

PROGRAMA CIENTÍFICO

CASOS CLÍNICO-CITOLÓGICOS

COORDINADORAS: S. WOESSNER. *Barcelona*
M.^aA. PIÑÁN. *Baracaldo*

Caso 1

LEUCEMIA CONGÉNITA MEGACARIOBLÁSTICA

E. TUSET¹, T. TOLL¹, S. RIVES¹, I. ALCOTA¹,
M. PÉREZ-IRIBARNE² y J. ESTELLA¹

¹Laboratorio de Diagnóstico de Hemato-Oncología. Servicio de Hematología. ²Laboratorio de Genética. Hospital Pediátrico Universitario de Sant Joan de Déu. Barcelona.

Motivo de consulta: Neonato de 9 días que ingresa en nuestro centro para estudio de hepatoesplenomegalia y petequias.

Historia clínica: Recién nacida de 9 días, sin antecedentes obstétricos ni perinatológicos de interés excepto madre portadora de *Streptococo-B*. A las 24 h de vida se le detectan petequias junto a una hepatoesplenomegalia.

Exploración física: Recién nacido de 2.750 g de peso y 47 cm de longitud. Discreta ictericia de piel y mucosas. Petequias en la zona lumbar, sacra y nalgas. Abdomen blando y distendido con hepatomegalia de 5 cm y esplenomegalia de 3 cm por debajo del reborde costal. Resto de la exploración normal para la edad de la paciente.

Pruebas complementarias: *Hemograma:* hematíes, $3,1 \times 10^{12}/l$; hemoglobina, 120 g/l; hematocrito, 0,31 l/l; VCM, 95 fl; reticulocitos, 2,4%; leucocitos, $12,9 \times 10^9/l$ (28 segmentados, 2 cayados, 2 metamielocitos, 39 linfocitos, 15 monocitos, 2 eosinófilos y 12 células de aspecto inmaduro e indiferenciado), además de 10 eritroblastos por cada 100 leucocitos. *Pruebas de coagulación:* plaquetas, $11 \times 10^9/l$; tiempo de protrombina, 70%; TTPA, 36 s y fibrinógeno 2,6 g/l. *Bioquímica plasmática:* bilirrubina total, 3,7 mg/dl; AST, 65 U/l; ALT, 34 U/l; GGT, 55 U/l; LDH, 2327 U/l (< 500 U/l). *Gasometría arterial:* pH, 7,50; PCO₂, 25 mmHg; PO₂, 140 mmHg; HCO₃⁻, 19 mmol/l. *TC abdominal:* hepatoesplenomegalia homogéneas. *Ecografía/TC cerebral:* sistema ventricular y plexos coroideos engrosados. Sin evidencia de sangrado libre intraventricular ni parenquimatoso. *Mielograma:* extracción dificultosa con escaso grumo medular y celularidad hematopoyética disminuida con práctica ausencia de megacariocitos. Infiltración del

42%, por células inmaduras de aspecto blástico que morfológicamente se caracterizaban por ser de tamaño mediano, relación núcleo/citoplasma aumentada, núcleo redondo con cromatina laxa y nucléolo. Citoplasma basófilo y agranular, en algunas de ellas se observaban protuberancias citoplasmáticas (*blebs*). Estas células se identificaron como megacarioblastos (figs. 1 y 2). *Citoquímica:* los blastos eran negativos para la mieloperoxidasa y la naftol-AS-D-cloroacetato esterasa, mientras que mostraban positividad en mazacotes para la tinción de PAS.

En el estudio del inmunofenotipo por citometría, la población blástica expresaba CD7, CD41, CD61 y CD33, mientras que el resto de marcadores fueron negativos. En el estudio ultraestructural se objetivó que los blastos eran intensamente positivos para la peroxidasa plaquetaria en la cisterna perinuclear y en el retículo endoplasmático rugoso en ausencia de positividad en la zona golgiana y en los gránulos, por lo que se confirmó su naturaleza megacariocítica (fig. 3). *Cariotipo de médula ósea:* mosaico cromosómico 46,XX t(1;22) (p13;q13), t(5;18) (q13;q22) [17]. 46,XX [11]. *Biopsia de médula ósea:* hipocelular con ausencia de serie megacariocítica de aspecto maduro y disminución del resto de series hematopoyéticas con presencia de células blásticas. La inmunohistoquímica realizada (CD20, CD45RO, enolasa y S-100) resultó negativa. *Estudio de líquido cefalorraquídeo:* sin evidencia de blastos.

Diagnóstico: Leucemia aguda congénita megacarioblástica con t(1;22) (p13;q13).

Evolución: Se inició quimioterapia según protocolo SHOP LANL-90, a las 48 h la paciente presentó signos clínicos de hidrocefalia. La resonancia magnética (RM) mostró un aumento de tamaño y captación patológica de los plexos coroideos probablemente por infiltración del proceso leucémico. Ello provocaba una obstrucción del lado derecho del asta temporal y occipital junto a edema transependimario con signos incipientes de herniación subfaucial y del uncus. Ante esta situación se colocó una válvula de derivación.

La paciente continuó el tratamiento y consiguió la remisión citomorfológica y genética al finalizar la fase de inducción. Como complicaciones a los 2 meses del diagnóstico presentó una hemorragia intraventricular masiva con discreta afectación del parén-

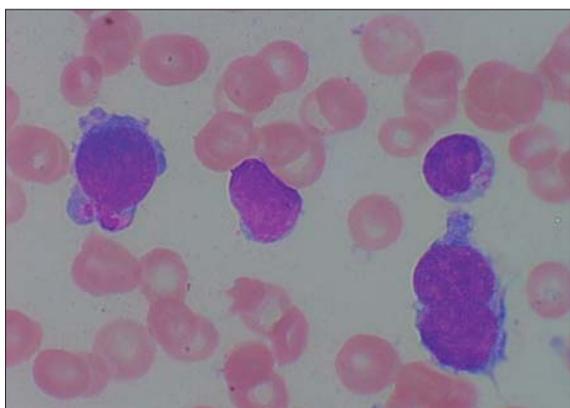


Figura 1. Frotis de médula ósea. Células blásticas en las que destacan prolongaciones citoplasmáticas (*blebs*). Morfología compatible con megacarioblastos. (May-Grünwald-Giemsa, aumento original $\times 600$.)

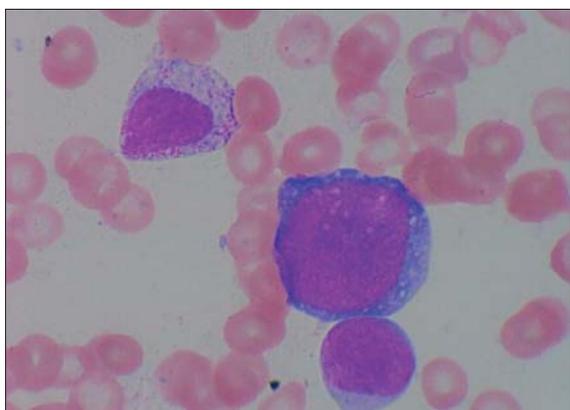


Figura 2. Frotis de médula ósea. Célula blástica de gran tamaño y aspecto más indiferenciado. (May-Grünwald-Giemsa, aumento original $\times 600$.)

quima cerebral que se resolvió satisfactoriamente por lo que continuó tratamiento (fig. 4). Sin embargo no se realizó el trasplante de médula ósea dadas las lesiones neurológicas psicomotoras residuales. Actualmente la paciente se mantiene en remisión a los 5 años del diagnóstico.

Discusión: La leucemia congénita (LC) es una entidad poco frecuente, con una incidencia de un caso/ $20\text{-}25 \times 10^4$ nacidos vivos/año y constituye menos del 1% de las leucemias agudas en edad pediátrica. En la actualidad su definición constituye un motivo de debate pese a los criterios diagnósticos establecidos (tabla 1). Desde un punto de vista práctico en la mayoría de casos su dificultad diagnóstica se plantea al diferenciar la LC del síndrome mieloproliferativo transitorio (SMPT) cuyo diagnóstico depende de la evolución clínica. Su diferenciación es de gran importancia dada la actitud terapéutica y pronóstica que se deriva del mismo. Mientras la LC está asociada a mal pronóstico con una elevada tasa de mortalidad, indepen-

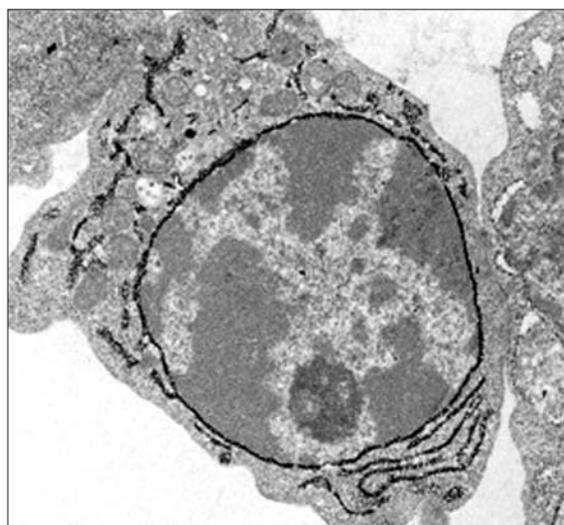


Figura 3. Megacarioblasto en médula ósea con positividad de la peroxidasa plaquetaria en la cisterna perinuclear y en el retículo endoplásmico rugoso (técnica citoquímica ultraestructural PPO). (MET, aumento original $\times 7.900$.)



Figura 4. Imagen de TC craneal que muestra la extensa hemorragia intraventricular con discreta afectación del parénquima.

Tabla 1. Criterios diagnósticos leucemia congénita

1. Presentación en las primeras 4 semanas de vida
2. Proliferación de precursores de origen hematopoyético
3. Infiltración de órganos no hematopoyéticos
4. Ausencia de otras causas patológicas que justifiquen la proliferación

Bresters D. *Br J Haematol* 2002;117:513.

dientemente de que se trate o no, el SMPT se resuelve espontáneamente en la mayoría de casos en una media de 3 meses sin precisar de tratamiento, aunque hasta un 20% de los casos pueden evolucionar a leucemia tras un período variable de mielodisplasia. Ade-

Tabla 2. Diferencias clinicobiológicas entre los subtipos de LAMK

	LAMK-SD	LAMK-novo	LAMK t(1;22)
Edad (mediana) (meses)	25,8	21,6	4
Sexo (V/M)	1/5	15/24	18/11
Hepatomegalia	66%	55%	90%
Esplenomegalia	33%	41,3%	ND ^a
Leucocitos ($\times 10^9/l$) (mediana, rango)	9,2 (4,6-11,4)	8,8 (5,9-12,8)	14 (3-52)
Blastos circulantes (mediana, rango)	5,5 (1-66)	8,8 (6-12,8)	20 (1-40)
Blastos médula ósea (mediana, rango)	43,5 (16-72)	52 (3-100)	ND ^a
Plaquetas ($\times 10^9/l$)	23,5 (6-127)	40 (3-528)	35 (4-216)
Citogenética	+ 21 + 8 (50%) + 21 adicional	Complejo (18%) + 21(43%)	t(1;22) (60%) ^b Hiperdiploides (40%) ^c
Incidencia LAMK	23%	43%	33%
Respuesta completa	90%	70%	53%
SLE 2 años IC 95 %	83% (43-100%)	14% (0-28%)	Mediana 8 m (1-104 m)

^a ND: no disponible; ^b dato que incluye la mayoría de casos de edad < 4 meses; ^c dato que incluye la mayoría de casos de edad > 6 meses.
SD: síndrome de Down.

más el SMPT está asociado característicamente a pacientes con trisomía 21, principalmente con síndrome de Down, aunque también se da en casos con mosaicismos constitucionales, o casos en que la clona leucémica presenta +21. Se ha referido recientemente la asociación del SMPT con mutaciones del gen *GATA-1* mapado en el cromosoma X (p11.23), sin embargo este dato no parece suficientemente robusto para diferenciar la LC del SMPT.

Dada la baja incidencia de la LC no hay estudios de series numerosas que permitan establecer las características clínicas y sobre todo biológicas de esta entidad. Además en muchos de los casos se obtiene insuficiente material y la infiltración blástica suele ser baja, por lo que resulta difícil el poder realizar estudios biológicos sobre los mecanismos moleculares implicados en su patogenia. En las escasas series publicadas de LC, la leucemia mieloblástica aguda es la más frecuente (64%) y dentro de ellas destaca el subtipo M5 FAB (59%). Entre las anomalías citogenéticas, se han descrito múltiples alteraciones destacando las alteraciones asociadas a mal pronóstico como algunos reordenamientos del gen *MLL*.

En estudios recientes en leucemias en gemelos univitelinos, se ha constatado que algunas de las alteraciones cromosómicas comunes de las leucemias pediátricas se originan prenatalmente en el útero durante la hematopoyesis fetal. Aunque se ha descrito que el período de latencia posnatal en el desarrollo de la leucemia es variable. Frente a estos resultados, se plantea la pregunta si es suficiente una translocación cromosómica para desarrollar una leucemia. Muchas de las investigaciones en este sentido indican que el desarrollo de una clona maligna precisa de la acumulación de varias lesiones genéticas independientes y

complementarias (Modelo de Knudson en dos pasos). Sin embargo en modelos animales con ratones parece que un factor determinante es el tipo de alteración cromosómica, así el reordenamiento del gen *MLL* en lactantes con leucemia linfoblástica parece ser suficiente para el desarrollo leucémico. Mientras que otras alteraciones como TEL/AML1 parecen precisar de la asociación de cambios genéticos posnatales. En general, parece ser que los genes de fusión que codifican factores de transcripción híbridos requieren un complemento genético en forma de mutación o activación de las quinasas para el desarrollo leucémico, tal y como se ha objetivado en leucemias agudas pediátricas con translocaciones cromosómicas que además asocian mutaciones de FTL3-quinasa como complemento genético en el desarrollo leucémico.

Otro aspecto a tener en cuenta en la leucemogénesis intraútero es la implicación de factores nocivos conocidos asociados a la madre durante la gestación como la exposición parenteral a agentes tóxicos (tabaco, marihuana o alcohol) o agentes ambientales como insecticidas. En el caso aquí presentado no había antecedentes maternos asociados a factores leucemógenos conocidos.

La leucemia megacarioblástica (LAMK/LAM7 [FAB]) en edad pediátrica supone el 10% de las leucemias no linfoblásticas agudas (LANL) pediátricas y constituye un grupo heterogéneo de entidades bien definidas como: LAMK asociada t(1;22)(p13;q13), LAMK asociada al síndrome de Down y la LAMK *de novo* no asociada a ninguna de las anteriores (tabla 2). Recientemente se ha identificado a nivel molecular el gen de fusión originado por la t(1;22)(p13;q13), gen *OTT* (RBM15) en # 1 (p13) que se fusiona con el gen *MAL* (MLK1) en # 22 (q13) en el derivativo 22.

En una serie publicada de 39 casos pediátricos de LAMK con t(1;22), éstas suponen el 3 % del total de LANL pediátricas con una edad de presentación menor de 2 años, con un pico de incidencia máximo a los 4 meses. En alguno de estos casos se plantea si se trata de una LC, ya que en estudios retrospectivos en sangre neonatal (Test Guthrie card) se ha detectado el gen de fusión *OTT-MAL*, en casos que empezaron a los 5 meses y 2 años. Así mismo se han descrito pacientes, como el aquí presentado, que empiezan al nacimiento. Clínicamente en más del 90 % de casos se asocia organomegalia (hepatoesplenomegalia) y es muy frecuente la infiltración cutánea. Así mismo, suele presentar fibrosis medular sin una infiltración blástica abundante con presencia de micromegacariocitos. El cariotipo suele ser complejo en aquellos casos que aparecen más tardíamente, con clones hiperdiploides en los cuales en más del 50 % de los casos hay +der(1) t(1;22), +2, +6 y +19. Menos frecuentes son del(1p), +4, +7, +8, +9, +10, +14, +15, +17, +18, +20 y add(21p). Contrariamente a lo previsible, el cariotipo complejo no se asocia a peor pronóstico. Este paciente tenía asociada a la t(1;22) la t(5;18) (q13;q22), alteración no descrita previamente y en la que no hay secuenciados genes relevantes en los puntos de rotura implicados de los cromosomas 5 y 18. En general la LAMK asociada a la t(1;22) tiene peor pronóstico que las otras formas de LAMK. Este caso resulta especialmente relevante ya que pese a las complicaciones que presentó y a no ser trasplantada, tal y como indica el protocolo terapéutico (SHOP-LANL 99), se mantiene en remisión completa clínica y genética a los 5 años del diagnóstico.

Recordar que:

1. Importancia del diagnóstico diferencial entre LC y SMPT.
2. La LC es poco frecuente pero no excepcional. El subtipo leucémico más frecuente es la LAM-M5 (FAB).
3. Las LAM-M7 (FAB) en edad pediátrica tienen una frecuencia del 10 %, son el fenotipo más frecuente de las leucemias asociadas a síndrome de Down, mientras que aquellas que aparecen en lactantes se asocian característicamente a la t(1;22) y son de muy mal pronóstico.

