico.

Aunque todas estas cuestiones están pendientes, los rápidos avances en el conocimiento de la biología celular y molecular de los que estamos siendo testigos abren la puerta a la consideración de que la expansión *in vitro* a nivel clínico puede ser una realidad no muy lejana, con las ventajas que esto podría suponer para algunos pacientes que hoy por hoy no pueden beneficiarse del trasplante de PH.

Bibliografía

1. Koller MR, Palsson MA, Manchel I, Palsson BO. Long-term culture-initiating cell expansion is dependent on frequent medium exchange combined with stromal and other accessory cell effects. *Blood* 1995;86:1784-93.
2. Koller MR, Manchel I, Newson BS, Palsson MA, Palsson BO. Bioreactor expansion of human bone marrow: comparison of unprocessed, density-separated, and CD34-enriched cells. *J Hematother* 1995;4:159-69.

3. Petzer A, Zandstra P, Piret J, Eaves C. Differential cytokine effects on primitive (CD34+ CD38-) human hematopoietic cells: Novel responses to Flt3-Ligand and thrombopoietin. *J Expl Med* 1996;183:2551-8.
4. Piacibello W, Sanavio F, Garetto L, Severino A, Bergandi D, Ferrario J, et al. Extensive amplification and self-renewal of human primitive hematopoietic stem cells from cord blood. *Blood* 1997;89:2644-53.
5. Piacibello W, Sanavio F, Severino A, Dane A, Gammaitoni L, Fagioli F, et al. Engraftment in nonobese diabetic severe combined immunodeficient mice of human CD34+ cord blood cells after ex vivo expansion: Evidence for the amplification and self-renewal of repopulating stem cells. *Blood* 1999;93:3736-49.
6. Bathia M, Bonnet D, Kapp U, Wang J, Murdoch B, Dick J. Quantitative analysis reveals expansion of human hematopoietic repopulating cells after short-term ex vivo culture. *J Exp Med* 1997;186:619-24.
7. Weaver CH, Hazelton B, Birch R, Palmer P, Allen C, Schwartzberg L, et al. An analysis of engraftment kinetics as a function of the CD34 content of peripheral blood progenitor cell collections in 692 patients after the administration of myeloablative chemotherapy. *Blood* 1995;86:3961-9.
8. Reisner Y, Martelli MF. Bone marrow transplantation across HLA barriers by increasing the number of transplanted cells. *Immunology Today* 1995;16:437-40.
9. Wang J, Doedens M, Dick J. Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by quantitative *in vivo* SCID-repopulating cell assay. *Blood* 1997;89:3919-24.
10. Petzer A, Zandstra P, Piret J, Eaves C. Differential cytokine effects on primitive (CD34+ CD38-) human hematopoietic cells: Novel responses to Flt3-Ligand and thrombopoietin. *J Expl Med* 1996;183:2551-8.
11. Herrera C, Sánchez J, Torres A, Bellido C, Rueda A, Álvarez MA. Early-acting cytokine driven ex vivo expansion of mobilized peripheral blood stem cells generates post-mitotic offspring with preserved engraftment ability in non-obese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *Br J Haematol* 2001;114:920-30.
12. Herrera C, Sánchez J, Torres A, Pascual A, Rueda A, Álvarez MA. Pattern of expression of CXCR4 and adhesion molecules by human CD34+ cells from different sources: role on homing efficiency on NOD/SCID mice [in press]. *Haematologica* 2004.
13. Glimm H, Eaves CJ. Direct evidence for multiple self-renewal divisions of human *in vivo* repopulating hematopoietic cells in short-term culture. *Blood* 1999;94:2161-8.
14. Silver SM, Adams PT, Hutchinson RJ, Douville JV, Paul LA, Clarke MF, et al. Phase I evaluation of ex vivo expanded hematopoietic cells produced by perfusion cultures in autologous bone marrow transplantation [abstract]. *Blood* 1993;82:297.
15. Bender JG, Zimmerman T, Lee WJ, Loudovaris MF, Qiao X, Schilling ML, et al. Large scale selection of CD34+ cells and expansion of neutrophil precursors in PIXY 321 for clinical application [abstract]. *Blood* 1994;84:542.
16. Brugger W, Mocklin W, Heimfeld S, Berenson RJ, Mertelsmann R, Kanz L. Ex vivo expansion of enriched peripheral blood CD34 + progenitor cells by stem cell factor, interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-3, interferon- γ , and erythropoietin. *Blood* 1993;81:2579-84.
17. Brugger W, Heimfeld S, Berenson RJ, Mertelsmann R, Kanz L. Reconstitution of hematopoiesis after high-dose chemotherapy by autologous progenitor cells generated ex vivo. *N Engl J Med* 1995;333:283-7.
18. Koller MR, Oxender M, Jensen TC, Goltry KL, Smith AK. Direct contact between CD34+ lin- cells and stroma induces a soluble activity that specifically increases primitive hematopoietic cell production. *Exp Hematol* 1999;27:734-41.
19. Stiff P, Chen B, Franklin W, Oldenberg D, Hsi E, Bayer E, et al. Autologous expansion of ex vivo expanded bone marrow cells grown from small aliquots after high-dose chemotherapy for breast cancer. *Blood* 2000;95:2169-74.
20. Mc Niece I, Jones R, Bearman SI, Cagnoni P, Nieto Y, Franklin J, et al. Ex vivo expanded peripheral blood progenitor cells provide rapid neutrophil recovery after high dose chemotherapy in patients with breast cancer. *Blood* 2000;96:3001-7.
21. Jaroscak J, Goltry K, Smith A, Waters-Pick B, Martin P, Driscoll TA, et al. Augmentation of umbilical cord blood (UCB) transplantation with ex vivo expanded UCB cells: results of a phase I trial using the Aas-tronReplicell system. *Blood* 2003;101:5061-7.

PERSPECTIVAS ACTUALES DE LA TERAPÉUTICA ANTITROMBÓTICA

COORDINADORES J. VALLÉS. *Falta centro??, Valencia*
M. RUANO. *Falta centro??, Valencia*

Resumen simposio

En las dos últimas décadas, y fundamentalmente en el entorno del tratamiento de la cardiopatía coronaria, ha tenido lugar un espectacular desarrollo de opciones en la farmacología antitrombótica, de eficacia probada. El proceso expansivo está lejos de detenerse. En fase de investigación clínica o de próxima comercialización aparece una larga lista de fármacos: inhibidores de factor VIIa/factor tisular (TFPI-NAPc2), inhibidores específicos del factor Xa (fondaparinux, idraparinux), inhibidores de los factores Va y VIIIa (PCa), inhibidores directos de la trombina activos por vía oral (ximelagatran), etc.

No obstante la evidencia del beneficio clínico de los fármacos en uso (en algunos casos contrastada en las series más amplias de pacientes de ensayos clínicos controlados) la plena eficacia está lejos de conseguirse, y las complicaciones tromboembólicas pese a su empleo, siguen teniendo lugar. Los esfuerzos por desarrollar nuevos fármacos están pues, plenamente justificados. Las limitaciones terapéuticas se han hecho particularmente evidentes entre los fármacos antiplaquetarios. La función plaquetaria, cuya extraordinaria complejidad, incrementada por sus relaciones con otras células y sistemas, apenas hemos comenzado a entrever, dificulta el diseño de fármacos que controlen eficazmente su actividad.

En la primera ponencia, el Dr. López Farré describe uno de estos factores, la interacción entre la actividad plaquetaria y el proceso inflamatorio. Como el autor señala, aunque ya Virchow, en el siglo XIX, consideró a la ateromatosis como un proceso inflamatorio, no ha sido hasta bien recientemente, con el establecimiento del concepto de placa activa, cuando se ha retomado la importancia del papel que la inflamación tiene en el desarrollo de la placa y la precipitación en ella de fenómenos trombóticos. El valor pronóstico de la proteína C reactiva en el SCA, o la relación de sus niveles con el beneficio de la aspirina a largo plazo, son hechos que, desde la clínica, avalan la relación trombo-s-inflamación. En su ponencia el Dr. López Farré describe la actividad proinflamatoria de la activación plaquetaria y, recogiendo resultados de una larga experiencia investigadora propia, el posible papel que un efecto antiinflamatorio de algunos fármacos antiplaquetarios puede tener en su eficacia terapéutica.

El Dr. Altman ofrece una visión global, personal y crítica de los fármacos antiplaquetarios poniendo de manifiesto las limitaciones de algunos de los que más expectativas despertaron, como es el caso de los inhibidores de la glucoproteína IIb/IIIa. Dedicó un apartado especial al controvertido tema de la influencia en el riesgo trombótico de los antiinflamatorios no esteroideos por inhibición de la ciclooxigenasa-2. El ponente, tras evaluar la información disponible, considera que está justificado seguir investigando el posible papel terapéutico de este tipo de fármacos en el tratamiento de los síndromes coronarios agudos.

Las limitaciones de los fármacos antiplaquetarios a las que acabamos de aludir han cristalizado para los empleados por vía oral a largo plazo en el concepto de resistencia. El diferente significado con el que se utiliza el término y las aún escasas investigaciones al respecto hacen que todavía exista mucha confusión sobre el tema. Considerado desde un punto de vista clínico el hecho es que, a pesar de los cócteles antitrombóticos que se usan, por ejemplo, en los síndromes coronarios agudos, la proporción de pacientes que, escapando a la acción de la combinación de fármacos muestran persistencia de importante actividad agregante de las plaquetas en el laboratorio, es muy significativa. Ya son varios los estudios clínicos que han puesto de manifiesto que los pacientes con resistencia a la aspirina muestran mayor frecuencia de eventos cardiovasculares. Los datos de laboratorio no pueden por tanto considerarse irrelevantes. Bien al contrario, tales determinaciones nos servirían para monitorizar el tratamiento y ponernos en guardia en los casos con respuesta inadecuada. La trascendencia del problema es inmensa: el número de pacientes que reciben el fármaco en Estados Unidos, sólo en cardioprotección, alcanza los 26 millones de ciudadanos y la resistencia a la aspirina se sitúa entre un 10 y un 30%. Lamentablemente las técnicas actuales tienen todavía un grado de dificultad técnica que dificulta su incorporación a la práctica asistencial.

Los Dres. Santos, Vallés y Aznar que han realizado varios estudios sobre la acción de la aspirina en distintas poblaciones de pacientes con patología aterotrombótica, presentan una síntesis sobre los distintos mecanismos por los que la agregación plaquetaria puede mantenerse normal, e incluso exacerbada, a pesar del empleo de aspirina. A pesar de la contrastada eficacia clínica de la aspirina (y quizá de sorprendentemente elevada entidad), son muchos los pacientes en los que la síntesis de tromboxano no está suficientemente inhibida. En otros, persiste la actividad plaquetaria a pesar de estar inhibida la síntesis de tromboxano. En ocasiones son responsables simples problemas farmacocinéticos, para los que los autores sugieren soluciones. En otros se haría necesario combinar fármacos cuya acción incide sobre otras vías de activación plaquetaria. Los autores plantean la necesidad de la valoración individualizada de la acción de los fármacos antiagregantes.

El control de la enfermedad aterotrombótica y sus agudizaciones constituye un difícil desafío. La importante redundancia de los sistemas biológicos como la coagulación pueden hacer imposible el control de la trombogénesis actuando en un solo punto. Hasta qué punto podremos seguir asociando fármacos sin incurrir en un riesgo hemorrágico inasumible es la otra cara de la moneda.

PARTICIPACIÓN DE LAS PLAQUETAS EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA DE LOS SÍNDROMES CORONARIOS AGUDOS

A. LÓPEZ FARRÉ, C. MACAYA, P. JIMÉNEZ MATEOS-CÁCERES Y A. GARCÍA-MÉNDEZ.

*Unidad de Investigación Cardiovascular.
Hospital Clínico San Carlos. Madrid.*

Inflamación y patología cardiovascular

Posiblemente la idea de la implicación de la inflamación en la génesis y progresión de las patologías cardiovasculares comienza cuando a finales del siglo XIX el profesor Rudolf Virchow llamó a la aterosclerosis endarteritis nodosa y la consideró un proceso inflamatorio aunque él nunca llegó a publicar estas observaciones. Los pensamientos del profesor Virchow fueron publicados por el Dr. Rather en 1990. Evidentemente, hoy nadie duda que las patologías cardiovasculares tienen un componente inflamatorio muy importante.