Bibliografía recomendada

- Athale UH, Razzouk BI, Raimondi SC, Tong X, Behm FG, Head DR, et al. Biology and outcome of childhood acute megakaryoblastic leukemia: a single institution's experience. *Blood* 2001;97:3727-32.
- Bajwa RP, Skinner R, Windebank KP, Reid MM. Demographic study of leukaemia presenting within the first 3 months of life in the Northern Health Region of England. *J Clin Pathol* 2004;57:186-8.
- Borkhardt A, Wilda M, Fuchs U, Gartner L, Reiss I. Congenital Leukaemia after heavy abuse of permethrin during pregnancy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 2003;88:436-7.
- Bresters D, Reus AC, Veerman AJ, Van Wering ER, Van Der Does-Van Den Berg A, Kaspers G. Congenital Leukaemia: The Dutch experience and review of the literature. *Br J Haematol* 2002;117:513-24.
- Dastugue N, Lafage-Pochitaloff M, Pagès MP, Radford I, Bastard C, Talmant P, et al. Cytogenetic profile of childhood and adult megakaryoblastic leukemia (M7): A study of the Groupe Français de Cytogénétique Hématologique (GFCH). *Blood* 2002;100:618-25.

- Greaves MF, Wiens J. Origins of chromosome translocations in childhood leukemia. *Nat Rev Cancer* 2003;3:1-39.
- Lange B. The management of neoplastic disorders of haematopoiesis in children with Down's syndrome. *Br J Haematol* 2000;110:512-24.
- Look AT. A leukemogenic twist for GATA-1. *Nat Genet* 2002;32:83-4.
- Mercher T, Busson-Le Coniat M, Khac FN, Ballerini P, Mauchauffé M, Bui H, et al. Recurrence of OTT-MAL fusion in t(1;22) of infant AML-M7. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;33:22-8.

Caso 2

CRISIS BLÁSTICA NEUROMENÍNGEA EN PACIENTE CON LMC EN REMISIÓN MOLECULAR EN MÉDULA ÓSEA

C. PÉREZ-BARRACHINA¹, D.M. NAVARRO-MUÑOZ¹,
C. SALVADOR-OSUNA¹, D. RUBIO-FÉLIX¹,
N. FERNÁNDEZ-MOSTEIRÍN¹ Y J.M. SAYAGUÉS²

¹Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza. ²Servicio General de Citometría, Departamento de Medicina y Centro de Investigación del Cáncer. Universidad de Salamanca.

Historia clínica: Paciente de 50 años, sin antecedentes de interés, diagnosticado en otro centro de leucemia mieloide crónica (LMC) con cariotipo en médula ósea: 46,XY, t(9;22)(q34;q11) [23]/47,XY, t(9;22)(q34;q11), + 8[1]/46,XY[1] (figs. 1 y 2).

Exploración física: La ecografía y TC abdominal reveló una esplenomegalia de 13 cm.

Tratamiento y evolución: Inicialmente recibió tratamiento con interferón alfa, escalando dosis. Posteriormente se le añadió citarabina subcutánea, según esquema del protocolo LMC-99 (interferón + citarabina) que hubo que suspender por citólisis hepática. Posteriormente reinició el tratamiento con Roferon®A. Se efectuó estudio de histocompatibilidad HLA y se descartó el trasplante alogénico por no disponer de

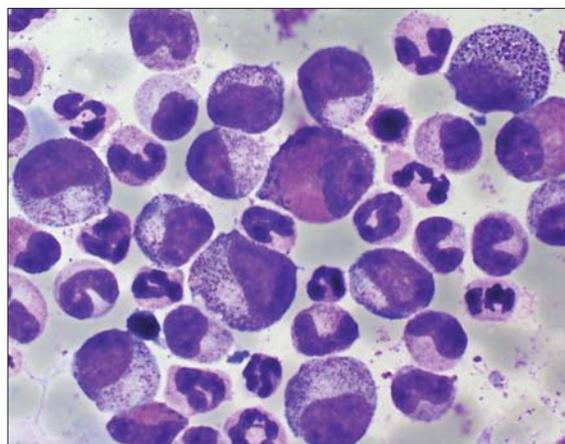


Figura 1. Médula ósea. LMC: fase crónica. (Azur-eosina, $\times 1.000$.)

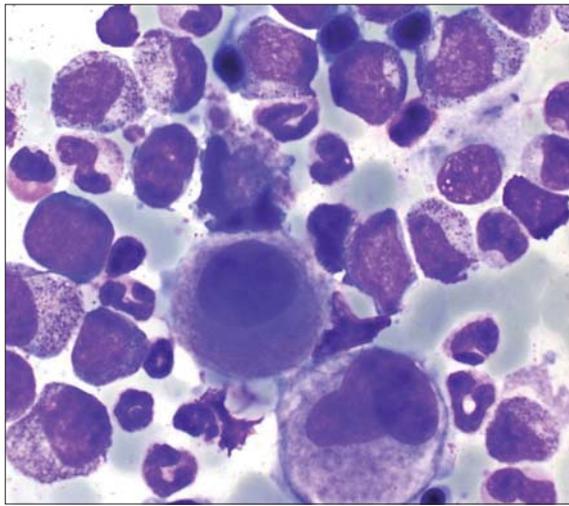


Figura 2. Médula ósea. LMC: fase crónica. (Azur-eosina, $\times 1.000$.)

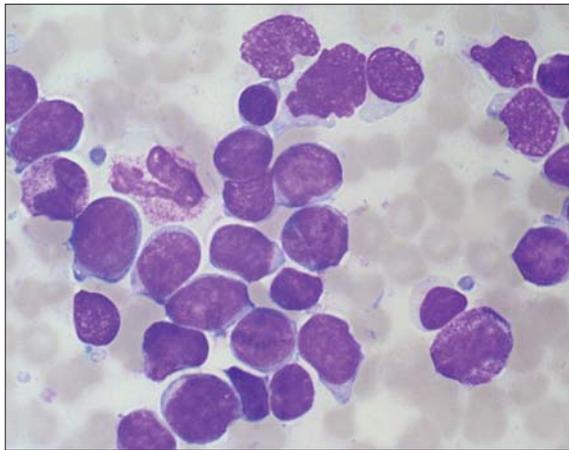


Figura 3. Médula ósea. Células blásticas atípicas de morfología linfoide. (Azur-eosina, $\times 1.000$.)

hermano compatible. A 11 meses del inicio del tratamiento se realizó reevaluación sin obtener respuesta citogenética, mostrando el siguiente cariotipo: 46,XY, t(9;22)(34,11)[5]/47, XY, +8, t(9;22)(34;11)[19] 46,XY[2]. El paciente permaneció estable durante 9 meses, en que se detectan parámetros de progresión hacia crisis blástica. En este momento en la exploración física se aprecia púrpura equimótica, esplenomegalia y hepatomegalia. Dentro de los parámetros biológicos destaca: *Hemograma*: Hb 106 g/l; plaquetas $37 \times 10^9/l$ y 54% de células blásticas en la fórmula leucocitaria. Estudio de coagulación normal. *Aspirado medular*: escasos grumos macroscópicos que muestran abundante celularidad con 96% de células blásticas, con núcleo de cromatina inmadura y citoplasma escaso y basófilo (fig. 3). *Citoquímica de los blastos*: MPO negativos; PAS 12% con positividad granular. *Inmunofenotipo por citometría de flujo de los blastos*: CD19++, cCD79a+ heterogéneo, CD20-/+ débil (30%), CD10+ homogéneo, CD45+ débil, CD34++ homogéneo, CD13+ débil, CD65-, CD2-, HLADR+, TdT+, CD38+ débil homogéneo, 7.1+, CD3-, CD7-, CD5-, CD4-, CD8-, CD33-, cIgM-, cMPO-, cCD3-, cLisozima- (fig. 4). *Estudio citogenético*: se detecta la presencia de dos clones celulares con las siguientes alteraciones: [25]46,XY,t(9;22)(q34;q11)/[55] 47,XY, t(9;22)(q34;q11),+8/[20]46,XY. *Hibridación in situ*: un 67% de las células analizadas presentan por hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) la t(BCR;ABL) (fig. 5). No se detectan alteraciones a nivel del cromosoma 11q23. *Estudio de ADN*: el análisis del ADN de las células blásticas muestra un contenido de ADN diploide (I.ADN = 1.00) y un índice de proliferación (S + G2/M) de 4,7%. Con todos estos datos se establece el diagnóstico de LAL-B común (BCR;ABL)+. Recibió quimioterapia según el esquema LAL-PETHEMA-93 LAL/AR. Se constató una agranulocitosis en el día +10 y hepatotoxicidad vinculada a la L-asparaginasa en el día +23. El paciente requirió soporte trans-

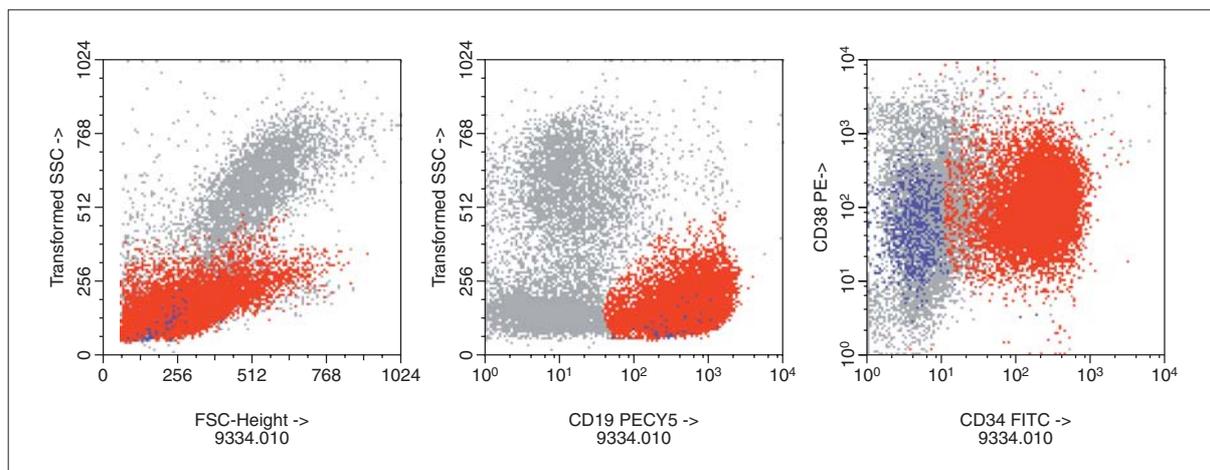


Figura 4. Inmunofenotipo de las células blásticas en médula ósea (CD19, CD34, CD38).

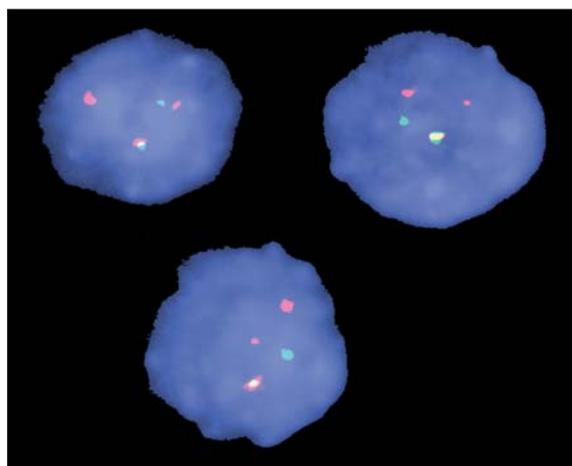


Figura 5. Medula ósea: células blásticas. Núcleos interfásicos contrateñidos con DAPI e hibridados con la sonda LSI bcr/abl Dual Fusion: bcr, gen localizado en el cromosoma 22 (color verde); abl gen localizado en el cromosoma 9 (color rojo).

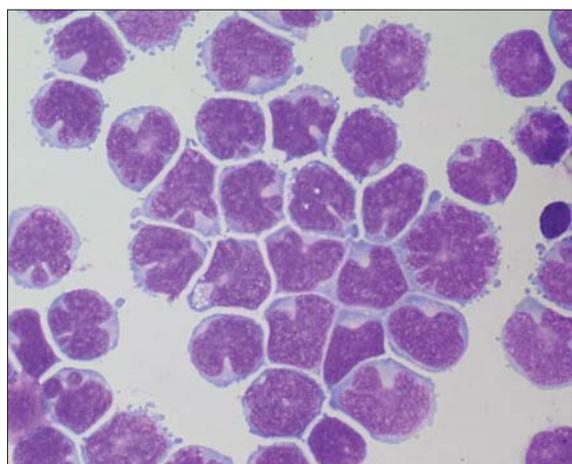


Figura 6. Líquido cefalorraquídeo: citocentrifugado. Células blásticas atípicas. (Azur-eosina, $\times 1.000$.)

fusional con concentrado de hematíes y plaquetas. En sangre periférica y en médula ósea se obtuvo remisión completa (con 0,2% de células blásticas en el aspirado medular), pero no citogenética, ya que persistía una población Ph+ y otra Ph+ y con trisomía 8. Se inició tratamiento con imatinib mesilato (Glivec®) alcanzando la remisión citológica y citogenética a los 6 meses de iniciar el tratamiento, persistiendo la reordenación BCR/ABL p210+. En la valoración efectuada al año del tratamiento con imatinib, por análisis molecular a partir del ARN de médula ósea y sangre periférica no se detectó la presencia del transcrito quimérico BCR/ABL a nivel del M-bcr.

Seis meses después se observa un cuadro de paraparesia en extremidades inferiores. En el líquido cefalorraquídeo (LCR) (citocentrifugado) se detecta: abundante celularidad con 94% de células blásticas atípicas de morfología linfóide (fig. 6). Por citometría de flujo se demuestra que las células blásticas presentan un fenotipo aberrante (CD34+, CD19+, CD38+ débil, CD45+ débil), idéntico al detectado en médula ósea en la crisis blástica con la combinación de anticuerpo monoclonal (CD34/CD38+/CD19+/CD45) (fig. 7). Por hibridación *in situ* se evidencia que el 98% de las células presentan BCR/ABL (mayor) (fig. 8). Estos hallazgos certifican una afectación neuromeningea por células leucémicas. El estudio de médula ósea, en este momento, demostró remisión citológica completa y en el inmunofenotipo por citometría de flujo se constató infiltración por células B inmaduras neoplásicas (0,02% de la celularidad global). No se detectó t(BCR;ABL) mediante técnica de FISH (< 1%) y por técnica H-RT-PCR cuantitativa (sonda TaqMan) se evidenció una copia positiva de t(9;22) BCR-ABL-Major. El enfermo ha recibido 5 dosis de tratamiento triple intratecal y tratamiento con irradiación holocraneal. En controles posteriores se halló el LCR en remisión molecular.

Discusión: En nuestra opinión, el interés del caso reside en la escasa frecuencia de afectación del siste-

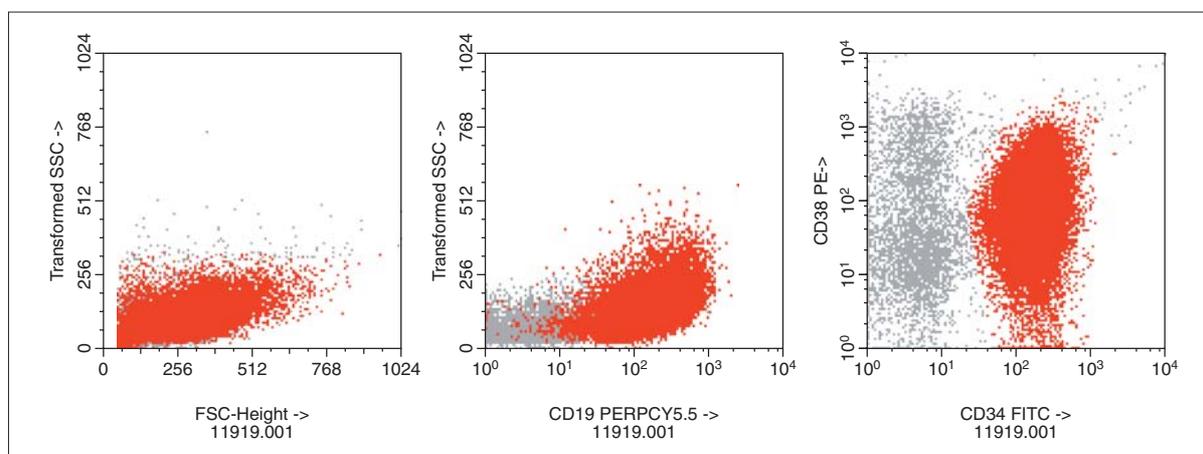


Figura 7. Inmunofenotipo de las células blásticas en líquido cefalorraquídeo (CD19, CD34, CD38).