En los últimos años, se han buscado marcadores inflamatorios fácilmente detectables en suero o en plasma de los pacientes que nos indicarán no sólo el grado inflamatorio del paciente sino su pronóstico de riesgo cardiovascular. En este sentido, se han identificado citoquinas, proteínas de adhesión de leucocitos, marcadores tromboticos y fibrinolíticos y así hasta un largo etc. Pero en 1994, el Dr. Attilio Maseri describió en un artículo publicado en *New England Journal of Medicine* el valor pronóstico que podría tener la proteína C reactiva (PCR) en la evolución intrahospitalaria de pacientes con angina inestable. En este artículo, se demostró cómo los pacientes con angina inestable severa que al ingreso en el hospital tenían

los niveles más elevados de PCR tenían una mayor probabilidad de sufrir un segundo evento coronario durante su estancia hospitalaria. Estos hallazgos sugerían el valor pronóstico de evolución clínica que podría tener la determinación de un reactante inflamatorio de fase aguda como es la PCR.

Las observaciones del Dr. Maseri fueron posteriormente reafirmados por el Dr. Ridker demostrando en sujetos aparentemente sanos que aquellos pacientes que se encontraban en el cuartil superior de niveles de PCR, es decir tenía niveles más elevados de PCR, mostraban un riesgo relativo de infarto de miocardio. Esto apoya una vez más la importancia que tiene la inflamación en el pronóstico clínico.

La manifestación extrema de la importancia de la inflamación en las patologías cardiovasculares quizá sean las observaciones inmunohistológicas de placas de ateroma rotas en donde se observa en la zona de la fisura de la placa el trombo justo con una gran infiltración de células proinflamatorias particularmente macrófagos y linfocitos. Esto sugeriría una estrecha relación entre la trombosis y la inflamación.

Trombosis e inflamación

En los últimos años se ha comenzado a analizar que relación tiene la trombosis con la inflamación asociada al síndrome coronario agudo. Como ya hemos referido, en muestras histológicas se observa de forma sistemática que los lugares de rotura de la placa ateromatosa, donde se produce la formación del trombo plaquetario, existe una acumulación grande de células de origen inflamatorio (monocitos, macrófagos e incluso linfocitos). Estudios posteriores han demostrado que las plaquetas activadas estimulan la capacidad inflamatoria de los leucocitos mediante la potenciación de la liberación de especies reactivas de oxígeno, como el ion superóxido, por parte de los leucocitos. A través de la P-selectina expresada en la superficie de las plaquetas activadas

estas células interactúan con los leucocitos circulantes potenciando la liberación de ion superóxido.

La plaqueta es una célula compleja y todavía no muy bien conocida. Hasta hace no muchos años se consideraba que la plaqueta era una célula que generaba algunos factores potenciadores de su propia activación como la histamina, adenosín difosfato, tromboxano A₂ o ácido araquidónico, o bien almacenaba en su interior factores relacionados con el crecimiento celular como es el factor de crecimiento derivado de las plaquetas. No obstante, la plaqueta contiene también factores relacionados de forma directa con la inflamación como es la interleuquina, la quimoquina RANTES, la gelatinasa B (MMP-9) o el ligando del CD40 (CD40L). Por lo tanto, la plaqueta se podría considerar una célula que tiene una actividad proinflamatoria propia desde el punto de vista de que contiene agentes en su interior relacionados con la inflamación.

La pregunta que surge entonces es ¿cómo se puede definir el papel real de la plaqueta en la reacción inflamatoria? Para analizar este fenómeno se pueden seguir diferentes aproximaciones pero quizá lo mejor sea analizar qué ocurre en la reacción inflamatoria de los síndromes coronarios agudos si somos capaces de reducir la activación de las plaquetas.

La formación del trombo plaquetario depende de la unión de diferentes plaquetas cuyo puente interplaquetario es el fibrinógeno.

El fenómeno común que ocurre en la activación de las plaquetas, sea cual fuere el agente inductor de la misma, es la activación de los receptores del fibrinógeno, las glucoproteínas IIb/IIIa (GP IIb/IIIa). Como resultado de la activación de las plaquetas, se unen moléculas de fibrinógeno dimericas a los receptores GP IIb/IIIa activados de la superficie plaquetaria y de esta forma se unen entre sí dos plaquetas, que después interactuarán con más plaquetas por medio de un efecto de "bola de nieve" produciéndose un agregado plaquetario.

Existen diferentes trabajos en la literatura médica que han atribuido efectos adicionales a la inactivación plaquetaria por la inhibición del receptor GP IIb/IIIa. Existen diferentes fármacos capaces de inhibir los receptores GP IIb/IIIa. Uno de estos fármacos es el abciximab que es un anticuerpo quimérico. Se ha observado que el abciximab puede tener efectos antiinflamatorios. En este sentido, se ha observado que abciximab puede interactuar con la integrina Mac-1 expresada en el leucocito activado. Esto implicaría que abciximab podría interferir con el reclutamiento de monocitos al sitio de la pared vascular dañado e inflamado. También se ha observado que el abciximab reduce el número de plaquetas adheridas a los leucocitos y que reduce al nivel circulante de biomarcadores asociados a la respuesta inflamatoria en pacientes tras revascularización coronaria. Todos estos hallazgos se han atribuido a que el abciximab al ser un anticuerpo quimérico es

capaz de reconocer otras proteínas como sería el caso del Mac-1 o la vitronectina, lo que le confería esta capacidad antiinflamatoria además de inhibir la activación de las plaquetas.

Por tanto, las observaciones realizadas mediante la reducción de la activación plaquetaria por la administración de abciximab genera la duda de si sus efectos antiinflamatorios son realmente debidos a la inhibición del receptor GP IIb/IIIa plaquetario, y por tanto la posible relación de las de las plaquetas sobre la reacción inflamatoria, o se debe a la interacción con otras moléculas como vitronectina o Mac-1. Con esta pregunta sin responder, nuestro grupo de investigación analizó si otra molécula inhibidora de los receptores GP IIb/IIIa, el tirofiban, que en este caso es un compuesto no peptídico que en teoría sólo interactuaría con el receptor GP IIb/IIIa podría también modificar la respuesta inflamatoria. Para ello se realizó un estudio en cobayas en las que se les infundió endotelina-1 en presencia o ausencia de tirofiban determinándose el nivel de expresión de diferentes marcadores inflamatorios en el miocardio y en los leucocitos circulantes.

La endotelina-1 es un péptido de origen endotelial que además de su reconocida capacidad vasoconstrictora tiene actividad proinflamatoria y activa las plaquetas. El modelo de infusión de endotelina-1 en cobaya se asemejaría por tanto a fenómenos que ocurren durante una angina inestable. En este estudio observamos que en cobayas trombocitopénicas la capacidad de la endotelina-1 de inducir la expresión de moléculas asociadas con la respuesta inflamatoria en el miocardio como la ciclooxigenasa-2 (COX-2), estaba disminuida. La infusión de tirofiban redujo también la expresión de COX-2 y factor tisular inducido por endotelina-1 no sólo en el miocardio sino también en los leucocitos circulantes. Una observación interesante del estudio fue la que infusión de tirofiban redujo la translocación a núcleos aislados de muestras de miocardio del factor de transcripción Sp-1. Esto sugeriría que la inhibición de la activación plaquetaria podría reducir la activación de la expresión de genes asociados con la respuesta inflamatoria a través de la inhibición de la activación de factores de transcripción como el Sp-1. Recientemente, Gaway et al también han demostrado que las plaquetas activadas favorecen la expresión de moléculas de adhesión relacionadas con la respuesta inflamatoria en células endoteliales en cultivo activando la translocación al núcleo del endotelio del factor nuclear κ B. En definitiva, todos estos hallazgos sugerirán que las plaquetas participan en la respuesta inflamatoria de forma directa actuando al menos como células potenciadoras de la misma.

La pregunta que evidentemente surge es si el grado inflamatorio del paciente puede predecir en parte su futuro pronóstico clínico evolutivo, la inhibición de la actividad plaquetaria puede entonces variar a largo plazo el pronóstico clínico de los pacientes. Realmente no existen datos sobre esta pre-

gunta en la literatura especializada. No obstante, el año pasado se publicó un trabajo cuya conclusión principal fue que si se logra una inhibición de la activación plaquetaria mayor o igual al 80 % se reducen los niveles circulantes de marcadores asociados con la inflamación como es el CD40L, pero sin embargo, si la inhibición de las plaquetas es parcial en torno al 20-50 % lo que se consigue es el efecto opuesto una potenciación de la formación de estos marcadores proinflamatorios. Esto abre el tema de si deberíamos controlar de forma individualizada el grado de inhibición plaquetaria que alcanzamos con los tratamientos estandarizados en nuestros pacientes. En este sentido, se comienza a conocer la existencia de polimorfismo de proteínas expresadas en la superficie plaquetaria incluidos de los receptores GP IIb/IIIa que nos sugería que no todos los pacientes se van a beneficiar de igual forma por los tratamientos antiplaquetarios estandarizados. De hecho, algunos de estos polimorfismos se han asociado con una mayor activación de las plaquetas.

¿Cuál es el futuro de la investigación de la relación trombosis-inflamación?

Hay nuevos conceptos que seguramente marcarán los hallazgos científicos de los próximos años no sólo de la investigación de las enfermedades cardiovasculares sino probablemente de la ciencia en general. Uno de estos conceptos son las nuevas tecnologías que están a nuestro alcance como es el caso de la proteómica.

Las proteínas están envueltas en todas las funciones celulares, controlan cualquier mecanismo que ocurre en el interior celular y son modificadas en diferentes patologías, por tanto, el proteoma dicta el fenotipo de la célula y su funcionalidad así como la funcionalidad del tejido en el cual la célula está comprometida. Además, el fenotipo puede variar en condiciones normales, únicamente por el estado de crecimiento de la célula o la edad, además de evidentemente variar por la intervención en respuesta a los estímulos que aparecen durante enfermedades crónicas o agudas. El proteoma por tanto es un elemento dinámico que refleja las condiciones a las que está sometida una célula, a diferencia del genoma que es un elemento estático de la célula. La proteómica es el estudio del proteoma, o lo que es lo mismo el contenido total de proteínas de una célula que se expresan en un momento dado y no sólo aquellas que aparecen en la célula mediante la expresión de un gen, sino también todas aquellas generadas por modificaciones postraduccionales (glucosilaciones, fosforilaciones, acetilaciones, etc.) en el proceso postraduccionales.

Aunque se pueden utilizar muchas técnicas para detección de las proteínas de una célula, básicamente el estudio mediante la técnica de proteómica consiste en la separación previa de las proteínas, identificación de las mismas, y caracterización de la naturaleza y posición de sus modificaciones. Para

ello, en primer lugar, se utiliza una doble electroforesis. La primera en un gel de poliacrilamida que contiene un gradiente de pH con el cual se puede determinar el punto isoeléctrico de las diferentes proteínas. La segunda separación se hace mediante un gel que nos permite identificar las proteínas en función de su peso molecular. Después de la realización de la electroforesis bidimensional se pueden detectar los puntos de las diferentes proteínas tiñéndolas.

Este punto específico para cada proteína estará por lo tanto basado en una coordenada definida por el punto isoeléctrico de la proteína y por su peso molecular, lo que constituye una propiedad única de cada proteína definiendo así el mapa de expresión proteica de una célula, un tejido, o incluso del plasma de un sujeto en un momento definido. Se puede por ejemplo incluso comparar el mapa de expresión proteica de las plaquetas de un paciente antes y después de un tratamiento por ejemplo la inhibición de sus receptores GP IIb/IIIa, o como afecta la inhibición plaquetaria en los niveles de marcadores inflamatorios plaquetarios de un paciente.

En el momento actual, se está comenzando a utilizar esta tecnología en el estudio de las enfermedades cardiovasculares y probablemente, en un futuro inmediato, podamos determinar, basándonos en el mapa de expresión proteica las plaquetas de un individuo, el tipo de tratamiento que debemos seguir y el grado de inhibición de la actividad plaquetaria que podemos alcanzar. En este sentido, nosotros hemos descrito recientemente, utilizando la proteómica, como en el plasma obtenido de pacientes durante un síndrome coronario agudo se reduce, incluso desaparece, la presencia de algunas isoformas de moléculas relacionadas con la respuesta inflamatoria como es el caso de la alfa-1 antitripsina y, sin embargo, otras isoformas de esta proteína aumentan su expresión en los pacientes con angina inestable respecto al plasma de pacientes en la fase aguda de un infarto agudo de miocardio. Esto sugeriría que la mayor o menor expresión de algunas isoformas de alfa-1 antitripsina podrían estar involucradas con la manifestación clínica del síndrome coronario, angina inestable frente a infarto agudo de miocardio ya que la alfa-1 antitripsina, además de ser un marcador inflamatorio, existen datos en la literatura que la implican biológicamente en la protección miocárdica. Si la mayor o menor activación de las plaquetas puede modificar la expresión de diferentes isoformas de marcadores inflamatorios y que relevancia clínica tiene este hecho es algo que queda por responder pero seguro marcará el curso futuro de la investigación en este campo.