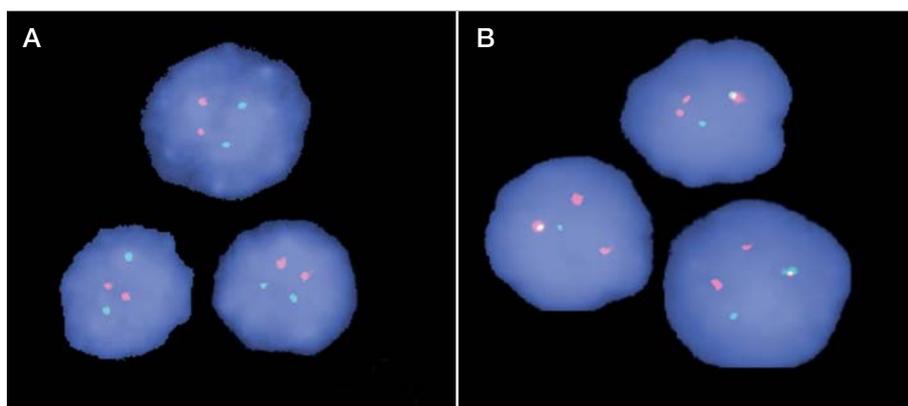


Figura 8. Núcleos interfásicos contrateñidos con DAPI e hibridados con la sonda LSI bcr/abl Dual Fusion: bcr, gen localizado en el cromosoma 22 (color verde); abl gen localizado en el cromosoma 9 (color rojo). A) Médula ósea. Remisión completa medular. B) Afectación neuromeningea.

ma nervioso central (SNC) como manifestación de crisis blástica en LMC, hecho referido en recientes publicaciones. Cabría sin embargo cuestionar si esta crisis blástica correspondería realmente a una segunda crisis blástica. Este mecanismo se apoyaría en el hecho de que el perfil inmunológico de la clona medular era superponible.

Una explicación justificativa de este comportamiento radicaría en que el imatinib mesilato alcanza concentraciones en LCR muy inferiores a las plasmáticas y esta concentración sería insuficiente para erradicar posibles focos extramedulares de enfermedad mínima residual (EMR), aun cuando pueda tener cierto efecto retardador.

Por todo ello, queremos hacer patente la necesidad de abordar de forma integrada el enfoque terapéutico de posibles focos de EMR extramedular, ya que las nuevas opciones terapéuticas, aun siendo efectivas en el control de las recaídas medulares, no lo son tanto sobre localizaciones como las que presentaba nuestro paciente.

Recordar que:

1. A pesar de la indudable eficacia de los nuevos fármacos incorporados al tratamiento de la LMC, en las fases blásticas de la misma, pueden producirse focos extramedulares que deben ser valorados adecuadamente.
2. La necesidad de planificar un tratamiento integrado que incluya profilaxis sobre SNC en pacientes con LMC en fase blástica linfoide.

Bibliografía recomendada

- Bornhauser M, Jenke A, Freiberg-Richter J, Radke J, Schuler US, Mohr B, et al. CNS blast crisis of chronic myelogenous leukemia in a patient with a major cytogenetic response in bone marrow associated with low levels of imatinib mesylate and its N-desmethylated metabolite in cerebral spinal fluid. *Ann Hematol* 2003;83:401-2.
- Specchia G, Palumbo G, Pastore D, Mininni D, Mestice A, Liso V. Extramedullary blast crisis in chronic myeloid leukemia. *Leuk Res* 1996; 20:905-8
- Wolff NC, Richardson JA, Egorin M, Ilaria RL Jr. The CNS is a sanctuary for leukemic cells in mice receiving imatinib mesylate for bcr/abl-induced leukemia. *Blood* 2003;101:5010-3.

Caso 3

PROGENITOR CLONAL COMÚN EN LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA Y LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA EN EL MISMO PACIENTE

D. GONZÁLEZ¹, A. BALANZATEGUI¹, B. VIDRIALES¹, M. VAN DER BURG², T. SZCZEPANSKY², M.L. SÁNCHEZ³, M.E. ALONSO¹, R. GARCÍA-SANZ¹, A. ORFAO³, M. GONZÁLEZ¹ Y J.F. SAN MIGUEL¹

¹Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca y Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca, Salamanca. ²Department of Immunology, Erasmus MC, University Medical Center, Rotterdam, Holanda. ³Servicio de citometría del Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca.

Introducción: Pese a que la leucemia linfática crónica (LLC) de célula B es uno de los síndromes linfoproliferativos más comunes en el mundo occidental, y se ha estudiado extensivamente, el origen de la célula diana tumoral sigue siendo desconocido. Aproximadamente un 10% de los pacientes con LLC desarrollan un linfoma de grado alto, normalmente un linfoma difuso de célula grande, lo que se conoce como síndrome de Richter. Estos casos representan un sistema muy interesante para investigar la historia natural de la LLC. Los estudios moleculares en diferentes casos de síndrome de Richter han obtenido resultados variables. Así, en algunos casos se ha demostrado un origen clonal común, mientras que en otros el origen de ambas entidades no presenta ninguna relación. También se han descrito, aunque más raramente, casos de transformación secundaria de LLC a mieloma múltiple, enfermedad de Hodgkin y leucemia linfoblástica aguda (LLA).

En los últimos años diferentes grupos han demostrado que el estudio de las mutaciones somáticas de

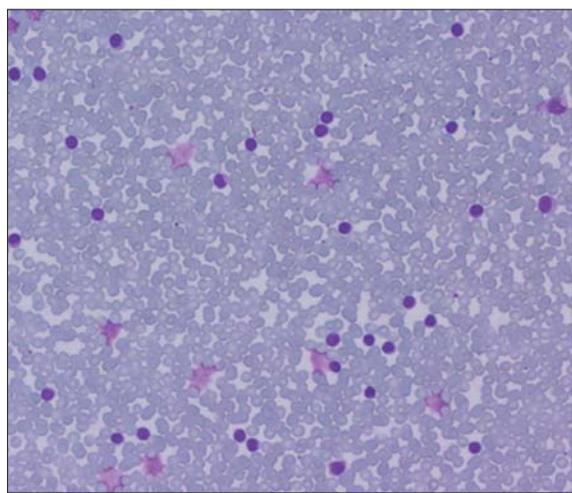


Figura 1. Frotis de sangre periférica en el momento del diagnóstico de la leucemia linfática crónica. (May-Grünwald-Giemsa, $\times 200$.)

los genes de las inmunoglobulinas (Ig) permite distinguir dos grupos de LLC con pronóstico muy diferente. Así la presencia de hipermutación somática (HMS) es característica de un grupo de LLC de buen pronóstico, con una esperanza de vida significativamente mayor que los pacientes con ausencia de HMS, incluso cuando se consideran únicamente pacientes en estadios iniciales de la enfermedad. El proceso de HMS parece ocurrir de forma exclusiva durante la reacción de los centros germinales de los órganos linfoides secundarios, mientras que los linfocitos B que no han alcanzado los centros germinales presentan reordenamientos de Ig sin HMS. Por ello, la hipótesis actual es que el origen de la célula diana tumoral es diferente para ambos grupos de LLC, siendo un linfocito B maduro con HMS el responsable del grupo con mejor pronóstico, mientras que los casos más agresivos, con Ig sin mutaciones, procederían de linfocitos B más inmaduros. Un estudio reciente sugiere que la transformación clonal a síndrome de Richter sólo ocurre en casos de LLC sin HMS, mientras que la aparición de transformacio-

nes secundarias no relacionadas puede ocurrir en casos con o sin HMS.

Al contrario que los síndromes linfoproliferativos B maduros, las células de la LLA presentan unas características fenotípicas y genotípicas clásicas de células B precursoras, incluyendo la expresión de CD34, la ausencia de Ig de superficie y la falta de HMS en los reordenamientos de los genes de Ig. Se han descrito en la literatura médica casos esporádicos de transformación a LLA en pacientes con LLC, y en los pocos casos en los que existen datos moleculares, éstos han sugerido un origen clonal común de ambas entidades. Estos resultados sugieren una similitud con el proceso de crisis blástica que ocurre en pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC), donde se ha demostrado que la célula diana tumoral causante de ambas leucemias es un precursor de célula B CD34+. Sin embargo, los datos presentados en este trabajo indican que la historia natural de algunos casos de crisis blástica en LLC puede ser muy diferente y sugieren la existencia de un mecanismo de “desdiferenciación” a partir de células B maduras.

Paciente y métodos: Paciente de 88 años diagnosticado en 1991 de LLC de célula B (LLC-B) estadio A de Binet, cuyo inmunofenotipo y morfología era, en el momento del diagnóstico, típico de LLC-B (CD19+/CD5+/FMC7-/CD22-/CD23+/sIg-) (fig. 1). Se mantuvo en abstención terapéutica hasta julio de 1995, momento en que inició tratamiento por progresión clinicobiológica con clorambucilo intermitente (0,4 mg/kg 2 días cada 15 días). Desde entonces recibió esta pauta terapéutica en diferentes ocasiones, discontinuándola cuando alcanzaba respuesta clínica. En marzo del 1999 ingresa por progresión clinicobiológica con astenia y fiebre de 2 semanas de evolución. El hemograma reveló Hb: 8,5 g/dl, leucocitos: $94,2 \times 10^9/l$ y plaquetas: $151 \times 10^9/l$. El nivel de LDH (2.185 U/l, N < 460) y B₂-microglobulina (4,8 mg/l, N < 2,5) estaban elevados. En los frotis de sangre periférica y médula ósea se objetivaron dos poblaciones morfológicamente diferenciadas (figs. 2A y 2B): el 80 % eran blastos de pequeño tamaño con elevada pro-

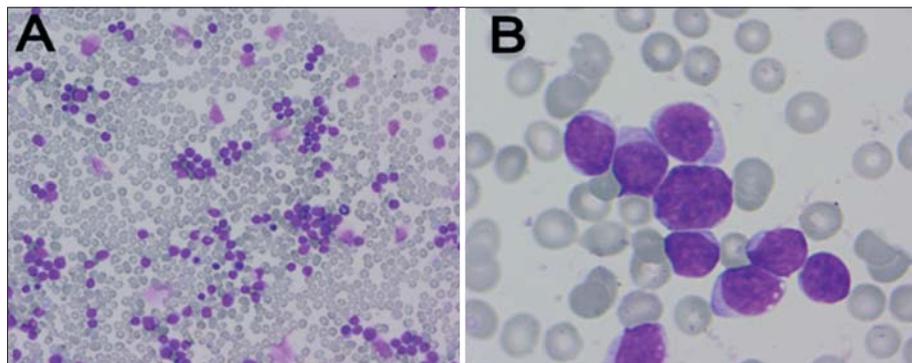


Figura 2. (A) Panorámica de médula ósea en el momento del diagnóstico de la crisis blástica de la leucemia linfática crónica. (May-Grünwald-Giemsa, $\times 200$.) (B) Detalle morfológico de los blastos linfoides en el momento del diagnóstico de la crisis blástica de la leucemia linfoblástica aguda. (May-Grünwald-Giemsa, $\times 1.000$.)

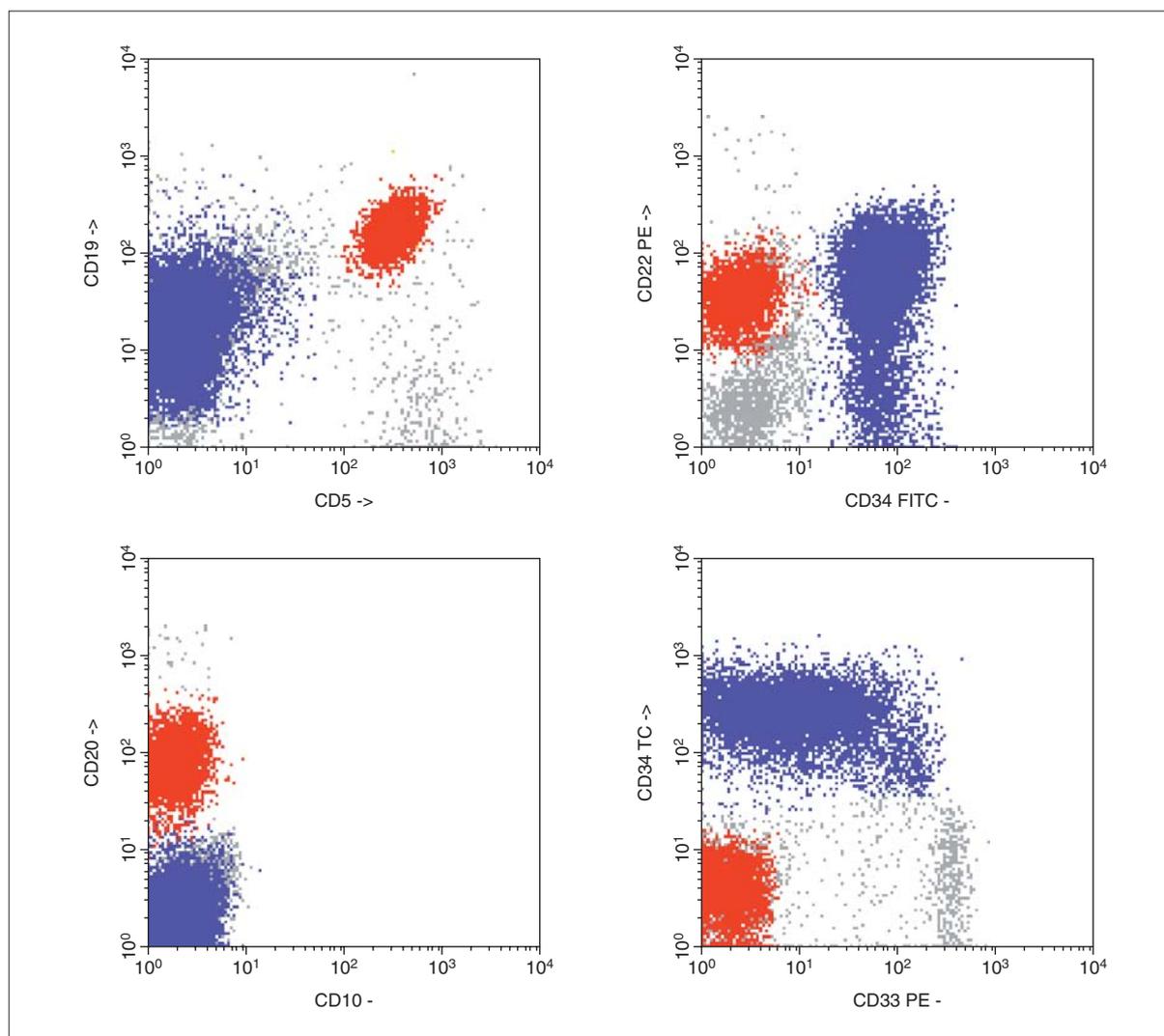


Figura 3. Diagrama de citometría de flujo mostrando las dos poblaciones de LLA y LLC en la muestra LLA1 (muestra al diagnóstico de LLA sin separar). Las células correspondientes a LLA están representadas en azul (63%: CD19+ débil, CD10-, CD20-, CD34+, CD33+), mientras que las correspondientes a LLC aparecen en rojo (22%: CD19+, CD20+, CD5+, CD10-, CD34-, CD33-).

porción núcleo/citoplasma, y el 15% eran linfocitos maduros, con características morfológicas de LLC. El estudio inmunofenotípico de sangre periférica confirmó la presencia de dos poblaciones celulares una con fenotipo de LLC y otra con fenotipo de LLA pro-B (ver más adelante), que suponían el 22 y el 63 % de la celularidad, respectivamente (*muestra LLA1*) (fig. 3). Ante estos hallazgos se establece el diagnóstico de crisis blástica linfoblástica en paciente con LLC iniciando tratamiento con vincristina y prednisona semanal. A los 15 días del tratamiento el estudio fenotípico de sangre periférica revela una disminución porcentual de la población inmadura (2,7%) con incremento de la población con fenotipo de LLC (76%) y a las 4 semanas se observó una desaparición de la población inmadura (fenotipo de LLC y LLA del 80 y 0% de la celularidad

total, respectivamente [*muestra LLC1*]). En abril de 1999 se introduce al tratamiento ciclofosfamida y en mayo inicia tratamiento de mantenimiento con metotrexato y 6-mercaptopurina. En noviembre del 1999 ingresa por neumonía bilateral falleciendo a los 4 días de su ingreso.

Inmunofenotipo y purificación celular: el estudio inmunofenotípico se realizó empleando un citómetro de flujo FACScan (Becton/Dickinson, Biosciences San José, CA, USA) utilizando las siguientes combinaciones triples de AcMo (FITC, PE, PerCP o PE-Cy5): cMPO/cCD79a/cCD3, nTdT/cIgM/cCD3, CD4/CD8/CD3, CD7/CD5/CD3, CD19/CD34/CD45, CD10/CD13/CD19, CD5/CD33/CD20, CD65/CD2/HLA-DR, CD34/CD38/CD19, CD10/CD20/CD19, CD7/CD2/CD3, CD34/CD22/CD19, y TdT/CD10/CD19, FMC7/CD5/CD19; CD22/CD23/CD19;

Tabla 1. Patrón Inmunofenotipo de ambas poblaciones

	Población LLA 63 %	Población LLC 22 %
cMPO	-	-
cCD79a	+	+
cCD3	-	-
TdT	+	-
clgM	-	+
CD19	+	+
CD34	+	-
CD10	+	-
CD20	-	+
HLA-DR	+	+
CD23	-	+
CD5	-	+
CD22	+ débil	-
CD38	+	-
CD33	+	-
CD13	+	-
CD45	+ débil	+
slg	-	-

Antígenos negativos en ambas poblaciones: FMC7, CD103, CD25, CD11c, CD7, CD2, CD3, CD4, CD8 y CD65.

CD103/CD25/CD19; CD10/CD11c/ CD19; (slg) kappa/(slg)lambda/CD19. Todos los AcMo fueron adquiridos a Becton Dickinson, excepto CD34 PE-Cy5 y FMC7-FITC (Immunotech, Marseille, France) y CD19 PE-Cy5, CD33 PE-Cy5, CD13 PE-Cy5, CD4 PE-Cy5, CD65 FITC, CD45 PE-Cy5, y CD20 PE-Cy5 (Caltag Laboratories, San Francisco USA).

La separación celular de las dos poblaciones identificadas en la muestra de sangre periférica (LLA1) se realizó mediante *cell sorting* en un citómetro de flujo FACS Vantage identificando la población correspondiente a la LLA gracias a la expresión de CD34 y la correspondiente a LLC gracias a la coexpresión de CD19 y CD5. Se obtuvieron un total de 5×10^6 células blásticas y un total de 1×10^6 células de LLC, con una pureza en ambos casos superior a 98%.

Tabla 2. Patrón de reordenamiento de los genes de cadena pesada (*IGH*) y ligeras (*IGK* e *IGL*) obtenido por Southern blot en la muestra LLA1. (Idéntico patrón se obtuvo en la población LLC1)

Sonda	Enzimas			
	BglII	BamHI-HindIII	HindIII	XbaI
IGHJ6	R/R	R/G	R/R	R/R
IGKJ5	R/R	R/R	-	-
IGKDE	G/G	G/G	-	-
IGKC	R/R	-	-	-
IGLJ2	G/G	-	G/G	-
IgLC1D	G/G	-	G/G	-

R: reordenado; G: germinal; R/R: reordenamiento bialélico; R/G: reordenamiento monoalélico; G/G: configuración germinal.

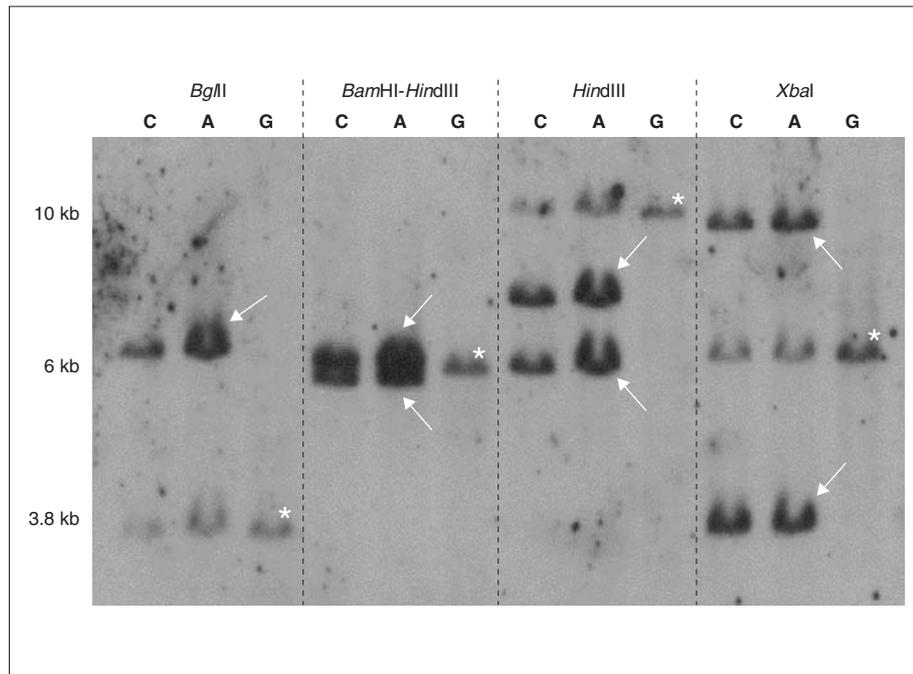
Extracción de ADN y Southern blot: la obtención de ADN de alta calidad se obtuvo a partir de muestras de sangre periférica sin separar (poblaciones LLA1 y LLC1) así como en poblaciones celulares separadas mediante digestión con proteinasa K y extracción con fenol/cloroformo. Para realizar el análisis de Southern blot de los genes de Ig, el ADN se digirió con 4 combinaciones diferentes de enzimas de restricción, en 4 reacciones separadas (*BglII*, *BamHI-HindIII*, *HindIII* y *XbaI*). Posteriormente, el ADN digerido se transfirió a una membrana de nailon y fue hibridado con las siguientes sondas: IGHJ6, correspondiente a los genes de las cadenas pesadas de Ig (*IGH*), IGKJ5, IGKC e IGKDE, para la cadena ligera kappa de las Ig (*IGK*) y, por último, IGLJ2 y IGLC1D para la cadena ligera lambda (*IGL*).

PCR y secuenciación: los reordenamientos de *IGH* e *IGL* fueron amplificados en ADN obtenido de las muestras de sangre periférica, así como en ADN procedente de células purificadas de LLC y LLA, utilizando los primeros y los protocolos diseñados durante el estudio del BIOMED-2. En concreto se amplificaron por PCR los reordenamientos VDJH y DJH del locus de *IGH*, y los reordenamientos VJK y KDE del locus de *IGK*. Los productos de PCR obtenidos se analizaron en un gel de poliacrilamida y las bandas clonales se aislaron para la posterior extracción y secuenciación directa del ADN. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las procedentes de segmentos V, (D) y J germinales de las principales bases de datos de los genes de Ig. El análisis de la distribución de mutaciones reemplazantes (R) y silentes (S) se realizó de acuerdo con el modelo de distribución binomial propuesto por Chang y Casali.

Resultados y discusión: El análisis por citometría de flujo de la muestra LLA1 (muestra al diagnóstico de LLA sin separar) mostró la presencia de dos poblaciones tumorales perfectamente definidas (tabla 1) (fig. 3). Un 22% de la celularidad total estaba representado por linfocitos pequeños con fenotipo de LLC (CD19+, CD5+, CD23+, CD20+), mientras que otro 63% de las células eran blastos con un patrón inmunofenotípico característico de una LLA de fenotipo pro-B (CD19+, CD34+, CD10-, CD20-, TdT+), con expresión aberrante de los antígenos mieloides CD13 y CD33 (fig. 3).

La tabla 2 muestra los resultados obtenidos mediante Southern blot. Un patrón idéntico de reordenamientos de *IGH* fue obtenido en las muestras LLA1 y LLC1, ambas presentando reordenamientos bialélicos de JH de igual tamaño (fig. 4). El análisis de *IGK* fue realizado solamente en la muestra LLC1, y mostró la presencia de dos reordenamientos de VJK potencialmente funcionales, mientras que el locus de *IGL* mantenía una configuración germinal (tabla 2). Aunque la proporción relativa de células tumorales provenientes de LLA y LLC era distinta en las dos muestras (63 frente a 22% en LLA1 y 0 frente a 80% en LLC1, respectivamente), el porcentaje total

Figura 4. Análisis de Southern blot de los reordenamientos de *IGH*. Resultados obtenidos por Southern blot en las muestras LLC1 (C) y LLA1 (A) y linfocitos CD3 (G, control germinal) digeridas con las diferentes combinaciones de enzimas (*Bgl*II, *Bam*HI-*Hind*III, *Hind*III y *Xba*I) e hibridadas con la sonda *IGH*J6. En ambas muestra tumorales se detectan un mismo reordenamiento bialélico (dos bandas de reordenamiento) de tamaño idéntico, indicando la existencia de una misma célula diana tumoral común para ambas poblaciones. Nota: asteriscos blancos indican las bandas germinales (no reordenadas); flechas simples indican el reordenamiento VDJH; flechas rayadas indican el reordenamiento DJH. El reordenamiento VDJ (DH5-18/JH4) no se puede ver en la digestión con *Bgl*II debido a su tamaño inesperadamente pequeño (< 2 kb).



de células tumorales era prácticamente idéntico (80-85 %). Por tanto, la intensidad relativa de las bandas reordenadas, comparadas con las germinales era similar y confirmó que el mismo patrón de reordenamientos de los genes de Ig estaba presente en las poblaciones de LLC y LLA (fig. 4). En resumen, el hallazgo de un único patrón de reordenamientos de los genes de Ig por Southern blot permitió demostrar el origen clonal común de ambas entidades.

La amplificación por PCR de los reordenamientos de *IGH*, confirmó la presencia de los mismos reordenamientos en las muestras LLA1 y LLC1. En concreto, tras secuenciar las dos bandas obtenidas por PCR, encontramos un reordenamiento completo (VH6/JH4) y un incompleto (DH5-18/JH4). Además, de acuerdo con el mapa de restricción de los diferentes genes, los tamaños de restricción esperados para estos reordenamientos coincidían con los encontrados por Southern blot con las diferentes enzimas de restricción. Tras comparar la secuencia del reordenamiento VH6/JH4 encontrado en ambas muestras con la secuencia germinal de VH6, se detectó un alto contenido de HMS (7%). Para comprobar que dichas mutaciones provenían del proceso de HMS y no representaban la existencia de un polimorfismo, se secuenció el segmento VH6 germinal en linfocitos normales (CD3+) del mismo paciente que confirmó una homología del 100% con la secuencia germinal demostrando, por tanto, la existencia de HMS en las células clonales. Interesantemente, al analizar las células purificadas de LLC y LLA, encontramos exactamente la misma distribución de HMS en los reordenamientos VH6/JH4 y DH5-18/JH4 en ambas poblaciones, respectivamente.

Al analizar por PCR los genes *IGK* sólo pudimos amplificar un reordenamiento VJK en las poblaciones de LLC y LLA. La secuencia correspondía a un reordenamiento funcional VK4-1/JK2, conteniendo un 6% de HMS. El segundo reordenamiento de VJK que aparecía en el Southern blot no pudo ser amplificado mediante PCR, seguramente debido a la presencia de un alto grado de HMS en la región de unión de los *primers* de VK y JK.

En conjunto, todos los datos obtenidos tanto por Southern blot como por PCR en poblaciones purificadas de LLC y LLA, así como en muestras totales, demostraron un único patrón de reordenamiento de los genes de *IGH* e *IGK*. La única explicación posible para este fenómeno es la existencia de un progenitor pretumoral común para ambas poblaciones, si bien, existen dos hipótesis divergentes para explicar tanto el origen como la evolución clonal de dicho progenitor. La primera se basa en la similitud encontrada entre la evolución hacia crisis blástica recurrente en este caso, y en otros descritos en la literatura, y la de los pacientes con LMC. En este caso, el progenitor común sería un precursor linfocito B CD34+ con sus genes de Ig ya reordenados que, a pesar de proliferar continuamente, todos sus descendientes se diferenciarían hacia células B maduras con fenotipo de LLC (CD19+/CD5+/CD23+). Dicho precursor, iría acumulando anomalías genéticas a lo largo del tiempo hasta que, en algún momento a lo largo de esta evolución, se produjese un bloqueo en la diferenciación de estas células hacia célula B madura, y comenzarían a acumularse linfoblastos en la médula ósea, cuya manifestación sería en forma de LLA. En favor de esta hipótesis estarían los datos

moleculares encontrados en un subgrupo de células CD34+ procedentes de pacientes con LLC, en las que se puede observar el mismo tipo y patrón de alteraciones citogenéticas que en las células tumorales. Así mismo, el uso del segmento VH6 en reordenamientos VDJH suele encontrarse más frecuentemente en LLA que en LLC.

Una segunda hipótesis que no podemos descartar sería la de un progenitor común en forma de linfocito B maduro que ha atravesado el centro germinal, adquiriendo HMS, cuya proliferación daría lugar a una LLC con genes de Ig hipermutados. En este caso, la aparición de una LLA secundaria a LLC resultaría de un proceso de "desdiferenciación" de esta célula B madura en el que una sucesión de genes implicados en la diferenciación y el desarrollo celular serían reexpresados o silenciados, revertiendo así el proceso natural de diferenciación celular. Esta segunda hipótesis se basaría en la existencia, según nuestros resultados, de HMS en los genes de Ig no sólo en los linfocitos B, sino también en los linfoblastos CD34+. Estudios de los genes de Ig en LLA durante la última década han demostrado consistentemente la ausencia de HMS en linfoblastos CD34+, salvo raras excepciones, en las cuales la media del grado de desviación respecto a la secuencia germinal normalmente no supera el 2%, lo cual puede ser explicado por la existencia de polimorfismos en los segmentos V de los genes de Ig. Esta hipótesis también explicaría la escasa incidencia de crisis blásticas en LLC, comparada con la encontrada en pacientes con LMC.

Futuros estudios moleculares, tanto en células de pacientes con LLC como en linfocitos y linfoblastos normales, serían muy informativos con el fin de corroborar alguna de las hipótesis mencionadas anteriormente.

Recordar que:

1. La transformación secundaria de una LLC a una LLA es un evento muy poco frecuente.
2. Saber si ambos procesos tienen un mismo origen clonal requiere de estudios moleculares.

Bibliografía recomendada

- Beishuizen A, Verhoeven MA, Mol EJ, Breit TM, Wolvers-Tettero IL, Van Dongen JJ. Detection of immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements by Southern blot analysis: recommendations for optimal results. *Leukemia* 1993;7:2045-53.
- Chiorazzi N, Ferrarini M. B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* 2003;21:841-94.
- Foon KA, Thiruvengadam R, Saven A, Bernstein ZP, Gale RP. Genetic relatedness of lymphoid malignancies. Transformation of chronic lymphocytic leukemia as a model. *Ann Intern Med* 1993;119:63-73.
- Hamblyn 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.
- Height SE, Swansbury GJ, Matutes E, Treleaven JG, Catovsky D, Dyer MJ. Analysis of clonal rearrangements of the Ig heavy chain locus in acute leukemia. *Blood* 1996;87:5242-50.
- Timar B, Fulop Z, Csernus B, Angster C, Bogner A, Szepesi A, et al. Relationship between the mutational status of VH genes and pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma in Richter's syndrome. *Leukemia* 2004;18:326-30.

Caso 4

PACIENTE CON COEXISTENCIA DE UN SÍNDROME MIELOPROLIFERATIVO CRÓNICO Y UN SÍNDROME LINFOPROLIFERATIVO CRÓNICO

J.J. HERNÁNDEZ¹, I. APPAIZ¹, M.M. RAMÍREZ²
Y M. VALGAÑÓN³

¹Servicio de Laboratorio. Hematología y Hemoterapia.

²Servicio de Anatomía Patológica. Hospital San Eloy. Baracaldo.

³Departamento de Genética. Universidad de Navarra.

Historia clínica: Mujer de 65 años enviada a la consulta a finales de 1995 para estudio de trombocitosis, sin antecedentes personales relevantes.

Exploración física: Sin hallazgos de interés.

Pruebas complementarias y evolución de parámetros biológicos: *Hemograma y frotis inicial:* Hb 128 g/l, ADE 15,5%, leucocitos $9,5 \times 10^9/l$ con presencia de eritroblastos y blastos fuera de conteo, plaquetas $605 \times 10^9/l$. Fosfatasa alcalina granulocitaria normal. Estudio de coagulación normal. *Bioquímica general:* normal así como la lactato deshidrogenasa (LDH), la vitamina B₁₂ y folato séricos, el metabolismo férrico, el proteinograma, las inmunoglobulinas séricas, el sistemático y sedimento en orina, y la sangre oculta en heces.

Volumen globular con eritrocitos marcados con ⁵¹Cr normal. *Seriada ósea:* osteoporosis en columna lumbar y cervical. *Punción-aspirado de médula:* resulta dificultosa con escasa obtención de material medular que no es válida para el estudio citológico. *Cariotipo de médula ósea:* no se obtuvo crecimiento. Cariotipo de sangre periférica: 46,XX. *Biopsia de médula ósea:* hiper celularidad hematopoyética respecto al componente adiposo, predominantemente a expensas de la serie megacariocítica, identificándose fibrosis reticulínica moderada sin fibrosis colágena, compatible con el diagnóstico de síndrome mieloproliferativo crónico tipo trombocitemia esencial (fig. 1).