Bibliografía recomendada

Angiolillo DJ, Fernández-Ortiz A, Bernardo E, Ramírez C, Escaned J, Moreno R, et al. 807 C/T Polymorphism of the glycoprotein Ia gene and pharmacogenetic modulation of platelet response to dual antiplatelet treatment. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2004;15:427-33.

- Dechanet J, Grosset C, Taupin JL, Merville P, Banchereau J, Ripoché J, et al. CD40 ligand stimulates proinflammatory cytokine production by human endothelial cells. *J Immunol* 1997;159:5640-7.
- Ercan E, Bozdemir H, Tengiz I, Sekuri C, Aliyev E, Akilli A, et al. Decreased soluble cell adhesion molecules after tirofiban infusion in patients with unstable angina pectoris. *Thromb J* 2004;2:4.
- Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Koch W, Laugwitz KL, Adelsberger H, et al. Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation* 1998;98:1164-71.
- Gratzinger D, Canosa S, Engelhardt B, Madri JA. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 modulates endothelial cell motility through the small G-protein Rho. *FASEB J* 2003;17:1458-69.
- Lee Y, Lee WH, Lee SC, Ahn KJ, Choi YH, Park SW, et al. CD40L activation in circulating platelets in patients with acute coronary syndrome. *Cardiology* 1999;92:11-6.
- Lincoff AM, Kereiakes DJ, Mascelli MA, Deckelbaum LI, Barnathan ES, Patel KK, et al. Abciximab suppresses the rise in levels of circulating inflammatory markers after percutaneous coronary revascularization. *Circulation* 2001;104:163-7.
- Listi F, Candore G, Lio D, Cavallone L, Colonna-Romano G, Caruso M, et al. Association between platelet endothelial cellular adhesion molecule 1 (PECAM-1/CD31) polymorphisms and acute myocardial infarction: a study in patients from Sicily. *Eur J Immunogenet* 2004;31:175-8.
- Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, Grillo RL, Rebuzzi AG, Pepys MB, et al. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 1994;331:417-24.
- Mateos-Cáceres PJ, García-Méndez A, López-Farré A, Macaya C, Núñez A, Gómez J, et al. Proteomic analysis of plasma from patients during an acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol* (en prensa).
- Molero L, Farré J, García-Méndez A, Jiménez Mateos-Cáceres P, Carrasco Martín C, Millas I, et al. Endothelin-1 induced proinflammatory markers in the myocardium and leukocytes of guinea-pigs: role of glycoprotein IIB/IIIA receptors. *Cardiovasc Res* 2003;57:109-18.
- Nannizzi-Alaimo L, Alves VL, Phillips DR. Inhibitory effects of glycoprotein IIB/IIIA antagonists and aspirin on the release of soluble CD40 ligand during platelet stimulation. *Circulation* 2003;107:1123-8.
- Neumann FJ, Zohlnhofer D, Fakhoury L, Ott I, Gawaz M, Schomig A. Effect of glycoprotein IIB/IIIA receptor blockade on platelet-leukocyte interaction and surface expression of the leukocyte integrin Mac-1 in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:1420-6.
- Soeki T, Tamura Y, Shinohara H, Sakabe K, Onose Y, Fukuda N. Increased soluble platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 in the early stages of acute coronary syndromes. *Int J Cardiol* 2003;90:261-8.
- Wagner AH, Gebauer M, Guldenzoph B, Hecker M. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase-independent inhibition of CD40 expression by atorvastatin in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1784-9.

PERSPECTIVAS CLÍNICAS DE LA TERAPIA ANTIPLAQUETARIA

R. ALTMAN

Centro de Trombosis de Buenos Aires y Unidad Académica Buenos Aires. Magíster en Trombosis. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Tucumán. Buenos Aires. Argentina.

Introducción

El trombo se forma sobre la placa aterosclerótica, como consecuencia de la fractura del hombro del ateroma, o secundario a erosiones endoteliales de la misma o a modificaciones hemorreológicas producidas en la cara distal de la placa y determina oclusiones parciales o totales de la luz coronaria^{1,2}. Quisiéramos puntualizar desde ya, que la terminología que trata de definir una situación aguda por la oclusión coronaria, llamada aterotrombosis crea un concepto fisiopatológico y terapéutico tardío. Sostenemos que la base fisiopatológica de la formación del trombo es la ateroinflamación una etapa más temprana en la secuencia trombótica. Ello no es un concepto menor, ya que modifica la idea tradicional de

los síndromes trombóticos, no porque no fueran necesarios los medicamentos antitrombóticos (antiagregantes y/o anticoagulantes) sino porque permite intuir que la terapéutica en una etapa más temprana permitiría una prevención más adecuada de los arteriales trombóticos. La terapéutica con antiplaquetarios pretende inhibir el mecanismo fisiológico de la relación de las plaquetas con el endotelio arterial. Pero ello se consigue parcialmente ya que si bien se ha logrado disminuir la incidencia de la patología trombótica, ella es aún suficientemente elevada como para constituirse en la primera causa de morbimortalidad en el mundo.

¿Como deberíamos frenar el proceso trombótico arterial? Basados en las características de las trombosis, donde según las condiciones del flujo, se combinan en diferentes grados las plaquetas y la fibrina, el empleo de antiagregantes plaquetarios y anticoagulantes parece ser la terapéutica más racional. Pero trataremos de exponer nuestra visión acerca del porqué existen fallas en la prevención de la trombosis.

La aspirina es aceptada como el tratamiento de elección frente a un síndrome coronario agudo así como también para la prevención secundaria de las coronariopatías trombóticas.

Los nuevos compuestos antiplaquetarios incluyen los fármacos que bloquean la acción de la adenosina difosfato (ADP), los inhibidores de la fosfodiesterasa, los que bloquean los receptores plaquetarios llamados globalmente integrinas y otras muchas que se han empleado experimentalmente pero que no están aún disponibles para la terapéutica.

El objetivo de esta presentación es discutir los hallazgos clínicos por el empleo de estas medicaciones y tratar de explicar por qué, a pesar del uso de poderosos tratamientos, las complicaciones trombóticas coronarias son, como dijéramos, aún muy elevadas.

Aspirina

La aspirina es el "patrón oro" entre los fármacos que inhiben la función plaquetaria, con la que deben compararse todas los nuevos antiplaquetarios que van apareciendo en el mercado farmacéutico.

La aspirina acetila la ciclooxigenasa 1 (COX-1, prostaglandina G/H sintetasa), en forma irreversible. A pesar que la inhibición de la COX-1 por la aspirina produce una caída de más del 95% tanto del tromboxano A₂ (TXA₂) como de la prostaciclina (PGI₂), el resultado final clínico indicado por los diversos metaanálisis es una reducción del 25% de los accidentes cardiovasculares. Este efecto beneficio podría estar determinado simplemente por su acción antiplaquetaria o, además, por los efectos pleiotrópicos de la aspirina.

Una nueva posibilidad terapéutica se abre a través de la inhibición de la lipooxigenasa: la 5-lipooxigenasa de los leucocitos cataliza la formación de los leucotrienos, que tienen abundante expresión en la pared arterial en pacientes con lesiones ateroscleróticas^{3,4}.

La COX-1 o constitutiva está presente en la mayoría de los tejidos y en las plaquetas, y participa en la síntesis de las prostaglandinas y, de esta manera, en la interrelación de la célula endotelial y las plaquetas. Existe una segunda enzima dentro de este grupo, la COX-2 o inducible, cuya composición en sus aminoácidos corresponden al 62% de la isoenzima tipo 1, se expresa sólo después de la activación celular en respuesta a la acción de factores de crecimiento, o de mediadores de la inflamación. Las diversas drogas antiinflamatorias no esteroideas, poseen diferentes efectos inhibitorios sobre las dos isoenzimas de la COX. La aspirina es especialmente inhibidora de la COX-1, y sólo en dosis mayores tendría efecto sobre la COX-2. La COX-2 tiene expresión en los leucocitos, en las células del endotelio vascular y en los macrófagos que infiltran la placa aterosclerótica⁵. La COX-2 puede ser detectada en áreas ateroscleróticas pero no en la pared de vasos normales⁶.

Las drogas que inhiben la COX-2 disminuyen la generación de prostaciclina, pero no la de tromboxano A₂. Entonces, la pérdida del balance por la inhibición en la producción de prostaciclina vascular y la falta de efecto sobre el tromboxano conlleva a un aumento en la activación de las plaquetas que, potencialmente inclina la hemostasia hacia un estado protrombótico (fig. 1).

Estudios con aspirina

Prevención primaria del infarto de miocardio

Aún cuando pudo constatarse una tendencia favorable por el uso de la aspirina en la prevención pri-

maria de sucesos cardiovasculares, la posibilidad de accidentes cerebrovasculares y digestivos no aconsejan su utilización en personas sin antecedentes cardiovasculares^{7,8} aunque esta posición no es de indiscutida aceptación^{9,10}. Para ello hay que tener en cuenta 2 estudios publicados hace unos años^{11,12}.

El uso de la aspirina frente a la presencia de factores de riesgo en pacientes sin antecedentes coronarios, esta avalado por los resultados de varios estudios^{13,14}.

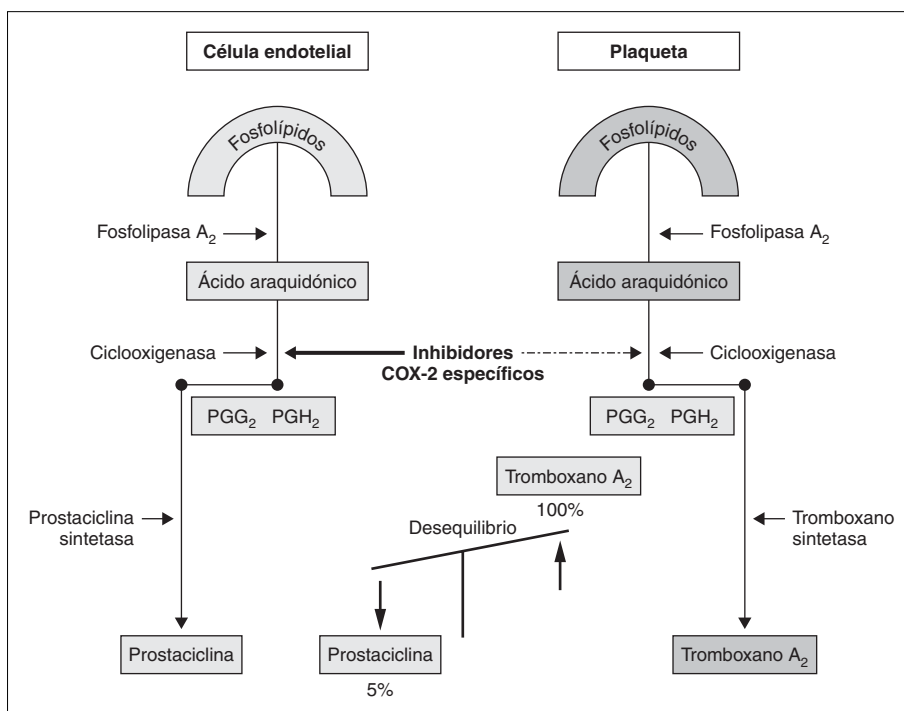
Prevención secundaria del infarto de miocardio (IAM)

A pesar de las claras evidencias del beneficio de la aspirina en la prevención secundaria de los accidentes cardiovasculares trombóticos¹⁵, su uso permanece aún muy por debajo de los niveles óptimos. En un reciente y amplio análisis¹⁶ sobre 287 estudios publicados hasta 1997, que comprendieron 135.000 pacientes, se compararon terapéuticas con diversos antiplaquetarios frente a controles. En conjunto, los antiplaquetarios disminuyeron en un 25% el infarto de miocardio no fatal, los accidentes cerebrovasculares no fatales y mortalidad vascular. La aspirina fue la más estudiada. El registro GRACE¹⁷ también muestra el beneficio de la aspirina.

El mecanismo por el cual la aspirina previene los eventos isquémicos arteriales, esta centrada en la inhibición en la formación del tromboxano A₂, pero como es un antiagregante, relativamente débil¹⁸, es probable que sus otras múltiples actividades (efecto pleiotrópico)¹⁹ pudieran ser tan o más importante que su acción sobre las plaquetas.

Las investigaciones en la prevención de los accidentes vasculares arteriales oclusivos se centralizan

Figura 1. Los inhibidores COX-2 específicos inhiben la formación de prostaciclina del endotelio vascular sin modificar la concentración del tromboxano plaquetario.



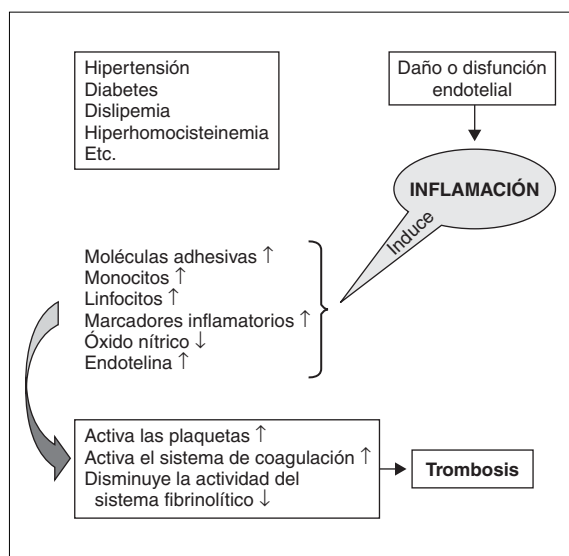


Figura 2. Los factores de riesgo lesionan el endotelio vascular determinando un proceso inflamatorio local. La inflamación participa en las alteraciones del endotelio arterial produciendo aumento de las citoquinas y marcadores inflamatorios. Se produce entonces, la activación de las plaquetas y del sistema de coagulación los cuales, junto a la disminución de la actividad fibrinolítica determina, localmente, el proceso trombótico.

en la búsqueda de nuevos y más potentes inhibidores de la función plaquetaria.

Tienopiridinas

La ticlopidina y el clopidogrel son los dos compuestos tienopirimídicos disponibles en el mercado farmacéutico. Ambos son, principalmente, inhibidores de la agregación plaquetaria inducida por el ADP. Los dos receptores para el ADP, P2Y₁ y P2Y₁₂ actúan a través de una vía común para inducir la agregación plaquetaria a través de los receptores plaquetarios las glucoproteínas IIb-IIIa (integrina αIIbβ3). Tanto la ticlopidina como el clopidogrel

Tabla 1. Puntos finales (%) a los 9 meses promedio en pacientes con síndromes coronarios agudos tratados con aspirina frente a clopidogrel + aspirina

Puntos finales	Aspirina +		RAR	NNT
	Aspirina	clopidogrel		
Muerte cardiovascular	5,4%	5,06%	0,34	294
Infarto de miocardio	6,68%	5,19%	1,49	67,1
Accidente cerebrovascular isquémico	1,4%	1,2%	0,2	500
Todos en conjunto	11,4%	9,3%	2,1	47,6
Muerte CV + IM + revascularización	19,0%	16,7%	2,3	42,5

RAR: reducción absoluta del riesgo; NNT: número de pacientes necesarios tratar para obtener un beneficio.

son inactivos *in vitro* y requieren la acción hepática para que se transformen en un metabolito activo. Con repetidas dosis recomendadas de 75 mg la máxima inhibición de la agregación plaquetaria inducida por el ADP se obtiene entre 3-5 días. Puede lograrse un efecto más temprano, entre 4 y 6 h, cuando se administra una mayor dosis, 300 a 600 mg²⁰.

Estudios con las tienopiridinas

En el estudio TASS²¹ se utilizó la ticlopidina en la prevención del accidente cerebrovascular isquémico comparándola con la aspirina. Se observó una reducción del *stroke* y mortalidad estadísticamente significativa ($p = 0,024$) del 21% a favor de la ticlopidina con un reducción absoluta del riesgo de 3 pacientes cada 100 tratados (NNT 33). Los estudios CAPRIE²² y CURE²³ valoraron el efecto del clopidogrel en la prevención de los síndromes coronarios agudos. En el estudio CAPRIE, los puntos finales fueron el accidente isquémico cerebral, infarto de miocardio o muerte vascular. Con un seguimiento promedio de 1,91 años el grupo de pacientes tratados con clopidogrel tuvieron un 5,32% de accidentes cerebrovasculares isquémicos, infarto de miocardio y muerte vascular comparados con 5,83% en el grupo con aspirina, lo que constituye una reducción muy pobre del riesgo (8,7%) y una significación estadística límite ($p = 0,043$). El NNT es de 196 (prevención de un evento cada 196 pacientes) y un gasto adicional elevado.

De los 3 subgrupos de ingreso, los pacientes con historia de enfermedad vascular periférica respondieron mejor que los otros grupos al clopidogrel. Contrariamente a lo esperado, el grupo ingresado con historia de infarto de miocardio reciente respondieron ligeramente mejor a la aspirina (5,03% para los pacientes con clopidogrel y 4,84% para los pacientes con aspirina). En los pacientes con antecedentes de accidentes vasculocerebrales isquémicos se obtuvo una reducción no significativa del riesgo de 7,3% a favor del clopidogrel (NNT 178 pacientes), resultado que difiere a lo obtenido con la ticlopidina en el estudio TASS²¹. Ringleb et al²⁴ realizaron un análisis multivariado de los pacientes de alto riesgo incluidos en el CAPRIE. Este subestudio del CAPRIE muestra que el beneficio del clopidogrel en relación con la aspirina es mayor en los pacientes con alto riesgo por lo que su administración debería realizarse selectivamente.

El estudio CURE²³ evaluó muerte vascular, IAM no fatal y accidente cerebrovasculares en pacientes con angina inestable o infarto no Q, que fueron medicados con clopidogrel (300 primer día seguidos de 75 mg/día) + aspirina y comparado con aspirina sola (75 a 325 mg/día) administrados durante un promedio de 9 meses. La reducción absoluta del riesgo fue de 2,1 eventos/año por cada 100 pacientes tratados (NNT 47,6) (tabla 1) pero con un aumento en los accidentes hemorrágicos mayores y

menores (tabla 2) lo que, en conjunto con su coste, pone en duda el beneficio de clopidogrel en esta patología. Un subestudio del CURE indica que dosis mayores de aspirina de 100 mg/día, aumenta el riesgo hemorrágico.

Recientemente, el estudio MATCH²⁵, en una población de pacientes que sufrieron un TIA o accidente cerebrovascular isquémico en los últimos 3 meses más el antecedente dentro de los tres últimos años de accidente cerebrovascular isquémico o infarto de miocardio estable o inestable o angina de pecho, diabetes o enfermedad arterial periférica sintomática, fueron aleatorizados para recibir aspirina + clopidogrel 75 mg/día o placebo más clopidogrel 75 mg/día, durante 18 meses. Los puntos finales primarios eran el conjunto de infarto de miocardio, accidente cerebrovascular isquémico, muerte vascular o rehospitalización por un accidente isquémico agudo, durante el período de 18 meses. Los resultados muestran que el agregado de aspirina al clopidogrel no le adiciona ningún beneficio al uso de clopidogrel solo pero compromete la evolución por hemorragias con riesgo de vida, especialmente hemorragias intracraneales y gastrointestinales²⁶ (tabla 3).

Antagonistas de las glucoproteínas IIb/IIIa (integrina α IIb β 3)

Las glucoproteínas de la membrana plaquetaria o integrinas, (α 2 β 1, α 5 β 1, α 6 β 1, α IIb β 3, α v β 3) constituyen los sitios de unión de las proteínas adhesivas y es la etapa final de la agregación plaquetaria. Estímulos (agonistas) como la trombina, el ADP, el ácido araquidónico, la adrenalina, el factor activante de las plaquetas, etc., activan las integrinas y luego el fibrinógeno se acopla a las mismas constituyendo el puente de unión entre las plaquetas iniciando la agregación plaquetaria.

Las glucoproteínas IIb-IIIa (integrina α IIb β 3) están entre las primeras integrinas identificadas y purificadas. El 80% de las GP IIb/IIIa están expuestas en la superficie de la plaqueta y el restante 20% está en el sistema canalicular abierto y en los gránulos α de la plaqueta y se expondrán en el momento de la activación plaquetaria.

Estudios con los antagonistas de las glucoproteínas IIb/IIIa

Los antagonistas de las glucoproteínas IIb/IIIa en pacientes con diagnóstico de síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST²⁷⁻³¹ mostraron que los puntos finales tendieron a ser reducidos por el tratamiento a corto plazo, beneficio que no se mantuvo en el tiempo aunque con diferencias entre los distintos fármacos o un discutible beneficio regional que tomado en conjunto fue marginal²⁹ o como en el estudio GUSTO IV³¹ donde se utilizó el abciximab no hubieron diferencias entre el grupo tratado y el placebo tanto a corto como después de

Tabla 2. Complicaciones hemorrágicas (%) a los 9 meses promedio en pacientes tratados con aspirina comparado con el grupo de clopidogrel + aspirina

Puntos finales	Aspirina + clopidogrel		RAR	NND
	Aspirina	clopidogrel		
Hemorragias mayores	2,7%	3,7%	1,0	100
Hemorragias con compromiso de vida	1,8%	2,2%	0,4	250
Hemorragias menores	2,4%	5,1%	2,7	37
Transfusiones	2,2%	2,8%	0,6	167
Hemorragias totales	5,1%	8,8%	3,7	27

RAR: reducción absoluta del riesgo; NND: número de pacientes necesarios para dañar.

Tabla 3. Estudio MATCH. Comparación entre clopidogrel frente a clopidogrel + aspirina. El agregado de aspirina al clopidogrel no aumenta su eficacia

Eventos	Clopidogrel 3802	Clopidogrel + aspirina 3797
Puntos finales primarios	636 (16,7%)	596 (15,7%)
ACV totales	347 (9,1%)	339 (8,9%)
Muerte	201 (5,3%)	201 (5,3%)
Hemorragias con compromiso de vida	49 (1,3%)	96 (2,9%)

ACV: accidente cerebrovascular.

un año de seguimiento³², independiente del nivel de gravedad indicado por los niveles de troponina. Adicionalmente en subgrupos de pacientes con troponina baja o proteína C reactiva elevada, el uso de abciximab estuvo asociada con un exceso de mortalidad³².

En un registro realizado con hospitales de Nueva York³³ se encontró que el tratamiento con inhibidores de las GP IIb/IIIa estuvo asociado con un incremento del 57% en el riesgo de eventos coronarios adversos (MACE, Mayor Adverse Coronary Events) en 10.847 pacientes sometidos a angioplastia coronaria.

En resumen los estudios, PRISM PLUS, y PURSUIT mostraron una reducción significativa de los puntos finales primarios a los 30 días y que en los otros estudios; PRISM, PARAGON A, PARAGON B, y en el GUSTO IV no hubo diferencia significativa.

Con un total de 31.402 pacientes en conjunto en todos los estudios, a los 30 días hubieron 10,8% de muertes o infarto de miocardio en el grupo tratado con aspirina + inhibidor IIb/IIIa y 11,8% de eventos en el grupo con aspirina lo que significa una reducción absoluta del riesgo de 1% y el NNT muestra un beneficio muy marginal: 1 prevención cada 100 pacientes (tabla 4).

Tabla 4. Mortalidad + infarto de miocardio (%) a los 30 días en pacientes con síndromes coronarios agudos tratados con inhibidores de las GP IIb/IIIa

Estudio	Fármaco	N =	Placebo	Fármaco	RAR	p =	NNT
PRISM	Tirofiban	3.232	7,1	5,8	1,3	0,11	77
PRISM PLUS	Tirofiban	1.915	11,9	8,7	3,2	0,03	31
PARAGON A	Lamifiban	2.282	11,7	10,6 ^a 12,0 ^b	1,1	0,66	91 -
PARAGON B	Lamifiban	5.225	11,5	10,6	0,9	0,5	111
PURSUIT	Eptifibatide	10.948	15,7	14,2	1,5	0,04	67
GUSTO IV (ACS)	Reopro	7.800	8,0	8,2 ^c	-0,2 9,1 ^d	NS -1,1	-
Todos en conjunto		31.402	11,8	10,8	1,0	< 0,001	100

^a Dosis bajas; ^b dosis altas; ^c infusión durante 24 h; ^d infusión durante 48 hs.