Tres años después de la primera visita la cifra de plaquetas disminuyó por debajo de $500 \times 10^9/l$ y en la morfología de la sangre periférica se apreció una anisopoiquilicitosis eritrocitaria y se siguieron observando blastos y eritroblastos, hallazgos que hicieron pensar en el diagnóstico de mielofibrosis idiopática. Se realizó una *ecografía abdominal* y los únicos hallazgos reseñables fueron un quiste simple en el lóbulo hepático derecho de 1,1 cm y un quiste parapiélico en riñón derecho.

A partir de este momento se perdió el seguimiento de la paciente, que reapareció 3 años más tarde y fue reevaluada. Se obtuvieron los siguientes hallazgos en las pruebas complementarias:

Hemograma: Hb, 125 g/l; ADE, 19,4%; plaquetas, $475 \times 10^9/l$; leucocitos, $23,9 \times 10^9/l$ (60% de linfoci-

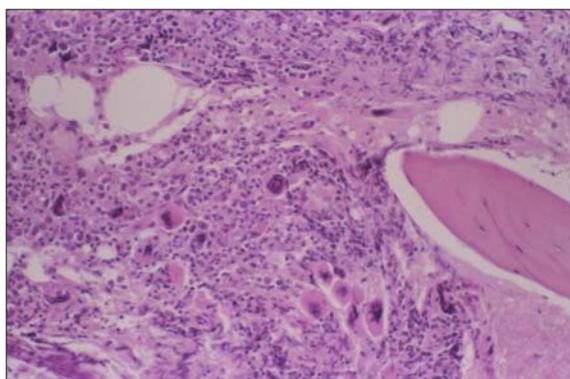


Figura 1. Primera biopsia de médula ósea. Espacio medular con incremento de la celularidad hematopoyética, especialmente de megacariocitos que en alguna localización aparecen acumulados. (Hematoxilina-eosina, aumento original $\times 100$.)

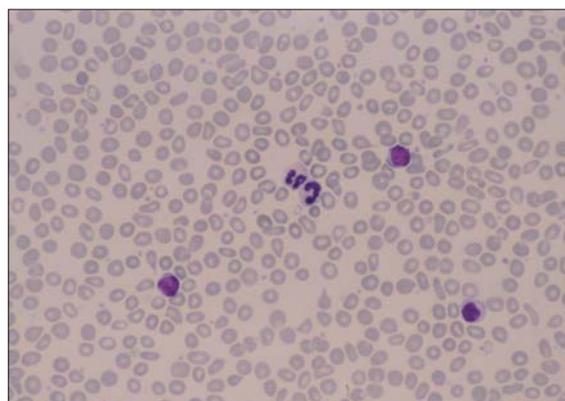


Figura 2. Frotis de sangre periférica. Anisocitosis, algunos hematíes en lágrima. Linfocitos con cromatina madura. (May-Grünwald-Giemsa, aumento original $\times 400$.)

tos maduros con alguna sombra de Gumprecht aislada, junto con blastos, eritroblastos y mielocitos (figs. 2 y 3).

Bioquímica: incremento significativo de la LDH sérica 818 U/l (vn: 240-480 U/l).

Ecografía abdominal: hallazgos compatibles con coledolitiasis y bazo en el límite alto de la normalidad.

Se realizó un nuevo aspirado de médula ósea pero el material obtenido no fue de una calidad citológica suficiente como para emitir una valoración citohematológica.

Inmunofenotipo de médula ósea: subpoblación de un 65 % de linfocitos CD5+, CD19+, DR+, CD23+, FMC7+, CD22+, CD38-, CD20+, CD19+, skappa+, CD10-.

La biopsia de médula ósea mostró un aumento de la celularidad hematopoyética, a expensas predominantemente de la serie megacariocítica, identificándose una celularidad linfoide madura, de linfocito pequeño, dispuesta en un patrón intersticio-nodular, con fibrosis reticulínica moderada, compatible con un síndrome mieloproliferativo crónico e infiltración nódulo-intersticial por celularidad linfoide madura (fig. 4).

Cariotipo de médula ósea: 47,XX, + 12 [3 %]/46,XX [97 %].

Estudio del transcrito quimérico bcr-abl: negativo tanto para p210 como para p190. Hibridación del cromosoma 12 con una sonda centromérica: 64 % de núcleos con trisomía 12.

Evolución: La paciente ha permanecido asintomática en todo momento, tanto durante los primeros 2 años de seguimiento como tras su reaparición después de 3 años de no ser controlada en el Hospital.

Diagnóstico definitivo: Mielofibrosis idiopática estadio 0 según el sistema pronóstico de Dupriez y leucemia linfoide crónica (LLC) B estadio A de Binet, 0 de Rai.

Discusión: En esta presentación se describe el caso de una paciente que inicialmente se diagnosti-

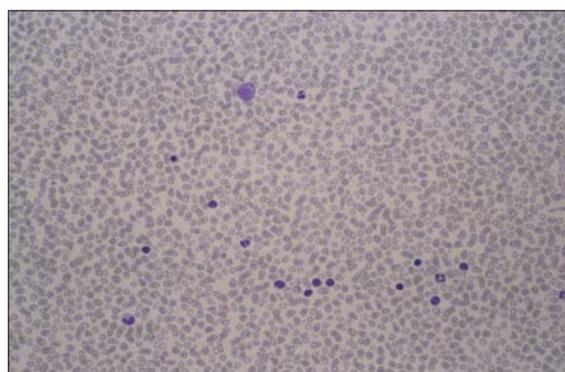


Figura 3. Frotis de sangre periférica. Predominio de linfocitos y algún elemento mielóide. (May-Grünwald-Giemsa, aumento original $\times 200$.)

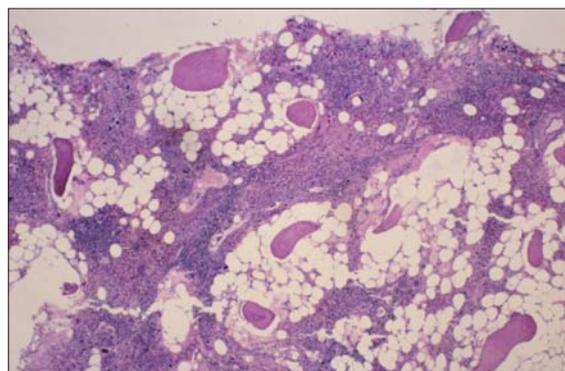


Figura 4. Segunda biopsia de médula ósea. Infiltración linfoide de patrón nódulo-intersticial. (Hematoxilina-eosina, aumento original $\times 20$.)

có de una mielofibrosis idiopática, y que durante su seguimiento, desarrolló también una LLC.

Su interés reside en la coincidencia poco frecuente de dos enfermedades hematológicas, una de ori-

gen mielóide y otra de origen linfóide, así como en la discusión sobre la posible relación patogénica entre ambas.

Para detectar otros casos descritos en la literatura médica se diseñó una estrategia de búsqueda amplia sobre la base de datos informatizada Medline, a través de PubMed. Los términos que más entradas produjeron fueron *chronic lymphocytic leukemia* y *myelofibrosis*. Combinando estos 2 términos se localizaron 43 artículos, de los cuales sólo en 3 se hablaba de casos clínicos en los que habían coincidido las dos enfermedades. De la revisión de la bibliografía de los artículos localizados se extrajeron otros 5 artículos en los que se describía la asociación. En total se han contabilizado 10 casos descritos en la literatura especializada.

Como posibles mecanismos patogénicos, se han apuntado en primer lugar que se trate de una manifestación bilineal de una proliferación de una célula madre pluripotente, de dos proliferaciones independientes de dos líneas celulares distintas bajo un mismo estímulo leucemógeno o bien una asociación casual.

La mielofibrosis idiopática es una enfermedad mieloproliferativa crónica que se caracteriza por una intensa fibrosis reactiva de la médula ósea y hematopoyesis extramedular, sobre todo en el bazo. El diagnóstico de mielofibrosis idiopática se realiza por exclusión de otras enfermedades clonales o no clonales que pueden asociarse con fibrosis medular.

Diferentes estudios de clonalidad han demostrado que su mecanismo patogénico radica en una alteración de la célula madre hematopoyética pluripotencial. En algunos de estos estudios se ha encontrado que esta alteración incluye a los linfocitos. De hecho un reciente estudio de clonalidad basado en hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) demostró que tanto los linfocitos B como los T eran de origen clonal en la mielofibrosis idiopática, y la ausencia de reordenamientos de inmunoglobulinas y del receptor de los linfocitos T indicaba que la mutación inicial de la enfermedad ocurre previamente al reclutamiento de las células madre hacia linfocitos.

Por otro lado, un grupo español estudió las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica en 31 pacientes con mielofibrosis idiopática concluyendo que la mayoría de estos pacientes presentaba una linfopenia, y que en el 10% de ellos existía un incremento de la subpoblación de linfocitos B CD5+, aunque en ninguno llegó a observarse la evolución a LLC.

La LLC es la forma más frecuente de leucemia entre las personas adultas de los países occidentales. A pesar de que tradicionalmente la LLC se ha asociado a una mayor incidencia de otras neoplasias en el mismo paciente, su asociación con otros síndromes mieloproliferativos, y en concreto con la mielofibrosis idiopática es excepcional.

En el caso descrito llama la atención la ausencia de esplenomegalia después de 8 años de evolución de una mielofibrosis idiopática.

Recordar que:

1. La asociación entre mielofibrosis idiopática y leucemia linfóide crónica está muy poco descrita en la literatura médica.

2. Sin embargo, la asociación podría ser más frecuente de lo esperado, teniendo en cuenta que en el 10% de los pacientes con mielofibrosis idiopática existe un aumento de los linfocitos B CD5+.

3. El estudio mediante cariotipo, FISH y biología molecular puede ayudar a identificar marcadores moleculares asociados a estas enfermedades que faciliten el diagnóstico de ambas.

Bibliografía recomendada

- Bohm J, Schaefer HE, Fisch P. Coincidence of chronic idiopathic myelofibrosis and chronic lymphocytic leukaemia. A rare phenomenon? *Pathology* 2002;23:480-5.
- Cervantes F, Hernández Boluda JC, Villamor N, Serra A, Montserrat E. Assessment of peripheral blood lymphocyte subsets in idiopathic myelofibrosis. *Eur J Haematol* 2000;65:104-8.
- Hernández-Nieto L, Raya JM, Alvarez H, Brito ML, González BG. A case of chronic lymphocytic leukemia overwhelmed by rapidly progressing idiopathic myelofibrosis. *Haematologica* 2000;85:973-7.
- Kaufman S, Luclea S, Reif R. Idiopathic myelofibrosis complicated by chronic lymphatic leukaemia. *Clin Lab Haematol* 1987;9:81-4.
- Reeder TL, Bailey RJ, Dewald GW, Tefferi A. Both B and T lymphocytes may be clonally involved in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 2003;101:1981-3.
- Zylberait D, Audebert AA, Grolleau Y, Krulik M, Hervouet D, Debray J. Two cases of agnogenic myeloid metaplasia associated with chronic lymphocytic leukemia. *Nouv Rev Fr Hematol* 1981;23:111-3.

Caso 5

AFECTACIÓN MEDULAR METASTÁSICA POR NEUROBLASTOMA

J.M. RAYA SÁNCHEZ¹, R. RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ¹, R. LÓPEZ-ALAMARAZ², H. ÁLVAREZ-ARGÜELLES³, M.L. BRITO BARROSO¹, J. RODRÍGUEZ-LUIS² Y L. HERNÁNDEZ-NIETO¹

Servicios de ¹Hematología, ²Pediatría y ³Anatomía Patológica. Hospital Universitario de Canarias. La Laguna. Tenerife.

Historia clínica: Paciente de 14 años que ingresa en Pediatría remitida de otro centro para estudio de anemia y dolores osteoarticulares difusos, junto con pérdida de apetito. No presentaba antecedentes personales de interés y su madre padecía de esclerosis múltiple.

Exploración física: Regular aspecto general, con palidez mucocutánea marcada. Afebril y normotensa. Soplo sistólico III/VI en focos de la base. No se palpaban visceromegalias. Resto dentro de límites normales.

Pruebas complementarias: En el hemograma destacaba una Hb de 77 g/l; Hto, 25,1%; VCM, 82 fl; HCM, 25,3 pg. Leucocitos, $3,8 \times 10^9/l$ (N, 49,5%, L, 38,5%, E, 2,5%, M, 9,5%). Plaquetas, $774 \times 10^9/l$.

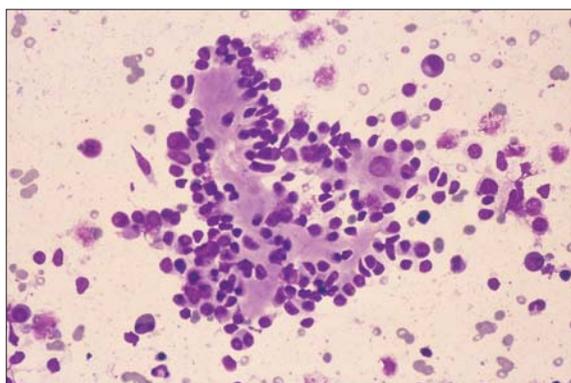


Figura 1. Imagen citológica de metástasis medular a modo de "roseta", con células neoplásicas inmaduras de talla pequeña en periferia y material amorfo-fibrilar en el centro. (May-Grünwald-Giemsa, $\times 200$.)

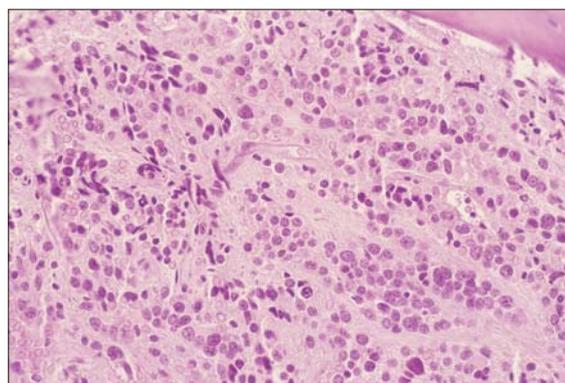


Figura 2. Médula ósea infiltrada de forma difusa por proliferación tumoral de células pequeñas, en el seno de una trama fibrilar, y con tendencia a configurar estructuras en "roseta". (Hematoxilina-eosina, $\times 200$.)

Reticulocitos: 2,9%; absolutos, $82,1 \times 10^9/l$. VSG, 130 mm/h. Morfología eritrocitaria: normal. En la bioquímica aparecía una LDH de 1.136 U/l, estando el resto de parámetros dentro de rango normal. Estudio básico de hemostasia, radiografías de tórax y abdomen, ecografía abdominal y TC de cuerpo, sin particularidades. Se realiza gammagrafía ósea con galio-67 que mostró captaciones múltiples (columna, región sacroilíaca y coxofemoral izquierda, región inframetáfisaria proximal de tibia derecha, en húmero izquierdo y calota craneal). *Aspirado de médula ósea*: médula hiper celular con representación aceptable de las distintas series hematopoyéticas, en la que destacaba la presencia de un 22% de células de aspecto inmaduro de distribución heterogénea, a veces formando pequeños cúmulos, con un material extracelular amorfo de tonalidad rosácea con la tinción empleada (May-Grünwald-Giemsa) que las envuelve por zonas (fig. 1). *Biopsia de médula ósea*: afectación medular masiva por tejido metastásico procedente de primario a localizar que desplaza de forma significativa las distintas series de la hematopoyesis (fig. 2). Desde un punto de vista morfológico e inmunohistoquímico se observa positividad de estas células para la enolasa específica, cromogranina y sinaptofisina, todo ello compatible con el diagnóstico de metástasis medular por neuroblastoma. Fibrosis reticulínica grado II generalizada. Gammagrafía con metaiodo-bencilguanidina (mIBG-¹³¹I): no muestra captación que localice tumor derivado de la cresta neural; sólo captación en las mismas localizaciones que la gammagrafía ósea. Marcadores tumorales séricos: enolasa específica 180 ng/ml (vn: 0-12,5); β_2 -microglobulina, alfafetoproteína y CEA, normales. *Cromatografía de orina de 24 h*: ácido vanilmandélico 184 mg (vn: 0,1-3,1) y ácido homovanílico 163 mg (vn: 0-5,0). *Estudio citogenético a partir de muestra medular*: se observaron dos líneas celulares: una 46,XX y otra con delección en brazo corto del cromosoma 1 (región 1p32-pter).

Diagnóstico: Afectación medular metastásica "masiva" por neuroblastoma de alto riesgo, sin tumor primario localizable.

Evolución: La paciente se trata inicialmente según Protocolo HR-NBL-1/ESIOP (incluye novoban, vincristina, carboplatino, VP-16, cisplatino y ciclofosfamida), consiguiéndose una remisión parcial, y después se somete a trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (acondicionamiento con busulfán y melfalán) con terapia de mantenimiento postrasplante de ácido 13-cis retinoico. Una revisión tras este tratamiento no mostró captación en la gammagrafía con mIBG y sólo la presencia de unos pequeños focos de células tumorales que habían experimentado maduración, en la biopsia de médula ósea (figs. 3A y 3B). Actualmente, a los 8 meses del trasplante, sigue controles periódicos por parte del servicio de pediatría.

Discusión: El neuroblastoma es un tumor maligno que se origina en la cresta neural y que puede aparecer en cualquier punto a lo largo de los ganglios simpáticos paraespinales o en la médula adrenal. La edad media de presentación es de 18-24 meses, siendo muy excepcionales los casos de aparición en adolescentes (menos del 5% de los casos) y extraordinariamente raros en adultos. Los signos y síntomas de presentación suelen ser reflejo de la localización del tumor primario y del grado de extensión de la enfermedad. Desde un punto de vista diagnóstico, el *International Neuroblastoma Staging System* (INSS) contempla que éste se puede realizar, bien mediante biopsia del tumor, o bien por la presencia de células tumorales típicas en médula ósea (reconocidas en aspirado o biopsia medulares) y una cifra elevada de catecolaminas en orina. Otorga, por tanto, el INSS, gran importancia al estudio óptico de médula ósea en el diagnóstico del neuroblastoma. Es por ello que el hematólogo debe estar necesariamente familiarizado con la citomorfología de estas células. Además, el estudio de extensión del tumor requiere

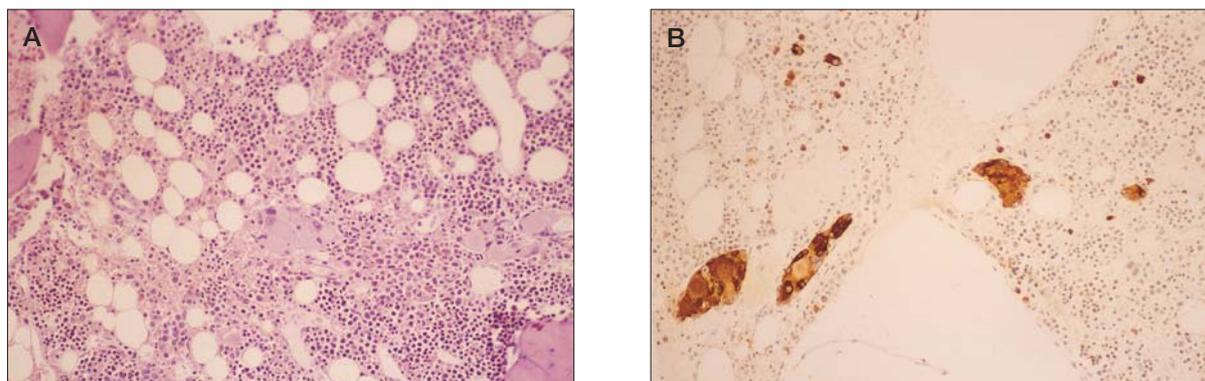


Figura 3. A) Médula ósea con focos tumorales mostrando diferenciación gangliónica. (Hematoxilina-eosina, $\times 100$.) B) Con técnicas de inmunohistoquímica se evidencia positividad para la cromogranina en nidos de células neoplásicas. (PAP, $\times 100$.)

de la realización de aspirados (que incluyan estudio citogenético y biología molecular) y biopsias bilaterales de médula, además de TC, gammagrafía ósea estándar y con metaiodo-bencilguanidina.

Morfológicamente, las metástasis del neuroblastoma pueden crear serias dificultades diagnósticas con las leucemias linfoblásticas. Habitualmente se disponen formando “rosetas” de células pequeñas, asociándose a veces la presencia de un material amorfo-fibrilar de localización extracelular. Sin embargo, cuando la distribución es más heterogénea en el frotis medular, como en nuestro caso, y además no es posible localizar el tumor primario con las técnicas habituales (TC y, sobre todo, gammagrafía con mIBG), la opinión del citohematólogo puede resultar de gran importancia. La determinación de marcadores tumorales específicos en suero y de catecolaminas en orina, junto a la positividad por inmunohistoquímica para marcadores neuroendocrinos en cortes de biopsia medular, confirmarán el diagnóstico. Alteraciones citogenéticas localizadas en el brazo corto del cromosoma 1 se asocian a este tipo de tumores, y en concreto la delección 1p32 se ha relacionado con una especial agresividad y diseminación de la enfermedad al diagnóstico, como ocurría en nuestra paciente.

Recordar que:

1. Los criterios diagnósticos actuales del neuroblastoma obligan al citohematólogo a saber reconocer las células específicas tumorales en un frotis de aspirado medular.
2. Aunque la edad de presentación habitual de este tumor se suele situar por debajo de los dos años, son posibles casos esporádicos en adolescentes e incluso adultos jóvenes (menos del 5% de los casos).
3. El estudio de extensión requiere de la realización de aspirado y biopsia medulares bilaterales. Desde un punto de vista inmunohistoquímico, los marcadores neuroendocrinos del tipo de la sinaptofisina, enolasa y cromogranina, resultan muy útiles al diagnóstico y en el seguimiento terapéutico de los pacientes.

Bibliografía recomendada

- Ambros PF, Mehes G, Ambros IM, Ladenstein R. Disseminated tumor cells in the bone marrow – chances and consequences of microscopical detection methods. *Cancer Lett* 2003;197:29-34.
- Gaspar N, Hartmann O, Munzer C, Bergeron C, Millot F, Cousin-Lafay L, et al. Neuroblastoma in adolescents. *Cancer* 2003;98:349-55.
- Hiyama E, Hiyama K, Ohtsu K, Yamaoka H, Fukuba I, Matsuura Y, et al. Biological characteristics of neuroblastoma with partial deletion in the short arm of chromosome 1. *Med Pediatr Oncol* 2001;36:67-74.
- Weinstein JL, Katzenstein HM, Cohn SL. Advances in the diagnosis and treatment of neuroblastoma. *The Oncologist* 2003;8:278-92.
- Woessner S, Florensa L. La citología óptica en el diagnóstico hematológico. 4.ª ed. Madrid: Acción Médica y FEHH, 2000.

Caso 6

MASTOCITOSIS SISTÉMICA ASOCIADA A SÍNDROME MIELODISPLÁSICO

R. NÚÑEZ¹, L. ESCRIBANO¹, A. PRADOS¹,
A. GARCÍA MONTERO², M. ANGULO²,
J. ALMEIDA², M. JARA², A. ORFAO², C. BELLAS³
Y M. GARCÍA-COSIO³

¹Unidad de Mastocitosis. Servicio de Hematología. Hospital Ramón y Cajal. Madrid. ²Servicio General de Citometría. Hospital Clínico de Salamanca. ³Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Ramón y Cajal. Madrid.

Historia clínica: Paciente varón de 73 años, diagnosticado en 1989 de carcinoma papilar de tiroides tratado con tiroidectomía y yodo radiactivo, remitido a la Unidad de Mastocitosis del Hospital Ramón y Cajal en abril del año 2000 con el diagnóstico de mastocitosis.

El paciente presentaba lesiones cutáneas de unos 20 años de evolución y fue diagnosticado de urticaria pigmentosa por biopsia cutánea. Refería prurito, episodios de enrojecimiento sin sudoración acompañados de taquicardia y parestesias en miembros superiores, en ocasiones con hipotensión y síncope. Además presentaba episodios de diarrea, alternan-

do con estreñimiento, y dolor abdominal de tipo cólico coincidiendo con los episodios de enrojecimiento. La mayor parte de las veces dichas crisis se desencadenaban por el estrés o la ingesta aunque en algunas ocasiones no se identificaba ningún factor desencadenante. Había sido sometido a procedimientos de anestesia general y local sin complicaciones.

Se le realizó una biopsia de médula ósea en el año 2000, compatible con el diagnóstico de mastocitosis sistémica.

Evolución: Desde el año 2000, sufrió un moderado, pero continuo, descenso de cifras de leucocitos, plaquetas y eritrocitos en sangre periférica. Por este motivo, se realizó una nueva biopsia de médula ósea en mayo de 2002 que fue compatible con el diagnóstico de mastocitosis sistémica asociada a síndrome mielodisplásico (SMD) tipo anemia refractaria con exceso de blastos tipo 2 (AREB-2) con displasia trilineal. Se han realizado una nueva biopsia de médula ósea en el año 2003 y un aspirado de médula ósea en enero de 2004.

El paciente permanece estable, sin requerimientos transfusionales ni episodios febriles y destaca una mejoría llamativa de los síntomas de liberación una vez iniciado el tratamiento con antihistamínicos (anti-H1 y anti-H2) y cromoglicato disódico. En ningún momento el paciente ha recibido terapia citoreductora por su mastocitosis o su SMD.

Exploración física: Lesiones cutáneas maculares de 1-3 mm de diámetro de color marrón oscuro en miembros inferiores, tronco y más aislados en miembros superiores. El resto de exploración era irrelevante.

Pruebas complementarias: *Bioquímica:* parámetros dentro de la normalidad. Desde el diagnóstico hasta el momento actual las cifras de hemoglobina han variado desde 136 g/l hasta 118 g/l, los leucocitos de $3,32 \times 10^9/l$ a $2,32 \times 10^9/l$ y las plaquetas de $150 \times 10^9/l$ a $69 \times 10^9/l$. Durante el tiempo de seguimiento, las cifras de triptasa sérica seriadas se han mantenido elevadas entre 38,1 y 61,2 $\mu g/l$. En ningún momento de la evolución se han detectado mastocitos circulantes por citometría de flujo.

Estudios de médula ósea: Estudio al diagnóstico (abril del año 2000): Estudio citológico: celularidad normal con moderada displasia trilineal y sin exceso de blastos. Se observó un marcado incremento de mastocitos de morfología atípica, con aumento de tamaño, de forma alargada, núcleo oval sin nucléolos, el citoplasma amplio con una disminución de la proporción superficie ocupada por los gránulos/superficie total del citoplasma, distribución anómala de los gránulos, fusión granular y prolongaciones citoplasmáticas (fig. 1).

Estudio histológico: en los cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina y Giemsa así como en las tinciones de inmunohistoquímica para triptasa

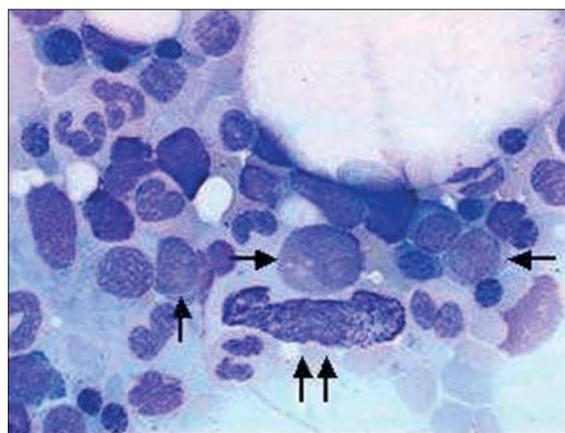


Figura 1. Se observa un mastocito de forma alargada con núcleo oval (flecha doble) y blastos mieloides (flecha). Aspirado de médula ósea. (May-Grünwald-Giemsa, $\times 1.000$.)

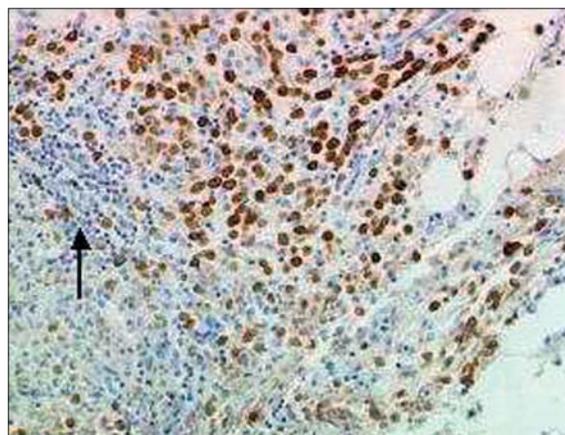


Figura 2. Estudio inmunohistoquímico en médula ósea. Se observa un agregado mastocitario junto con un pequeño agregado linfoide en la periferia (flecha). (Tinción inmunohistoquímica para triptasa, $\times 200$.)

sa y c-kit, se observaron agregados mastocitarios de distribución paratrabecular y con fibrosis focal asociada (fig. 2).

Estudio inmunofenotípico: con el análisis por citometría de flujo se observaron un 0,25% de mastocitos. Todos ellos expresaban de forma aberrante los antígenos CD2 y CD25 y sobrexpresaban las moléculas CD35, CD59 y CD69 (fig. 3).

En el estudio citogenético convencional el cariotipo resultó ser normal. No se detectó el reordenamiento bcr/abl mediante hibridación *in situ* fluorescente.

Segundo estudio (año 2002): En relación con los mastocitos, no se encontraron cambios morfológicos, histológicos ni inmunofenotípicos en relación con el estudio basal. Sin embargo, en el estudio citológico se observaron una marcada diseritropoyesis y un 11% de blastos sobre serie no

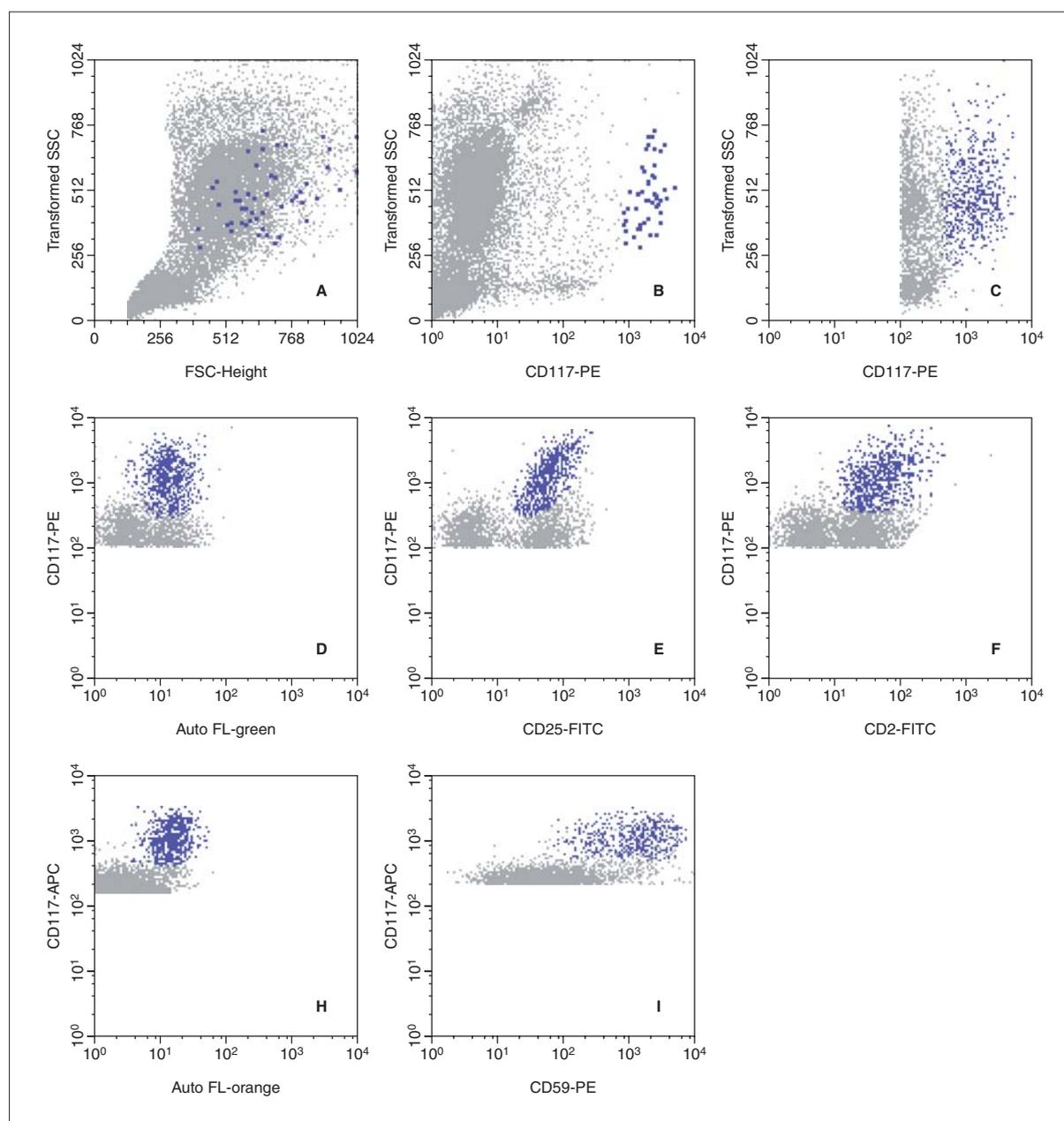


Figura 3. Imagen de las características inmunofenotípicas de los mastocitos de médula ósea, en la adquisición total (A-B) y en la adquisición selectiva de células CD117+++ (C-I). Los mastocitos (eventos azules) tienen una alta autofluorescencia, expresan de forma aberrante los antígenos CD2 y CD25 y sobreexpresan la molécula CD59.

eritroide, lo que se correspondía en la histología con la presencia de distribución anormal de precursores inmaduros.