RAR: reducción absoluta del riesgo; NNT: número de pacientes necesarios tratar para obtener un beneficio.

Cuando se toman en cuenta los modestos resultados que se obtienen en el tratamiento de los síndromes coronarios agudos y la relación coste/beneficio comparados con la aspirina, no se justifican el entusiasmo despertado por estos nuevos compuestos antiplaquetarios.

Inhibidores orales de las GP IIb/IIIa

Las esperanzas de obtener un potente antiagregante plaquetario a través de los compuestos inhibidores de las GP IIb/IIIa administrados por vía oral para tratamientos crónicos no han sido diferentes de aquellos donde sólo se utilizó la aspirina. Por el contrario, hubo un aumento significativo de la mortalidad comparado con el grupo de placebo + aspirina³⁴ (tabla 5). En un estudio más reciente con un nuevo compuesto, el lotrafiban, también hubieron más muertes en el grupo con fármacos (3,0%) que en el grupo placebo (2,3%)³⁵ con mayor nivel de hemorragias.

La inflamación y los síndromes coronarios

Finalmente quisiéramos discutir el papel de la inflamación en los síndromes coronarios agudos.

Estudios experimentales y clínicos de los últimos años indican la importancia de la inflamación en la génesis del ateroma y dan soporte para la utilización

de fármacos que tiendan a suprimir la inflamación en la terapéutica de las complicaciones de la aterosclerosis^{1,36} en especial, de los diversos antiinflamatorios no esteroideos con inhibición preferencial de la COX-2. La expresión de la COX-2 está aumentada en el ateroma pero no en las arterias y los inhibidores específicos de la COX-2 podrían ser terapéuticamente útiles.

La inflamación produce localmente, el aumento de la expresión del factor tisular activando el mecanismo extrínseco de la coagulación, la reactividad plaquetaria, la disminución fibrinolítica local y, consecuentemente, una actividad protrombótica *in situ*. La propia trombina formada localmente durante el proceso trombótico, además de su actividad específica sobre el fibrinógeno, tiene una acción proinflamatoria.

Planteamos, entonces, si controlando la inflamación podríamos disminuir adicionalmente las complicaciones trombóticas arteriales en pacientes tratados con medicación antitrombótica. Existen bases fisiopatológicas que sugieren que la inclusión de los antiinflamatorios dentro de la terapéutica antitrombótica podría ser beneficiosa en las arteriopatías trombóticas.

No obstante también existe la posibilidad de efectos negativos de los inhibidores selectivos de la COX-2 que, aunque no demostrada podrían favorecer los procesos trombóticos. Estudios comparativos más recientes no han permitido determinar un aumento de las complicaciones cardiovasculares trombóticas por efecto de los inhibidores específicos de la COX-2^{37,38}.

Es interesante mencionar el trabajo publicado muy recientemente por Cipollone et al³⁹ quienes encuentran que en pacientes con antecedentes de infarto de miocardio o *stroke*, el polimorfismo para la COX-2 (sustitución de la guanina en posición 765 por una citosina) es menor que en los individuos normales. El polimorfismo determina una actividad disminuida de la COX-2 y de las metaloproteinasas, disminución

Tabla 5. Mortalidad (%) en pacientes tratados con inhibidores orales de las GP IIb/IIIa

Estudio	n =	Placebo	Fármaco	RAR	p =
EXCITE	7.232	1	1,5	-0,5	0,08
OPUS	10.288	3,7	4,8	-1,1	0,011
SYMPHONY	9.169	1,8	2,0	-0,2	0,42
SYMPHONY II	6.637	1,3	2,1	-0,8	0,036
BRAVO	9.190	2,0	2,7	-0,7	0,038
En conjunto	45.518	2,1	2,8	-0,7	< 0,001

RAR: reducción absoluta del riesgo.

Modificada de Chew³⁴.

Tabla 6. Estudio NUT-2. Resultados en la Unidad Coronaria⁴⁰

	RRR (n = 60) (%)	RAR (n = 60) (%)	NNT
Angina recurrente + IAM	60,9	23,3	4,3
Revascularización (ATC y CRVM)	60	15	6,7
Ang. rec. + IAM + Mort.	60,9	23,3	4,3
IAM + Mortal. + Revasc.	62,5	16,7	6,0

RRR: reducción relativa del riesgo; RAR: reducción absoluta del riesgo; NNT: número de pacientes necesarios tratar para obtener un beneficio.

de la concentración plasmática de la proteína C reactiva sin afectar la concentración de la prostaciclina endotelial, todo lo cual determinaría una inhibición de la inflamación sin modificaciones en el balance tromboxano plaquetario/ prostaciclina endotelial y, por tanto un potencial beneficio antitrombótico. En resumen, no hay evidencia definitiva que los inhibidores de la COX-2 constituyan un factor de riesgo independiente para el infarto de miocardio, al menos en pacientes con bajas posibilidades de presentar complicaciones cardiovasculares.

El meloxicam es un inhibidor preferencial de la COX-2 que posee una potente actividad antiinflamatoria y baja toxicidad gástrica con efectos digestivos menos frecuentes.

En un estudio con pacientes con síndrome coronario agudo sin desnivel del segmento ST⁴⁰, donde se incluyeron 120 enfermos tratados con heparina y aspirina, a 60 pacientes se les administró inmediatamente a su internación, 15 mg de meloxicam intravenoso seguido por 15 mg diarios por vía oral que se mantuvo por 30 días. En la comparación con el grupo sin meloxicam, se observó que durante la media de 4,4 días de internación en la unidad coronaria los eventos conjuntos de angina recurrente, infarto de miocardio y muerte fue significativamente menor (15 % frente a 38,3 %, RAR 23,3, NNT 4,3; p = 0,007) en el grupo tratado con meloxicam (tabla 6). Resultados también significativos se obtuvieron cuando se tomaron como puntos finales infarto de miocardio + maniobras de revascularización miocárdicas + muerte (10 % frente a 26,7 %; RAR 16,7 %; NNT 6; p = 0,034) (tabla 6). Estas variables se mantuvieron diferentes en valores estadísticamente significativos tanto a los 30 como a los 90 días de seguimiento (tabla 7).

Por lo tanto sostenemos que la atero-inflamación se ubica en una etapa más temprana que la atero-trombosis cuando aún el daño isquémico miocárdico no se ha producido. Creemos que hay suficientes fundamentos fisiopatológicos y bases clínicas para seguir investigando, en los síndromes coronarios agudos, las posibilidades terapéuticas de los diversos antiinflamatorios no esteroideos con inhibición preferencial de la COX-2.

Tabla 7. Estudio NUT-2. Resultados en los 3 meses de seguimiento⁴⁰

	RRR (n = 60) (%)	RAR (n = 60) (%)	NNT
Angina recurrente + IAM	58,6	28,3	3,5
Revascularización (ATC y CRVM)	61	18,3	5,5
Ang. rec. + IM + Mort.	55,2	26,3	3,8
IM + Mortal. + Revasc.	60,1	20	5,0

RRR: reducción relativa del riesgo; RAR: reducción absoluta del riesgo; NNT: número de pacientes necesarios tratar para obtener un beneficio.

Bibliografía

- Altman R. Risk factors in coronary atherosclerosis athero-inflammation: the meeting point. *Thromb J* 2003;1:4.
- Altman R, Rouvier J, Scazzotta A. Secondary prevention of myocardial infarction: Beneficial effect of combining oral anticoagulant plus aspirin. Therapy based on evidence. *Clin Appl Trombosis/Hemostasis* 2000;6:126-34.
- Spanbroek R, Grabner R, Lotzer K, et al. Expanding expression of the 5-lipoxygenase pathway within the arterial wall during human atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:1238-43.
- de Gaetano G, Donati MB, Cerletti Ch. Prevention of thrombosis and vascular inflammation: benefits and limitations of selective or combined COX-1, COX-2 and 5-LOX inhibitors. *TRENDS in Pharmacological Sciences* 2003;24:245-52.
- Baker CS, Hall RJ, Evans TJ, et al. Cyclooxygenase-2 is widely expressed in atherosclerotic lesions affecting native and transplanted human coronary arteries and colocalizes with inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine particularly in macrophages. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol* 1999;19, 646-55.
- Schonbeck U, Sukhova GK, Graber P, Coulter S, Libby P. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1999;155:1281-91.
- Awtry EH, MD, Loscalzo J. Aspirin. *Circulation* 2000;101:1206-18.
- Boltri JM, Akerson MR, Vogel RL. Aspirin prophylaxis in patients at low risk for cardiovascular disease: a systematic review of all-cause mortality. *J Fam Pract* 2002;51:700-5.
- Williams A, Hennekens CH. The role of aspirin in cardiovascular diseases—forgotten benefits? *Expert Opin Pharmacother* 2004;5:109-15.
- Hebert PR, Hennekens CH. An overview of the 4 randomized trials of aspirin therapy in the primary prevention of vascular disease. *Arch Intern Med* 2000;160:3123-7.
- Steering Committee of the Physicians' Health Study Research Group. Final report on the aspirin component of the ongoing Physicians' Health Study. *N Engl J Med* 1989;321:129-35.
- Peto R, Gray R, Collins R, Wheatley K, et al. Randomized trial of prophylactic daily aspirin in British male doctors. *Br Med J* 1988;296:313-6.
- Collaborative group of the primary prevention project (PPP). Low-dose aspirin and vitamin E in people at cardiovascular risk: a randomized trial in general practice. *Lancet* 2001;357:89-95.
- The Medical Research Council's General Research Framework. Thrombosis prevention trial: randomized trial of low-intensity oral anticoagulation with warfarin and low-dose aspirin in the primary prevention of ischaemic heart disease in men at increased risk. *Lancet* 1998;351:233-41.
- Spencer FA, Santopinto JJ, Gore JM, et al. Impact of aspirin on presentation and hospital outcomes in patients with acute coronary syndromes (The Global Registry of Acute Coronary Events [GRACE]). *Am J Cardiol* 2002;90:1056-61.
- Anti-platelet Trialists' Collaboration. Collaborative overview of randomized trials of antiplatelet therapy. Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *BMJ* 1994;308:81-106.
- Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* 2002;324:71-86.
- Lange RA, David Hillis D. Antiplatelet Therapy for Ischemic Heart Disease. *N Engl J Med* 2004;350:277-80.
- Altman R, Lucardi HL, Muntaner J, Herrera RN. The Antithrombotic Profile of aspirin. Aspirin resistance, or simply failure? *Thromb J* 2004; 2:1.
- Helft G, Osende JJ, Worthley SG, et al. Acute antithrombotic effect of a front-loaded regimen of clopidogrel in patients with atherosclerosis on aspirin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2316-21.
- Hass WK, Easton JD, Adams HP, et al. A randomized trial comparing ticlopidine hydrochloride with aspirin for the prevention of stroke in high risk patients. *N Engl J Med* 1989;321:501-7.
- CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded, trial of Clopidogrel Versus Aspirin in Patients at Risk of Ischaemic Events (CAPRIE). *Lancet* 1996;348:1329-39.
- The clopidogrel in unstable angina to prevent recurrent events trial investigators. Effects of clopidogrel in addition to aspirin patients with

- acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med* 2001;345:494-502.
24. Ringleb PA, Bhatt DL, Hirsch AT, Topol EJ, Hacke W, and for the CAPRIE Investigators. Benefit of Clopidogrel Over Aspirin Is Amplified in Patients With a History of Ischemic Events. *Stroke* 2004;35:528-32.
 25. Diener HC, Bogousslavsky J, Brass LM, et al. Management of atherothrombosis with clopidogrel in high-risk patients with recent transient ischaemic attack or ischaemic stroke (MATCH): study design and baseline data. *Cerebrovasc Dis* 2004;17:253-61.
 26. Diener HC. 13th European Stroke Conference; May 12-15, 2004; Mannheim-Heidelberg, Germany.
 27. The PRISM Investigators. A comparison of aspirin plus tirofiban with aspirin plus heparin for unstable angina. Platelet receptor inhibition in ischemic syndrome management (PRISM) study investigators. *N Engl J Med* 1998;338:1498-505.
 28. The PRISM-PLUS Investigators. Inhibition of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor with tirofiban in unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction. Platelet receptor inhibition in ischemic syndrome management in patients limited by unstable signs and symptoms (PRISM-PLUS) study investigators. *N Engl J Med* 1998;338:1488-97.
 29. The PURSUIT Trial Investigators. Inhibition of platelet glycoprotein IIb/IIIa with eptifibatid in patients with acute coronary syndromes. The PURSUIT trial investigators. Platelet glycoprotein IIb/IIIa in unstable angina: receptor suppression using Integrilin therapy. *N Engl J Med* 1998;339:436-43.
 30. The PARAGON Investigators. International, randomized, controlled trial of lamifiban (a platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitor), heparin, or both in unstable angina. The PARAGON investigators. Platelet IIb/IIIa antagonism for the reduction of acute coronary syndrome events in a global organization network. *Circulation* 1998;97:2386-95.
 31. The GUSTO IV-ACS Investigators. Effect of glycoprotein IIb/IIIa receptor blocker abciximab on outcome in patients with acute coronary syndromes without early coronary revascularisation: the GUSTO IV-ACS randomized trial. *Lancet* 2001;357:1915-24.
 32. Ottervanger JP, Armstrong P, Barnathan ES, et al. GUSTO IV-ACS Investigators. Long-term results after the glycoprotein IIb/IIIa inhibitor abciximab in unstable angina: one-year survival in the GUSTO IV-ACS (Global Use of Strategies To Open Occluded Coronary Arteries IV-Acute Coronary Syndrome) Trial. *Circulation* 2003;107:437-42.
 33. Vakili BA, Kaplan RC, Slater JN, et al. A propensity analysis of the impact of platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitor therapy on in-hospital outcomes after percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol* 2003;91:946-50.
 34. Chew DP, Bhatt DL, Sapp S, Topol EJ. Increased mortality with oral platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists. A meta-analysis of phase III multicenter randomized trials. *Circulation* 2001;103:201-6.
 35. Topol EJ, Easton D, Harrington RA, and the Blockade of the Glycoprotein IIb/IIIa Receptor to Avoid Vascular Occlusion Trial Investigators. Randomized, double-blind, placebo-controlled, international trial of the oral IIb/IIIa antagonist lotrafiban in coronary and cerebrovascular disease. *Circulation* 2003;108:399-406.
 36. Kereiakes DJ. The fire that burns within. C-reactive protein. *Circulation* 2003;107:373-374.
 37. White WB, Faich G, Borer JS, Makuch RW. Cardiovascular thrombotic events in arthritis trials of the cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib. *Am J Cardiol* 2003;92:411-8.
 38. Mamdani M, Rochon P, Juurlink D, et al. Effect of selective cyclooxygenase 2 inhibitors and naproxen on short-term risk of acute myocardial infarction in the elderly. *Arch Intern Med* 2003;163:481-6.
 39. Cipollone F, Toniato E, Martinotti S, et al. Identification of New Elements of Plaque Stability (INES) Study Group. A polymorphism in the cyclooxygenase 2 gene as an inherited protective factor against myocardial infarction and stroke. *JAMA* 2004;291:2221-8.
 40. Altman R, Lucardi HL, Muntaner J, et al. Efficacy assessment of meloxicam, a preferential cyclooxygenase-2 inhibitor, in acute coronary syndromes without ST-segment elevation: the Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs in Unstable Angina Treatment-2 (NUT-2) pilot study. *Circulation* 2002;106:191-5.

MONITORIZACIÓN DEL EFECTO ANTITROMBÓTICO DE LA ASPIRINA ¿PUEDE SER ÚTIL?

M.T. SANTOS, J. VALLÉS Y J. AZNAR.

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

Introducción

La terapéutica antiplaquetaria se ha demostrado eficaz en la prevención secundaria de eventos en pa-

cientes con patología vascular cerebral o coronaria donde la aparición de episodios clínicos se asocia con frecuencia a la trombosis^{1,2}. Además de la aspirina, el fármaco más utilizado, las tienopiridinas (ticlopidina y clopidogrel), el dipiridamol, los bloqueantes del receptor GP IIb/IIIa y otros, se han estudiado en distintos ensayos clínicos de tratamiento antiplaquetario².

La combinación de resultados de distintos estudios clínicos mediante metaanálisis, indica que el tratamiento antiplaquetario con aspirina previene aproximadamente en un 25% la aparición de nuevos eventos en distintos tipos de pacientes con riesgo. La prevención del infarto de miocardio es más elevada (1/3), mientras que la de los accidentes cerebrovasculares es más reducida (1/4)². Las tienopiridinas, inhibiendo un mecanismo de activación plaquetaria distinto del de la aspirina, muestra un beneficio ligeramente superior al de ésta³. Estos datos demuestran el beneficio clínico de la inhibición de la función plaquetaria y el papel esencial de las plaquetas en la patología vascular. No obstante, también evidencian que no existe una efectividad clínica uniforme. No es infrecuente la recurrencia de eventos a pesar del tratamiento con aspirina. Las razones de este fracaso clínico de la aspirina, no están claramente esclarecidas.

La "resistencia a la aspirina" es un concepto todavía no bien caracterizado. El término se aplica tanto al fracaso clínico "resistencia clínica", como a la existencia, de un efecto inhibitor menor que el esperado en distintas pruebas de función plaquetaria en algunos pacientes, es decir, una "resistencia biológica". Entre los tests utilizados para determinar la variabilidad del efecto antiplaquetario de aspirina se incluyen el tiempo de sangría⁴, la agregabilidad plaquetaria a distintos inductores⁵⁻⁷, el reclutamiento plaquetario⁸, y el sistema de flujo automatizado PFA-100^{9,10}. La mayor facilidad técnica del PFA-100 ha hecho posible que en los últimos tres años se publiquen numerosos artículos en pacientes con características diversas tratados con aspirina con este sistema. Recientemente, se ha empezado a utilizar otro nuevo sistema automatizado, el Ultegra Rapid Platelet Function Assay-ASA^{11,12}.

El punto esencial a destacar, es que en todos los estudios mencionados se detecta una variabilidad individual en el efecto de la aspirina o expresado de otro modo, que existen pacientes en los que la aspirina es menos efectiva por la valoración analítica (resistencia biológica). La proporción de estos pacientes con inhibición insuficiente por aspirina es distinta según el test analítico empleado, las dosis de aspirina administradas y los límites de hipofunción plaquetaria adecuados establecidos por los distintos autores (10-60%). Esta respuesta variable se ha encontrado no sólo en pacientes, sino también en sujetos normales^{13,14}, y no sólo con aspirina, sino también en pacientes tratados con clopidogrel^{15,16}. La posible significación clínica de estos hallazgos es actualmente un tema de vivo debate y reflexión¹⁷⁻²⁰.

Por otro lado, existen actualmente datos en la literatura médica que asocian una mayor incidencia de eventos clínicos con el efecto subóptimo de la aspirina sobre la función plaquetaria^{5,7,11,21} o la síntesis de tromboxano A₂ (TXA₂) monitorizada en la orina de los pacientes²². Estos estudios clinicobiológicos son todavía insuficientes para llegar a conclusiones definitivas, pero apoyan la necesidad de seguir explorando la posible asociación de la función plaquetaria con los eventos clínicos. Esto parece relevante si tenemos en cuenta la alta incidencia de patología vascular en la actualidad y que un incremento en el beneficio de la terapéutica antiplaquetaria tendría una gran repercusión sociosanitaria.

Papel de las plaquetas en la formación del trombo

En relación a los mecanismos fisiopatológicos que regulan la mayor o menor efectividad de la aspirina hay que considerar, en primer lugar, que la participación de las plaquetas en la trombogénesis es compleja. Se inicia por procesos adhesivos entre las plaquetas y componentes de la matriz subendotelial (factor von Willebrand, colágeno) y activación de las mismas por el colágeno. Posteriormente, el daño endotelial inicia la generación de trombina, que contribuye a la etapa de activación, secuencia de transmisión de señales activantes en las plaquetas²³ y consolidación del trombo. Las plaquetas activadas, a su vez, liberan componentes granulares y productos metabólicos. Estos liberados celulares son un agonista fisiológico complejo, que activa a otras plaquetas del entorno iniciando el reclutamiento plaquetario^{24,25}. Los estímulos fisiológicos primarios y los liberados celulares²⁶ convergen en la activación del receptor GP IIb/IIIa y en la formación de agregados plaquetarios, mediados por unión entre plaquetas próximas por puentes de fibrinógeno. A esta unión pueden contribuir otras proteínas como la P-selectina que influye en el tamaño y estabilidad de las uniones plaqueta-plaqueta²⁷ y a la multicelularidad del trombo (uniones plaqueta-leucitos)²⁸. Las propias plaquetas también contribuyen a la generación de trombina²⁹ y a la retracción del coágulo³⁰.

Todos estos aspectos de la función plaquetaria pueden contribuir a la formación del trombo *in vivo*, y es conocido que la adhesión, la agregación y la secreción plaquetaria, son procesos regulados por mecanismos bioquímicos específicos, que pueden ser inhibidos de modo diferencial por los fármacos antiplaquetarios. Por tanto, habría que establecer que test de función plaquetaria o panel de ellos, estaría más asociado a la posterior aparición de eventos clínicos.

Efectos antitrombóticos de la aspirina

El efecto mejor caracterizado de la aspirina es su capacidad para acetilar, una serina en la posición 529 de la PGH₂, produciendo la inhibición irrever-

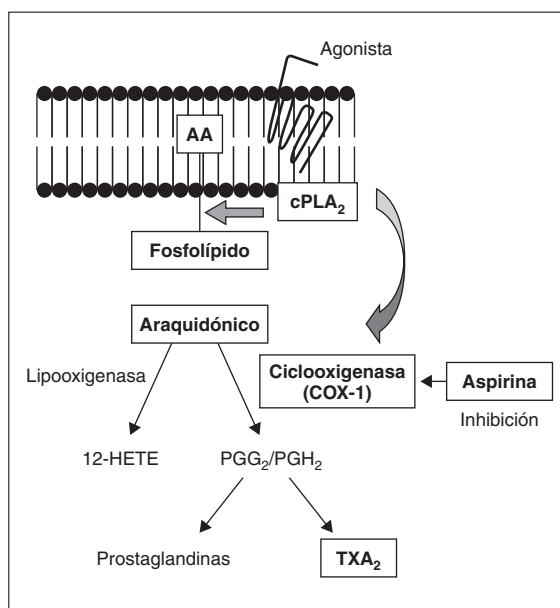


Figura 1. Síntesis de TXA₂ en las plaquetas. El estímulo fisiológico induce un aumento del calcio intracelular en las plaquetas y la activación de la fosfolipasa A₂ citosólica (cPLA₂), que se transloca a la membrana y libera ácido araquidónico (AA) de los fosfolípidos. El AA se metaboliza a 12-HETE por la lipooxigenasa y a endoperóxidos cíclicos PGG₂/PGH₂ por la ciclooxigenasa 1 (COX-1). El subsiguiente metabolismo de PGH₂ por la tromboxano sintetasa da lugar al metabolito fisiológicamente más importante, el TXA₂. También se forman otros derivados del AA (HHT, MDA) y pequeñas cantidades de prostaglandinas estables.

sible de la actividad ciclooxigenasa 1 (COX-1)³¹, lo que resulta en la inhibición de la síntesis de TXA₂, una sustancia que amplifica la función de las plaquetas³² y produce la contracción del vaso³³ (fig. 1).

No obstante, la aspirina también puede contribuir a su efecto clínico beneficioso mediante otros mecanismos³⁴. Estos incluyen la reducción en la progresión de la aterosclerosis (p. ej., reduciendo la oxidación de las LDL³⁵ o la mejora de la disfunción endotelial)³⁶.