En el estudio por citometría de flujo se detectó un 17,2% de blastos todos los cuales eran CD34-/+ , CD117+ , CD45+/++ , CD123-/+ y CD71-/+ . Además se distinguían 4 subpoblaciones de células mieloides inmaduras: la subpoblación 1 inmadura con rasgos de diferenciación hacia línea basófila (CD123++ con FSC/SSC bajo y CD45++) aunque

poco diferenciado (CD203- , 2D7- , HLA-DR+) , la subpoblación 2 es también inmadura con rasgos de diferenciación hacia línea granulocítica (cMPO+ , CD15-/+ , CD64-/+ , CD33+ , CD14- , CD36-) (fig. 4) , la subpoblación 3 con rasgos de diferenciación hacia línea eritroide (CD71++ , CD36++ , CD13- , CD33- , CD64-) y la subpoblación 4 con rasgos de diferenciación hacia línea monocítica. Era llamativa la presencia de asincronismos madurativos en las líneas granulocítica y eritroide (fig. 4).

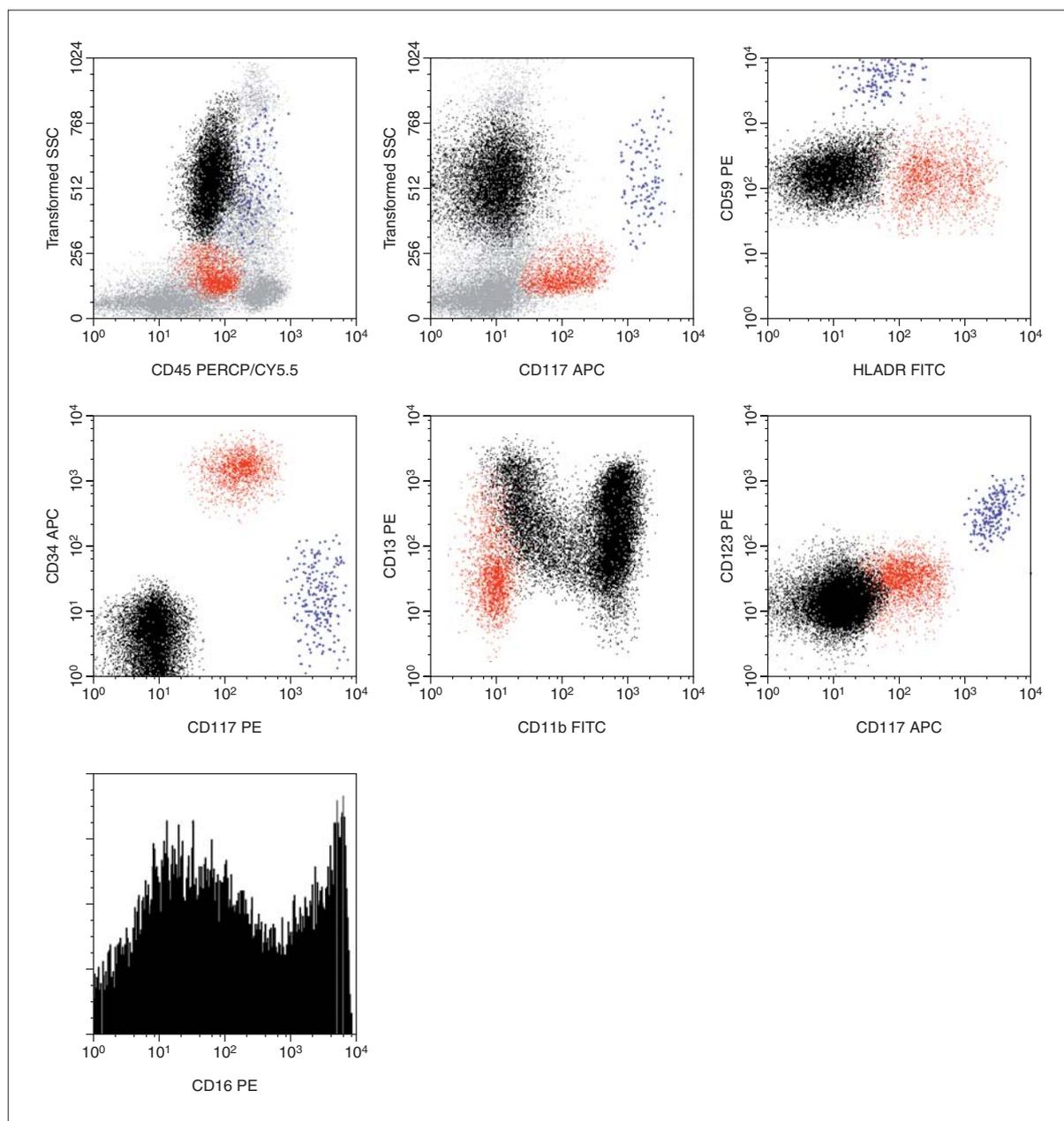


Figura 4. Imagen de citometría de flujo. Se observan los mastocitos (eventos azules), los blastos (eventos rojos) y los neutrófilos (eventos negros). El patrón de maduración de los neutrófilos es anormal como se observa en la expresión de CD11b, CD13 y CD16. Los mastocitos expresan CD123 y sobreexpresan CD59.

Estudio de las mutaciones del c-kit mediante PCR en tiempo real con sondas de hibridación y bloqueo de la secuencia silvestre con sonda de PNA: se detectó la mutación D-816 → V en los mastocitos de médula ósea.

Tercer estudio de médula ósea (año 2003): En el estudio citológico destacaban un marcado aumento del número de mastocitos de morfología atípica, un 3% de mastocitos binucleados (promastocitos) y un 10% de blastos sobre células nucleadas. Pre-

sencia de blastos agranulares así como blastos con granulación azurófila.

Estudio del inmunofenotipo: el porcentaje de blastos fue del 10%, con respecto al estudio anterior, destacó un aumento de la proporción de precursores indiferenciados y una disminución de los precursores de línea basófila. El contenido de ADN era diploide (índice de ADN = 1.00), con tasa proliferativa intermedia/alta (S + G2/M de 11%).

Cuarto estudio de médula ósea (año 2004): no se observaron cambios llamativos en cuanto a los porcentajes de mastocitos (0,1 %) ni de blastos (14 %) ni en cuanto a su inmunofenotipo.

Un nuevo estudio mediante PCR, confirmó la presencia de la mutación D-816 → V en los mastocitos de médula ósea pero no en los precursores hematopoyéticos CD34+, ni en los blastos ni en los neutrófilos.

Diagnósticos:

1. Mastocitosis sistémica asociada a hemopatía con afectación de piel, médula ósea, hueso y probablemente tubo digestivo.

2 SMD tipo AREB-2 (criterios WHO).

3 Hipotiroidismo secundario a tiroidectomía en tratamiento con levotiroxina.

Discusión: Las mastocitosis constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizadas por una proliferación anormal de mastocitos en diversos tejidos como la piel, la médula ósea, el tubo digestivo y el hueso, entre otros. Los mastocitos de las mastocitosis expresan un inmunofenotipo distinto a los normales. En las mastocitosis, el mastocito expresa de forma aberrante el antígeno CD25, generalmente junto con el CD2 y sobreexpresa también de forma aberrante los receptores asociados al complemento CD35 y CD59, además de las moléculas de activación CD63 y CD69. Este inmunofenotipo aberrante nunca está presente en los mastocitos de médula ósea u otros tejidos, de sujetos normales ni de pacientes con otras enfermedades hematológicas o no hematológicas.

El porcentaje de mastocitosis asociada a hemopatía es muy variable en las series publicadas. En nuestra experiencia con 151 casos de mastocitosis del adulto estudiadas de forma prospectiva, esta forma clínica representa el 4 % del total (Red Española de Mastocitosis-REMA [datos no publicados]). Siguiendo los criterios de consenso establecidos recientemente, el diagnóstico de mastocitosis asociada a hemopatía se establece en aquellos casos que cumplen los criterios diagnósticos establecidos para ambas hemopatías.

En el presente caso, el diagnóstico de mastocitosis sistémica se confirma al demostrarse un criterio mayor (presencia de agregados de mastocitos en médula ósea) y además 3 criterios menores (mastocitos de morfología atípica, expresión del inmunofenotipo aberrante y expresión de la mutación del c-kit). En los adultos, las mastocitosis sistémicas indolentes se consideran formas de buen pronóstico. A pesar de ello, una proporción variable de casos puede evolucionar, generalmente a largo plazo, hacia una forma agresiva o desarrollar otra hemopatía clonal. El pronóstico de las mastocitosis asociada a hemopatía depende básicamente del correspondiente a la hemopatía acompañante.

La posible relación existente entre los dos procesos clonales coexistentes no está del todo clara.

A este respecto, se han publicado recientemente casos en los que la mutación del c-kit Asp816Val se detecta en diversas líneas hematopoyéticas incluso en pacientes con mastocitosis sistémica tipo "smouldering", datos que no han podido ser confirmados en este caso.

Recordar que:

1. Para el diagnóstico de esta forma de la enfermedad es imprescindible que se cumplan de forma estricta los criterios diagnósticos establecidos para ambas hemopatías.

2. El tratamiento de las mastocitosis asociadas a hemopatía, depende por lo general del tipo de hemopatía acompañante. El tratamiento citorredutor sólo está indicado en casos con carga mastocitaria alta o que evolucionen hacia una mastocitosis agresiva o una leucemia de mastocitos.

3. En el momento actual un estudio correcto de una mastocitosis debe incluir, aparte de la morfología y la inmunohistoquímica, la caracterización inmunofenotípica de los mastocitos y el estudio de las mutaciones activantes del c-kit.

4. La determinación de los niveles de tripsasa total en suero es de gran ayuda para el diagnóstico y el seguimiento de la enfermedad.

Bibliografía recomendada

- Akin C, Kirshenbaum AS, Semere T, Worobec AS, Scott LM, Metcalfe DD. Analysis of the surface expression of c-kit and occurrence of the c-kit Asp816Val activating mutation in T cells, B cells, and myelomonocytic cells in patients with mastocytosis. *Exp Hematol* 2000;28:140-7.
- Díaz-Agustín B, Escribano L, Bravo P, Herrero S, Núñez R, Navalón R, et al. The CD69 early activation molecule is overexpressed in human bone marrow mast cells from adults with indolent systemic mast cell disease. *Br J Haematol* 1999;106:400-5.
- Escribano L, Orfao A, Díaz Agustín B, Cerveró C, Herrero S, Villarrubia J, et al. Human bone marrow mast cells from indolent systemic mast cell disease constitutively express increased amounts of the CD63 protein on their surface. *Cytometry* 1998;34:223-8.
- Escribano L, Orfao A, Díaz Agustín B, Villarrubia J, Cerveró C, López A, et al. Indolent systemic mast cell disease in adults. immunophenotypic characterization and its diagnostic implications. *Blood* 1998;91:2731-6.
- Escribano L, Díaz-Agustín B, Núñez R, Prados A, Rodríguez R, Orfao A. Abnormal Expression of CD Antigens in Mastocytosis. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;127:127-32.
- Escribano L, Díaz-Agustín B, López A, Núñez R, García-Montero AC, Almeida J, et al. Immunophenotypic analysis of mast cells in mastocytosis: When and how to do it? Proposals of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA). *Cytometry* 2004;58B:1-8.
- Núñez R, Escribano L, Scherthaner G, Prados A, Rodríguez-González R, Díaz-Agustín B, et al. Overexpression of complement receptors and related antigens on the surface of bone marrow mast cells in patients with systemic mastocytosis. *Br J Haematol* 2003;120:257-65.
- Pardanani A, Reeder T, Li CY, Tefferi A. Eosinophils are derived from the neoplastic clone in patients with systemic mastocytosis and eosinophilia. *Leuk Res* 2003;27:883-5.
- Sotlar K, Fridrich C, Mall A, Jaussi R, Bültmann B, Valent P, et al. Detection of c-kit point mutation Asp-816 → Val in microdissected pooled single mast cells and leukemic cells in a patient with systemic mastocytosis and concomitant chronic myelomonocytic leukemia. *Leuk Res* 2002;26:979-84.
- Sperr WR, Horny HP, Lechner K, Valent P. Clinical and biologic diversity of leukemias occurring in patients with mastocytosis. *Leuk Lymphoma* 2000;37:473-86.
- Sperr W, Escribano L, Jordán JH, Scherthaner GH, Kundi M, Horny H-P, et al. Morphologic properties of neoplastic mast cells: delineation of stages of maturation and implication for cytological grading of mastocytosis. *Leuk Res* 2001;25:529-36.
- Valent P, Horny H-P, Escribano L, Longley-BJ J, Li CL, Schwartz LB, et al. Diagnostic Criteria and Classification of Mastocytosis: A Consensus Proposal. *Leuk Res* 2001;25:603-25.

Caso 7

ENFERMEDAD DE CHÉDIAK-HIGASHI CON EVOLUCIÓN FAVORABLE DESPUÉS DE TRASPLANTE DE PRECURSORES HEMATOPOYÉTICOS DE DONANTE NO EMPARENTADO

P. BASTIDA VILÁ, A. LLORT SALES,
T. OLIVÉ OLIVERAS Y J.J. ORTEGA ARAMBURU
Servicio de Hematología. Hospital Universitario Materno-Infantil Vall d'Hebron. Barcelona.

Historia clínica: Primer y único hijo de 2 años de edad de padres sanos, no consanguíneos y sin antecedentes familiares de interés. Entre los 12 y 24 meses de edad presentó dos episodios de bronconeumonía y varios de otitis media. Durante un ingreso hospitalario por infección, se observó un fenotipo especial y alteraciones morfológicas en las células granulocíticas de sangre periférica, diagnosticándose de síndrome de Chédiak-Higashi. Se remitió para orientación terapéutica.

Exploración física: Peso: 15,2 kg. Talla: 96,5 cm. Buen estado general y de nutrición. Piel clara, cabello rubio grisáceo o plateado (fig. 1). Ojos claros con signos de fotofobia. No adenomegalias. Abdo-



Figura 1. Cabello de aspecto plateado en un paciente con enfermedad de Chédiak-Higashi.

men globuloso con hepatomegalia de 5 cm y esplenomegalia de 4 cm.

Exploraciones complementarias (iniciales, julio 2001): Hemograma: leucocitos, $9,9 \times 10^9/l$; PMN, $1,4 \times 10^9/l$; linfocitos, $7,2 \times 10^9/l$; Hb, 13,2 g/dl y plaquetas, $294 \times 10^9/l$. Presencia en neutrófilos de sangre periférica de una granulación gruesa, azurófila, peroxidasa positiva que también se observaba, aunque menos marcada, en linfocitos y monocitos (figs. 2A y B). Las subpoblaciones y función linfocita-

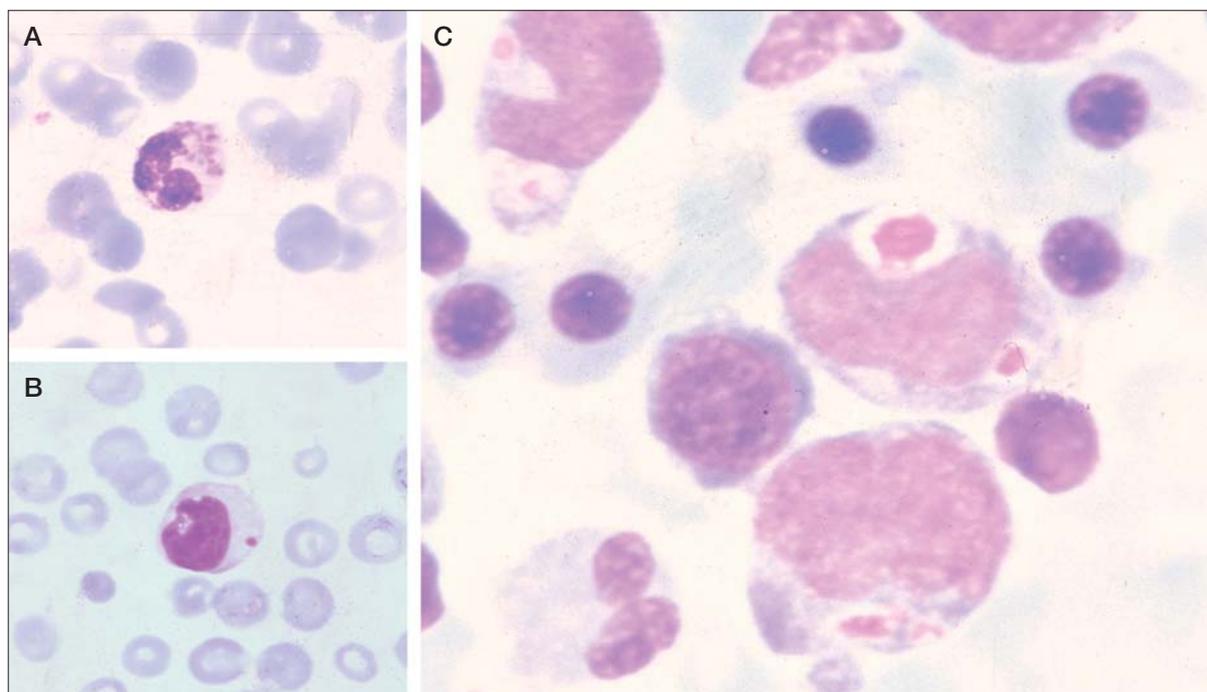


Figura 2. A) Sangre periférica con un neutrófilo con marcada granulación. (May-Grünwald-Giemsa, aumento original $\times 1.000$.) B) Sangre periférica con un linfocito con granulación gruesa. (May-Grünwald-Giemsa, aumento original $\times 1.000$.) C) Frotis de médula ósea. Varios precursores mieloides con lisosomas gigantes. (May-Grünwald-Giemsa, aumento original $\times 1.000$.)

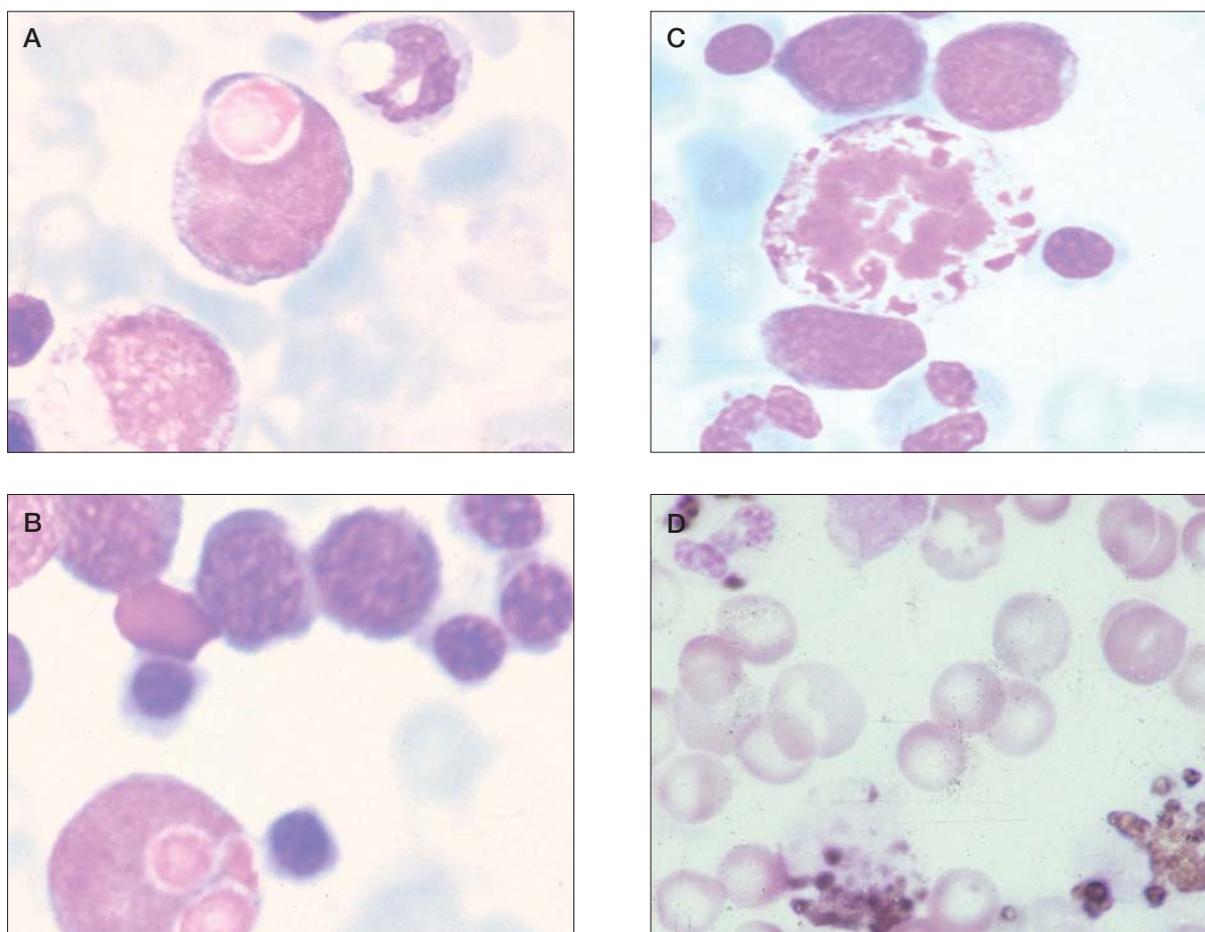


Figura 3. A) y B) Promielocitos con varias imágenes de cuerpos de inclusión. (May-Grünwald-Giemsa, aumento original $\times 1.000$.) C) Promielocito en mitosis con granulación gigante. (May-Grünwald-Giemsa, aumento original $\times 1.000$.) D) Tinción de mieloperoxidasa. Varias células mieloides positivas. (May-Grünwald-Giemsa, aumento original $\times 1.000$.)

ria fueron normales, así como la capacidad oxidativa de los granulocitos. En el examen de líquido cefalorraquídeo se observaron 12 cél./mm^3 identificadas como linfocitos y macrófagos. En el examen oftalmológico se apreció albinismo ocular. La resonancia magnética intracraneal mostraba escasa mielinización de la sustancia blanca. *Examen de médula ósea:* celularidad abundante. Presencia de las tres series hematopoyéticas en todos los estadios madurativos. Serie granulocítica con abundantes formas jóvenes, y presencia de gránulos gigantes peroxidasa positivos. En algunas células se observaban grandes vacuolas con cuerpos de inclusión o lisosomas en su interior, tanto en la serie granulocítica como en eosinófilos y monocitos (figs. 2C y 3A-C). La granulación gigante es mieloperoxidasa positiva (fig. 3D)

Tratamiento y evolución: Una vez confirmado el diagnóstico se recomendó profilaxis y control de infecciones. Transcurridos 2 años del mismo (junio 2003) acudió de nuevo por presentar fiebre, aumento importante de la hepatoesplenomegalia, pancitopenia intensa, elevación de ferritina y alteración de las

pruebas de coagulación. Las exploraciones complementarias en este momento eran las siguientes: *Hemograma:* leucocitos: $1,3 \times 10^9/\text{l}$; PMN, $0,1 \times 10^9/\text{l}$; Hb, 7,3 g/dl; plaquetas, $16 \times 10^9/\text{l}$. T Quick, 38%; fibrinógeno, 1,3 g/l; ferritina, 1961 $\mu\text{g/l}$; triglicéridos, 239 mg/dl; colesterol, 171 mg/dl; AST, 61 U/l; ALT, 326 U/l; poblaciones linfocitarias, CD3:81%; CD4, 52%; CD8, 25%; índice CD4/CD8, 2,1; células NK o linfocitos grandes granulares, 4%. Serologías virales negativas (hepatitis B y C, citomegalovirus, Epstein-Barr, HIV y parvovirus). Mielograma con características similares al examen previo; considerando que se trataba de una fase acelerada de la enfermedad, recibió tratamiento con etopósido, corticoides y ciclosporina con buena respuesta. A los 4 meses (septiembre de 2003) fue sometido a trasplante alogénico de médula ósea de donante no emparentado. El acondicionamiento consistió en busulfán, ciclofosfamida y gammaglobulina antitumoral. Presentó hipertensión grave y encefalopatía hipertensiva en el período inmediato postrasplante. El estudio de quimerismo demostró un buen implante con quimerismo com-

pleto. A los 100 días postrasplante presentaba buen estado general, se controlaba ambulatoriamente, habían desaparecido las organomegalias abdominales y el recuento hematológico era el siguiente: leucocitos, $2,2 \times 10^9/l$; PMN, $0,7 \times 10^9/l$; Hb, 8,9 g/dl, y plaquetas, $88 \times 10^9/l$. Los exámenes citológicos en sangre periférica y médula ósea demostraban la desaparición de las alteraciones observadas al diagnóstico inicial (figs. 4A y B).

Diagnóstico: Enfermedad de Chédiak-Higashi que presenta una fase acelerada a los 3 años del diagnóstico inicial.

Discusión: El síndrome de Chédiak-Higashi es una rara enfermedad multiorgánica caracterizada por albinismo parcial oculocutáneo, infecciones bacterianas frecuentes y lisosomas gigantes en la mayoría de las células del organismo. La herencia es autosómica recesiva. Hasta la actualidad se han descrito 200 enfermos aproximadamente. Se ha atribuido el origen de la enfermedad a una mutación a nivel del gen *LYST*, responsable de la regulación del tráfico lisosomal y situado en el cromosoma 1q42-q43.

Los defectos lisosomales se observan en varios tejidos. En los melanocitos alteran la distribución de la melanina con la consiguiente hipopigmentación del cabello, piel, iris y retina. Los gránulos gigantes pueden verse también en células de Schwann, hepatocitos, esplenocitos, páncreas, mucosa gástrica, riñón y diversas glándulas. Es un defecto generalizado de la morfogénesis granular.

La susceptibilidad a las infecciones viene dada por el defecto de la quimiotaxis de los granulocitos, de su desgranulación, del retraso en la muerte intracelular de microorganismos y de la falta de actividad citotóxica de las células NK. Las infecciones son frecuentes en piel, tracto respiratorio y mucosas. Los gérmenes más frecuentes son grampositivos, especialmente estafilococos.

El diagnóstico diferencial del síndrome de Chédiak-Higashi incluye otras formas genéticas de albinismo parcial con defectos en el almacenamiento de melanina, presencia de grandes melanosomas y distribución irregular de melanina. El síndrome de Griscelli-Prunieras es una de ellas. Se acompaña de inmunodeficiencia y afectación neurológica. A diferencia del anterior, no presenta gránulos gigantes en sus neutrófilos. Otra forma genética de albinismo parcial, el síndrome de Hermansky-Pudlak con depósito de lipofucsina en varios órganos, tampoco presenta la citada granulación.

En el síndrome de Chédiak-Higashi todos los tipos de células sanguíneas pueden presentar grandes gránulos, sobre todo la serie mielóide. En estadios precoces de la mielopoyesis, los gránulos azurófilos se unen formando grandes inclusiones citoplasmáticas que, unidas a la granulación específica, formarán grandes lisosomas. Se produce una destrucción intramedular de precursores mieloides, una apoptosis acelerada, con la consiguiente neutropenia circu-

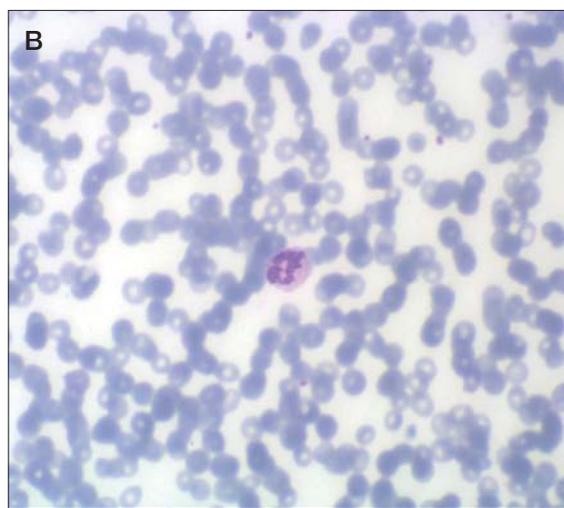
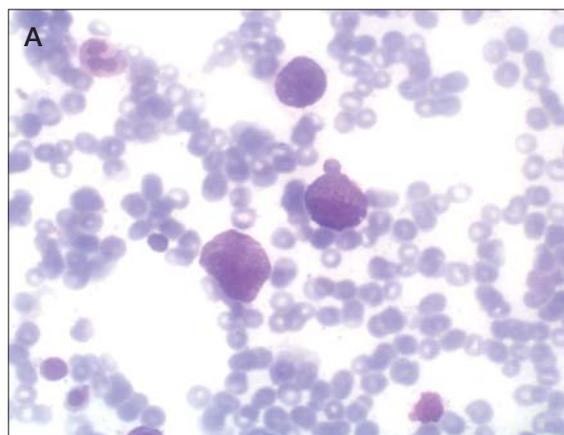


Figura 4. Imágenes de sangre periférica y médula ósea después de trasplante de precursores hematopoyéticos. Desaparición de la granulación observada anteriormente. A) Frotis de médula ósea. (May-Grünwald-Giemsa, aumento original $\times 1.000$.) B) Neutrófilo en sangre periférica. (May-Grünwald-Giemsa, aumento original $\times 600$.)

lante y alteración de la función leucocitaria (quimiotaxis, desgranulación y actividad bactericida). La marcada granulación de los neutrófilos constituye a menudo el signo guía diagnóstico; también aparecen afectados los linfocitos, monocitos y plaquetas. La observación de gránulos en la serie eritroide es extremadamente rara.

Lo que determina realmente la gravedad de la enfermedad es la evolución a una fase acelerada que consiste en la infiltración de la mayoría de tejidos por linfocitos T activados y macrófagos. Se caracteriza por aumento de la hepatoesplenomegalia, adenomegalias, intensa pancitopenia, alteraciones de la coagulación y hemofagocitosis en médula ósea. La sintomatología, en esta fase, es idéntica a la observada en la linfohistiocitosis familiar o en los síndromes hemofagocíticos asociados a virus. La hiperactivación del sistema macrofágico es común a todas estas patologías.

Un factor pronóstico importante es la edad de instauración de esta complicación; así, si el comienzo se sitúa por debajo de los 6 años la evolución es mucho peor. Parece que el virus de Epstein-Barr puede estar implicado en el origen de la misma debido a la imposibilidad de estos pacientes para controlarlo.

El diagnóstico debe sospecharse ante un niño que presenta infecciones bacterianas de repetición, hipopigmentación de pelo y ojos y gránulos lisosomales gigantes peroxidasa positivos en las células de sangre periférica o médula ósea. En algunos pacientes las primeras manifestaciones pueden ser neurológicas con ataxia, hipotonía muscular, arreflexia tendinosa o anomalías electroencefalográficas.

El tratamiento en la fase estable consiste en la profilaxis y tratamiento de las infecciones. Se ha considerado útil la administración de grandes dosis de vitamina C. El tratamiento de la fase acelerada es difícil. Se han utilizado corticoides, alcaloides de la vinca, etopósido y ciclosporina. El único tratamiento curativo es el trasplante de progenitores hematopoyéticos de donante sano. Idealmente debe realizarse antes de alcanzar la fase acelerada. Hadad E et al describieron la serie más larga publicada con 10 enfermos tratados con TPH alogénico (7 familiar HLA idéntico y 3 no idéntico), de los cuales sobrevivieron 7 con una mediana de seguimiento de 6,5 años. En ninguno de ellos se desarrolló una fase acelerada a pesar del quimerismo mixto en alguno de ellos. Describen que con una pequeña propor-

ción de células del donante se puede recuperar la función NK. Lo mismo queda reflejado en el artículo de Trigg et al donde defiende además que el régimen de acondicionamiento debe ser poco agresivo para minimizar los efectos secundarios a largo plazo. El régimen de acondicionamiento más utilizado consiste en etopósido, busulfán y ciclofosfamida.

Recordar que:

1. La enfermedad de Chédiak-Higashi es una patología muy poco frecuente que se debe sospechar ante un niño con infecciones de repetición, fenotipo especial con albinismo parcial y fotofobia y presencia de las típicas granulaciones en células de sangre periférica, sobre todo en los neutrófilos.

Bibliografía recomendada

- Barton LM, Roberts P, Trantou V, Haworth C, Kelsey H, Blamires T. Chédiak-Higashi syndrome. *Br J Haematol* 2004;125:2.
- Bejaoui M, Veber F, Girault D, Gaud C, Blanche S, Griscelli C, et al. Phase accélérée de la maladie de Chédiak-Higashi. *Arch Fr Pédiatr* 1989;46:733-6.
- Certain S, Barrat F, Pastural E, Le Deist F, Goyo-Rivas J, Jabado N, et al. Protein truncation test of LYST reveals heterogenous mutations in patients with Chédiak-Higashi syndrome. *Blood* 2000;95:979-83.
- Haddad E, Le Deist F, Blanche S, Benkerrou M, Rohrlisch P, Vilmer E, et al. Treatment of Chédiak-Higashi syndrome by allogenic bone marrow transplantation: Report of 10 cases. *Blood* 1995;85:3328-33.
- Mottonen M, Lanning M, Baumann P, Saarinen-Pihkala UM. Chédiak-Higashi syndrome: Four cases from Northern Finland. *Acta Paediatr* 2003;92:1047-51.
- Trigg ME, Schugar R. Chédiak-Higashi syndrome: hematopoietic chimerism corrects genetic defect. *Bone Marrow Transplantation* 2001;27: 1211-3.