Además de las plaquetas y de las células endoteliales, otras células sanguíneas (leucocitos y eritrocitos)²⁵, pueden afectarse por la aspirina en su función y/o en los efectos de su interacción con otras células de la sangre, especialmente con las plaquetas. La interacción eritrocito-plaqueta incrementa^{24,26,37,38}, mientras que la interacción plaqueta-leucocito reduce la reactividad plaquetaria³⁹⁻⁴¹. La aspirina aumenta el efecto inhibitorio de los leucocitos³⁹⁻⁴¹, mientras que los eritrocitos disminuyen el efecto antitrombótico de la aspirina^{24,26,37}. No obstante, la aspirina tiene un efecto directo sobre los eritrocitos que reduce su capacidad protrombótica, lo que representa otro mecanismo antitrombótico de la aspirina⁴². A pesar de ello, en pacientes con patología vascular cerebral o coronaria tratados con 200-300 mg aspirina/día, un 45% de los pacientes

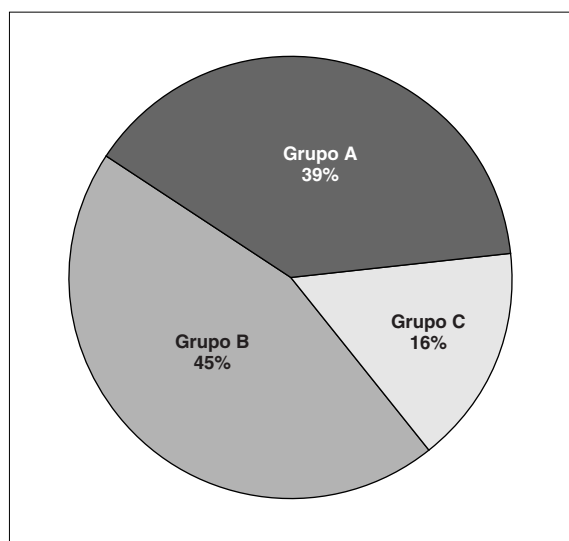


Figura 2. Efecto de la interacción eritrocito-plaqueta en pacientes con enfermedad vascular tratados con 200-300 mg de aspirina/día sobre el reclutamiento. Se detectaron tres tipos de respuesta en los pacientes: Grupo A (39%) en los que la aspirina inhibe el reclutamiento, tanto en presencia como en ausencia de RBC; Grupo B, en los que el reclutamiento en las plaquetas solas está inhibido, pero este se reinduce en presencia de RBC (45%). Finalmente, en el Grupo C, el PRP muestra una actividad parcialmente inhibida que los RBC amplifican marcadamente. (Valles J y Cols *Circulation* 1998;97: 350-5).

presenta un efecto insuficiente de la aspirina, atribuible principalmente a la interacción con los eritrocitos⁸ (fig. 2), lo que constituye un mecanismo importante de resistencia biológica a la aspirina. Nuestros resultados más recientes indican que la inhibición simultánea de la reactividad de las plaquetas y del efecto protrombótico de los eritrocitos, con un cambio de régimen de administración de aspirina dentro del rango terapéutico recomendado: 500 mg cada 15 días y 100 mg cada 12 h (221 mg/día en los 14 días del ciclo), reduce a la mitad el número de pacientes con una inhibición insuficiente de la reactividad plaquetaria en presencia de eritrocitos y en sangre total, lo que presumiblemente podría incrementar el beneficio clínico.

El metabolismo transcelular de eicosanoides también puede desempeñar un papel en los efectos anti-trombóticos de la aspirina. Mediante este mecanismo, el ácido araquidónico o metabolitos del mismo generados por una célula, pueden ser transformados por otra a un eicosanoide con efectos biológicos distintos. Esta cooperatividad metabólica puede tener lugar entre distintas células sanguíneas y el endotelio^{25,43}. En este sentido, el descubrimiento de la COX-2 inducible⁴⁴ y su presencia en células relevantes en la trombogénesis (células endoteliales, monocitos, macrófagos o las propias plaquetas) es un aspecto importante. Mediante metabolismo transcelular se puede formar TXA₂ por la interacción de plaquetas tratadas con aspirina y PGH₂ formado

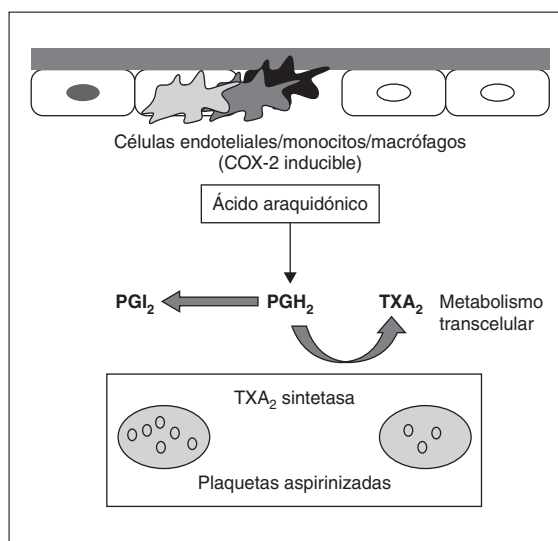


Figura 3. Síntesis de TXA₂ por metabolismo transcelular. La estimulación por citocinas o factores de crecimiento induce la expresión de COX-2 en el endotelio y en las células de la placa y la liberación del ácido araquidónico. Este se transforma en PGH₂ que puede ser metabolizado a prostaciclina (PGI₂), principal metabolito de la arteria, o por la tromboxano sintetasa de plaquetas aspirinizadas a TXA₂. La COX-2 requiere 170 veces más de aspirina para inhibirse que la COX-1 de las células endoteliales. COX-1 también genera PGH₂ en ausencia de aspirina.

por células endoteliales, monocitos/macrófagos de la placa, vía COX-2 y/o COX-1⁴⁵⁻⁴⁷ (fig. 3).

Actualmente se cree que la mayor parte de la prostaciclina (PGI₂) del endotelio (antiagregante y vasodilatadora), se produce vía COX-2, como se ha comprobado en estudios con inhibidores selectivos de COX-2, que inhiben la PGI₂, pero no el TXA₂ en las plaquetas, que se forma preferentemente vía COX-1 y se inhibe por la aspirina⁴⁸. La aspirina también podría inhibir a la COX-2, pero en concentraciones más de 170 veces superiores que las necesarias para inhibir COX-1⁴⁹. Recientemente se ha descrito otra variante de la ciclooxigenasa, la COX-3, que se inhibe con paracetamol y con aspirina, de modo similar a la COX-1⁵⁰, aunque, por el momento, no es conocido si las plaquetas tienen COX-3.

Otro aspecto de interés en la síntesis de eicosanoides relevantes en la patogenia de la trombosis es el hecho, que parece actualmente confirmado, de que las plaquetas nuevas que llegan a la circulación tienen COX-2 de un modo transitorio, lo que podría contribuir a la síntesis de TXA₂ insensible a aspirina a dosis terapéuticas, y por tanto, a la resistencia a la aspirina, particularmente en sujetos con un elevado *turnover* plaquetario, aunque éste es actualmente un tema de controversia⁵¹⁻⁵³.

También de importancia en relación al metabolismo del ácido araquidónico es su oxidación no enzimática para dar lugar a una nueva familia de compuestos, los F2 isoprostanos, insensibles a aspirina,

capaces de producir contracción del vaso y de estimular a las plaquetas a través del receptor del TXA₂, es decir, efectos parecidos a los del TXA₂^{54,55}. Estas sustancias, especialmente el 8-Epi-PGF1 α , se encuentra incrementada en pacientes con angina inestable⁵⁶ o factores de riesgo asociados a incremento de función plaquetaria⁵⁷, y pueden ser otro factor contributorio a la resistencia a la aspirina⁵⁵.

Algunos autores han sugerido que la variabilidad del efecto de la aspirina sobre las plaquetas podría ser debido, en parte, a la existencia de algún polimorfismo de la COX-1. No obstante, el único polimorfismo descrito hasta la fecha aumenta en los sujetos que lo presentan el efecto inhibitorio de la aspirina⁵⁸.

Mecanismos de activación plaquetaria COX-1-independientes

El tratamiento de las plaquetas con aspirina reduce o inhibe los procesos de activación COX-1-dependientes, es decir aquellos que requieren la síntesis de TXA₂ para que se produzcan. Este es el ámbito de protección más importante de la aspirina. No obstante, la estimulación de las plaquetas con dosis altas de agonistas fisiológicos, como colágeno, trombina o ADP, induce la reactividad plaquetaria a pesar del bloqueo del TXA₂, es decir, por mecanismos conocidos globalmente como COX-1 independientes²³. Esta respuesta plaquetaria puede reducirse, pero no bloquearse por el tratamiento con aspirina.

Dado que la trombosis es un fenómeno multifactorial y multicelular, que la fisiología de las plaquetas es muy compleja y que distintos condicionantes clínicos y/o farmacológicos pueden modificar la función de las mismas, es realmente destacable que la aspirina, el estándar de oro de la terapéutica antiplaquetaria, prevenga un 25% de los eventos isquémicos en pacientes con patología vascular, aunque sería muy deseable incrementar esta proporción.

Mecanismos de resistencia a la aspirina

Mecanismos biológicos

Teniendo en cuenta lo anteriormente comentado, la resistencia biológica a la aspirina podría ser debida a mecanismos: *a*) asociados a la síntesis de TXA₂ vía COX-1 o vía COX-2 por metabolismo transcelular; *b*) debidos a transformación no enzimática del ácido araquidónico a F2 isoprostanos, y *c*) mecanismos COX-1-independientes en las plaquetas. Estos últimos podrían, a su vez, ser debidos a alteraciones en las propias plaquetas, genéticas, como en el caso del receptor GP IIb/IIIa⁵⁹, o secundarias a posibles alteraciones bioquímicas que afectaran a los mecanismos de transducción de señales²³. Éstas, a su vez, podrían condicionar una mayor susceptibilidad de respuesta plaquetaria al colágeno¹⁴ o al ADP⁶⁰. Adicionalmente, los mecanismos COX-1 in-

dependientes podrían ser atribuibles a las interacciones celulares, particularmente al efecto protrombótico de los eritrocitos^{8,24,37,42}.

Aspectos clínicos

Desde el punto de vista clínico, parece razonable pensar que el estado basal de activación plaquetaria en los pacientes podría influir en el efecto de los fármacos antitrombóticos. Por ejemplo, en la diabetes se encuentra un aumento de función plaquetaria⁶¹ y un menor efecto antitrombótico de aspirina⁶², en ambos casos asociado al control metabólico. También pacientes en el momento agudo o después de un intervencionismo arterial percutáneo (cerebral o coronario) presentan frecuentemente una alteración, al menos temporal, de la función plaquetaria. El elevado *turnover* de plaquetas en determinadas circunstancias clínicas también puede modificar el efecto antitrombótico de la aspirina⁶³. Adicionalmente, la administración concomitante de antiinflamatorios, como el ibuprofeno⁶⁴, la indometacina⁶⁵ o los salicilatos⁶⁶, disminuye el efecto de la aspirina sobre las plaquetas. La dosis de aspirina administrada⁶⁷⁻⁶⁹ o su biodisponibilidad⁷⁰ también podrían condicionar el efecto del fármaco en pacientes concretos. Todo ello, admitiendo que los pacientes siguen su tratamiento diario con continuidad, porque si tienen "resistencia a tomarse la aspirina" cada día, este sería el más importante mecanismo de fracaso clínico y de resistencia biológica.

Conclusiones y perspectivas futuras

Los datos disponibles actualmente demuestran que existe una variabilidad individual en la respuesta analítica de los pacientes al tratamiento antitrombótico con dosis terapéuticas de aspirina, lo que podría condicionar, en aquellos en los que el efecto es menor, una mayor probabilidad de recurrencia de eventos clínicos. Esto último parece deducirse de los estudios clínico-analíticos actualmente publicados, aunque se necesitan estudios más amplios para confirmar estos hallazgos.

En nuestra opinión, la monitorización del efecto de la aspirina en pacientes individuales sería muy conveniente, aunque todavía es éste un tema debatido, por lo que la investigación clínico-biológica en este ámbito parece prioritaria.

Los retos futuros podrían ser: *a*) establecer en un mayor número de pacientes la relación entre el efecto óptimo/insuficiente de los fármacos sobre la función plaquetaria y los eventos clínicos; *b*) profundizar en el estudio de los mecanismos clínicos y bioquímicos de la respuesta insuficiente a la aspirina, y *c*) poner a punto, y en la medida de lo posible automatizar, tests de función plaquetaria útiles para la monitorización del efecto biológico de los distintos fármacos utilizados en la terapéutica antitrombótica.

Agradecimientos

Estos estudios se han financiado en parte por el Fondo de Investigaciones Sanitarias FIS03/0270 y la Agencia Valenciana de Ciencia y Tecnología AVCIT-G03/005.

Bibliografía

- Bhatt DL, Kapadia SR, Yadav JS, Topol EJ. Update on clinical trials of antiplatelet therapy for cerebrovascular diseases. *Cerebrovasc Dis* 2000;10(Suppl 5):34-40.
- Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* 2002; 324:71-86.
- Gent M, Beaumont D, Blanchard J, Bousser MG, Coffman J, Easton JD, et al. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet* 1996;348: 1329-39.
- Buchanan MR, Brister SJ. Individual variation in the effects of ASA on platelet function: implications for the use of ASA clinically. *Can J Cardiol* 1995;11:221-7.
- Grote Meyer KH, Scharafinski HW, Husstedt IW. 2-Year Follow-Up of Aspirin Responder and Aspirin Non-Responder - A Pilot-Study Including 180 Post-Stroke Patients 1993;71:397-403.
- Helgason CM, Tortorice KL, Winkler SR, Penney DW, Schuler JJ, McClelland TJ, et al. Aspirin response and failure in cerebral infarction. *Stroke* 1993;24:345-50.
- Mueller MR, Salat A, Stangl P, Murabito M, Pulaki S, Boehm D, et al. Variable platelet response to low-dose ASA and the risk of limb deterioration in patients submitted to peripheral arterial angioplasty. *Thromb Haemostas* 1997;78:1003-7.
- Vallés J, Santos MT, Aznar J, Osa A, Lago A, Cosin J, et al. Erythrocyte promotion of platelet reactivity decreases the effectiveness of aspirin as an antithrombotic therapeutic modality: the effect of low-dose aspirin is less than optimal in patients with vascular disease due to prothrombotic effects of erythrocytes on platelet reactivity. *Circulation* 1998;97:350-5.
- Vallés J, Santos MT, Lago A, Cosin J, Moscardó A, Piñón M, et al. Valoración del efecto de la aspirina en pacientes con patología vascular con el analizador de la función plaquetaria PFA-100 [abstract]. *Haematologica* 2000;85(Suppl 3):149.
- Gum PA, Kottke-Marchant K, Poggio ED, Gurm H, Welsh PA, Brooks L, et al. Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2001;88:230-5.
- Wang JC, Aucoin-Barry D, Manuélian D, Monbouquette R, Reisman M, Gray W, et al. Function of aspirin nonresponsiveness using the Ultegra Rapid Platelet Function Assay-ASA. *Am J Cardiol* 2003;92:1492-4.
- Chen W-H, Lee P-Y, Ng W, Tse H-F, Lau C-P. Aspirin resistance is associated with a high incidence of myonecrosis after non-urgent percutaneous coronary intervention despite clopidogrel pretreatment. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:1122-6.
- Pappas JM, Westengard JC, Bull BS. Population variability in the effect of aspirin on platelet function - Implications for clinical trials and therapy. *Arch Pathol Lab Med* 1994;118:801-4.
- Kawasaki T, Ozeki Y, Igawa T, Kambayashi J. Increased platelet sensitivity to collagen in individuals resistant to low-dose aspirin. *Stroke* 2000;31:591-5.
- Gurbel PA, Bliden KP, Hiatt BL, O'Connor CM. Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity. *Circulation* 2003 Jun 17;107:2908-13.
- Muller I, Besta F, Schulz C, Massberg S, Schonig A, Gawaz M. Prevalence of clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement. *Thromb Haemost* 2003;89:783-7.
- Patrono C. Aspirin resistance: definition, mechanisms and clinical read-outs. *J Thromb Haemost* 2003 Aug;1(8):1710-3.
- De Gaetano G, Cerletti C. Aspirin resistance: a revival of platelet aggregation tests? *J Thromb Haemost* 2003;1:2048-50.
- Eikelboom JW, Hankey GJ. Aspirin resistance: a new independent predictor of vascular events? *J Am Coll Cardiol* 2003;41:966-8.
- Altman R. The antithrombotic profile of aspirin. Aspirin resistance, or simply failure? *Thromb J* 2004;2:1.
- Chamorro A, Escolar G, Revilla M, Obach V, Vila N, Reverter JC, et al. Ex vivo response to aspirin differs in stroke patients with single or recurrent events: a pilot study. *J Neurol Sci* 1999;171:110-4.
- Eikelboom JW, Hirsh J, Weitz JI, Johnston M, Yi Q, Yusuf S. Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. *Circulation* 2002;105:1650-5.
- Santos MT, Moscardó A, Vallés J, Martínez M, Piñón M, Aznar J, et al. Participation of tyrosine phosphorylation in cytoskeletal reorganization, α IIb β 3 integrin receptor activation and aspirin-insensitive mechanisms of thrombin-stimulated human platelets. *Circulation* 2000;102:1924-30.
- Santos MT, Vallés J, Marcus AJ, Safier LB, Broekman MJ, Islam N, et al. Enhancement of platelet reactivity and modulation of eicosanoid production by intact erythrocytes. *J Clin Invest* 1991;87:571-80.
- Marcus AJ. Platelets: their role in hemostasis, thrombosis and inflammation. In: Gallin JJ, Snyderman R, editors. *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999; p. 77-95.
- Valles J, Santos MT, Aznar J, Martínez M, Moscardó A, Piñón M, et al. Platelet-erythrocyte interactions enhance α IIb β 3 integrin receptor activation and P-selectin expression during platelet recruitment: down-regulation by aspirin ex vivo. *Blood* 2002;99:3978-84.
- Merten M, Thiagarajan P. P-selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates. *Circulation* 2000;102:1931-6.
- McEver RP, Cummings RD. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest* 1997;100:485-92.
- Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1381-9.
- Carr ME Jr, Martin EJ, Carr SL. Delayed, reduced or inhibited thrombin production reduces platelet contractile force and results in weaker clot formation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002;13:193-7.
- Roth GJ, Majerus PW. The mechanism of the effect of aspirin on human platelets. I. Acetylation of a particulate fraction protein. *J Clin Invest* 1975;56:624-32.
- FitzGerald GA. Mechanisms of platelet activation: thromboxane A2 as an amplifying signal for other agonists. *Am J Cardiol* 1991;68:11B-5B.
- Hamberg M, Svenson J, Samuelsson B. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:2994-8.
- Awtry EH, Loscalzo J. Aspirin. *Circulation* 2000;101:1206-18.
- Steer KA, Wallace TM, Bolton CH, Hartog M. Aspirin protects low density lipoprotein from oxidative modification. *Heart* 1997;77:333-7.
- Husain S, Andrews NP, Mulcahy D, Panza JA, Quyyumi AA. Aspirin improves endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 1998;97: 716-20.
- Valles J, Santos MT, Aznar J, Marcus AJ, Martínez-Sales V, Pórtolos M, et al. Erythrocytes metabolically enhance collagen-induced platelet responsiveness via increased thromboxane production, ADP release, and recruitment. *Blood* 1991;78:154-62.
- Bozzo J, Hernández MR, Galán AM, Heras M, Ordinas A, Escolar G. Impaired antiplatelet effects of aspirin associated with hypoxia and ATP release from erythrocytes. Studies in a system with flowing human blood. *Eur J Clin Invest* 1999;29:438-44.
- Valles J, Santos MT, Marcus AJ, Safier LB, Broekman MJ, Islam N, et al. Down-regulation of human platelet reactivity by neutrophils. Participation of lipoxygenase derivatives and adhesive proteins. *J Clin Invest* 1993;92:1357-65.
- Lopez-Farre A, Caramelo C, Esteban A, Alberola ML, Millas I, Monton M, et al. Effects of aspirin on platelet-neutrophil interactions: Role of nitric oxide and endothelin-1. *Circulation* 1995;91:2080-8.
- De la Cruz JP, Blanco E, De la Cuesta FS. Effect of dipyridamole and aspirin on the platelet-neutrophil interaction via the nitric oxide pathway. *Eur J Pharmacol* 2000;397:35-41.
- Santos MT, Vallés J, Aznar J, Marcus AJ, Broekman MJ, Safier LB. Prothrombotic effects of erythrocytes on platelet reactivity: reduction by aspirin. *Circulation* 1997;95:63-8.
- Maclouf J, Folco G, Patrono C. Eicosanoids and iso-eicosanoids: constitutive, inducible and transcellular biosynthesis in vascular disease. *Thromb Haemost* 1998;79:691-705.
- Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:2692-6.
- Karim S, Habib A, Levytoledano S, Maclouf J. Cyclooxygenases-1 and -2 of endothelial cells utilize exogenous or endogenous arachidonic acid for transcellular production of thromboxane. *J Biol Chem* 1996;271: 12042-8.
- Halushka MK, Halushka P V. Why are some individuals resistant to the cardioprotective effects of aspirin? Could it be thromboxane A2? *Circulation* 2002;105:1620-2.
- Cipollone F, Ciabattone G, Patrignani P, Pasquale M, Digregorio D, Bucciarelli T, et al. Oxidant stress and aspirin-insensitive thromboxane biosynthesis in severe unstable angina. *Circulation* 2000;102:1007-13.
- McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA, FitzGerald GA. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:272-7.
- Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998;38:97-120.
- Chandrasekharan N V, Dai H, Roos KLT, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:13926-31.
- Weber AA, Schror K. The significance of platelet-derived growth factors for proliferation of vascular smooth muscle cells. *Platelets* 1999;10: 77-96.
- Rocca B, Secchiero P, Ciabattone G, Ranelli FO, Catani L, Guidotti L, et al. Cyclooxygenase-2 expression is induced during human megakaryopoiesis and characterizes newly formed platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:7634-9.
- Zimmermann N, Wenk A, Kim U, Kienzle P, Weber A-A, Gams E, et al. Functional and biochemical evaluation of platelet aspirin resistance after coronary artery bypass surgery. *Circulation* 2003;108:542-7.
- Patrono C, FitzGerald GA. Isoprostanes: potential markers of oxidant stress in atherothrombotic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2309-15.
- Patrignani P. Aspirin insensitive eicosanoid biosynthesis in cardiovascular disease. *Thromb Res* 2003;110:281-6.

56. Cipollone F, Ciabattone G, Patrignani P, Pasquale M, Di GD, Bucciarelli T, et al. Oxidant stress and aspirin-insensitive thromboxane biosynthesis in severe unstable angina. *Circulation* 2000;102:1007-13.
57. Cracowski J-L. Isoprostanes: an emerging role in vascular physiology and disease? *Chem Phys Lipids* 2004;128:75-83.
58. Halushka MK, Walker LP, Halushka P V. Genetic variation in cyclooxygenase 1: effects on response to aspirin. *Clin Pharmacol Ther* 2003;73:122-30.
59. Cambria-Kiely JA, Gandhi PJ. Aspirin resistance and genetic polymorphisms. *J Thromb Thrombolysis* 2002;14:51-8.
60. Macchi L, Christiaens L, Brabant S, Sorel N, Allal J, Mauco G, et al. Resistance to aspirin in vitro is associated with increased platelet sensitivity to adenosine diphosphate. *Thromb Res* 2002;107:45-9.
61. Valles J, Santos MT, Aznar J, Velert M, Barberá G, Carmena R. Modulatory effect of erythrocytes on the platelet reactivity to collagen in IDDM patients. *Diabetes* 1997;46:1047-53.
62. Watala C, Golanski J, Pluta J, Boncler M, Rozalski M, Luzak B, et al. Reduced sensitivity of platelets from type 2 diabetic patients to acetylsalicylic acid (aspirin)-its relation to metabolic control. *Thromb Res* 2004; 113:101-13.
63. Zimmermann N, Kienzle P, Weber AA, Winter J, Gams E, Schror K, et al. Aspirin resistance after coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;121:982-4.
64. Catella-Lawson F, Reilly MP, Kapoor SC, Cucchiara AJ, DeMarco S, Tournier B, et al. Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. *N Engl J Med* 2001;345:1809-17.
65. Livio M, Del Maschio A, Cerletti C, de Gaetano G. Indomethacin prevents the long-lasting inhibitory effect of aspirin on human platelet cyclooxygenase activity. *Prostaglandins* 1982;23:787-96.
66. De Gaetano G, Cerletti C, Dejana E, Latini R. Pharmacology of platelet inhibition in humans: implications of the salicylate-aspirin interaction. *Circulation* 1985;72:1185-93.
67. Santos MT, Vallés J, Aznar J, Lago A, Martínez-Sales V, Moscardó A, et al. Aspirin treatment in patients with vascular diseases: a study aimed at a better control of platelet reactivity [abstract]. *Haemostasis* 2000; 30(Suppl 1):86.
68. Gan R, Teleg RA, Florento L, Bitanga ES. Effect of increasing doses of aspirin on platelet aggregation among stroke patients. *Cerebrovasc Dis* 2002;14:252-5.
69. Hart RG, Leonard AD, Talbert RL, Pearce LA, Cornell E, Bovill E, et al. Aspirin dosage and thromboxane synthesis in patients with vascular disease. *Pharmacotherapy* 2003;23:579-84.
70. Cerletti C, Dell'Elba G, Manarini S, Pecce R, Di Castelnuovo A, Scorpiglione N, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic differences between two low dosages of aspirin may affect therapeutic outcomes. *Clin Pharmacokinet* 2003;42:1059-70.